

**RENATA SCAVONE DE OLIVEIRA**

**PARACOCCIDIOIDOMICOSE:  
ACOMPANHAMENTO DE PARÂMETROS DE IMUNIDADE ADQUIRIDA  
E DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DE FAGÓCITOS EM CAMUNDONGOS  
ISOGÊNICOS SUSCETÍVEIS SUBMETIDOS À TERAPIA  
ANTIFÚNGICA**

Tese apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências (Imunologia).

São Paulo  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RENATA SCAVONE DE OLIVEIRA

**PARACOCCIDIOIDOMICOSE:  
ACOMPANHAMENTO DE PARÂMETROS DE IMUNIDADE ADQUIRIDA  
E DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DE FAGÓCITOS EM CAMUNDONGOS  
ISOGÊNICOS SUSCETÍVEIS SUBMETIDOS À TERAPIA  
ANTIFÚNGICA**

Tese apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título  
de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra. Eva Burger

São Paulo  
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Scavone de Oliveira, Renata.

Paracoccidioidomicose: acompanhamento de parâmetros de imunidade adquirida e do estado de ativação de fagócitos em camundongos isogênicos suscetíveis submetidos à terapia antifúngica / Renata Scavone de Oliveira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Eva Burger.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunopatologia das micoses.

Versão do título para o inglês: Paracoccidioidomycosis: follow up of acquired immunity parameters and of the activation state of phagocytes in susceptible isogenic mice submitted to the antifungal therapy.

Descritores: 1. Paracoccidioidomicose 2. Anfotericina B 3. Receptor *Toll-like* 4 4. Macrófagos 5. Neutrófilos 6. Modelo murino isogênico I. Burger, Eva II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB2/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Renata Scavone de Oliveira.

Título da Tese: Paracoccidioidomicose: acompanhamento de parâmetros de imunidade adquirida e do estado de ativação de fagócitos em camundongos isogênicos suscetíveis submetidos à terapia antifúngica.

Orientador(a): Eva Burger.

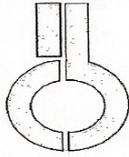
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

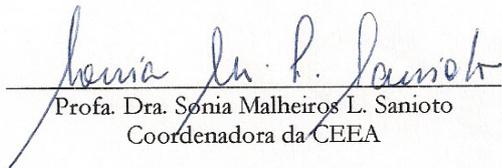
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091-7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438  
e-mail:

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 224/02, sobre o projeto intitulado **“Paracoccidioidomicose: acompanhamento de parâmetros de imunidade adquirida e do estado de ativação de fagócitos em camundongos isogênicos suscetíveis submetidos à terapia antifúngica”**, sob a responsabilidade de **Renata Scavone de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **26/11/2002**.

(We certify that the protocol nº 224/02 ,about *“Paracoccidioidomycosis: follow-up of acquired immunity parameters and of fagocytes activation status in susceptible inbred mice submitted to antifungal therapy ”* agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **26/11/2002** meeting.)

São Paulo, 26 de novembro de 2002.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Sônia Malheiros L. Sanioto  
Coordenadora da CEEA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender  
Secretária da CEEA

## **DEDICATÓRIA**

A meus pais, Verônica e José Luiz, meu irmão Fúlvio, minha avó Guiomar, meu avô José e minha tia Roberta, com todo o meu amor. Nada seria sem vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Os últimos 13 anos de minha vida estiveram, de uma maneira ou de outra, ligados a este Departamento. Vi muitos chegarem e partirem, em todos os sentidos. Foram anos intensos, que marcaram minha transição definitiva para a vida adulta. Por isso, é muito difícil escrever estes agradecimentos, principalmente nesta fase final, de cabeça cheia e emoções à flor da pele. Agradeço a todos que, ao longo destes anos, tornaram meus dias mais agradáveis, seja por um "bom dia!" animado no corredor, um papo agradável no café ou algum tipo de auxílio nas horas de angústia (aliás, a solidariedade entre os pós-graduandos deste Departamento é impressionante e, sem dúvida, um de nossos maiores patrimônios). Ainda assim, meus agradecimentos especiais, por seu papel fundamental nesta trajetória:

À minha orientadora, Profa. Dra. Eva Burger, por tudo o que me ensinou.

À toda a equipe do Laboratório de Imunopatologia das Micoses e do Laboratório de Imunologia das Micoses.

Aos docentes do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial o Prof. Dr. Gil Benard, o Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo, o Prof. Dr. Magnus Gidlund e a Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich.

A todos os funcionários do Departamento de Imunologia, em especial a Amarildo Utiana, Jotelma Ribeiro, Maria Eni Santos, Milton Santos, Moisés Brito, Otacílio Santos e Valéria Santos, com muito carinho.

Aos funcionários da empresa Faísca, pelo cuidado com nosso Departamento.

A toda a equipe dos Biotérios de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com um carinho especial por Sílvia Massironi, Rosália Regina de Luca, Israel Lima e Dourival Mascarenhas.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB-USP, pelo excelente trabalho e auxílio técnico.

A Bernardo Paulo Albe, pelo meticuloso trabalho e conversa sempre agradável.

A Cynthia Xidieh, com saudades indescritíveis.

A Lúcia Meloni-Bruneri, pelo exemplo de vida.

A meus eternos amigos, que tão de perto acompanharam a realização deste trabalho: Adriana Pina, Aldacilene Souza da Silva, Angela Nishikaku, Celina Arruda, Cláudia da Silva Cunha, Lorena Bavia, Luciana Cristina Ribeiro, Maíra Felonato, Matheus Ferracini, Raphael Molina e Simone Bernardino.

Aos docentes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, ao Prof. Dr. José Luiz Merusse, à Profa. Mitika Hagiwara e à Profa. Dra. Nivea Lopes de Souza, por tudo o que me ensinaram, tanto na graduação quanto na pós-graduação e o carinho com o qual sempre me receberam. Coursar esta escola é, e sempre será, meu maior orgulho.

Ao Prof. Percy Benedicto de Siqueira, Prof. Naotaca Otani e Profa. Maria Marta Pinto, por sua participação fundamental em minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento deste trabalho (processos 02/10905-6 e 04/14718-1).

A meus demais amigos eternos, que tiveram a sorte (!) de não acompanhar este trabalho tão de perto, mas sempre se fizeram presentes: Alexandre Pereira, Anderson "Bigode", Andréa Pina, Augusto Minoru Horiuti, Blandiny Ferrari, Carla Porrino, Carlos Cesin, Carlos Eduardo "Mortinho" Silva, Dênis Gonçalves, Fernando Lira, Janaína Ferrari, Jonivaldo "Joni" e Lúcia Santos, Guilherme Otani, Leonardo Carneiro, Marluce Lima, Natasha Silva, Nelson Constantino, Priscila Santos, Renata Barrachi, Rosana Souza, Silvanei "Xuxu" e Maurício Volodka, Vívian de Souza Lima, Viviane Cozzolino, Wilton "BJ" Brejão Júnior e Wellington "Éto" Cunha.

À *Empty Bottle*, Eric Rodrigues, Wagner Dantas e Sílvio "Leone" Leonel.

À família Monier-Chelini, pelo carinho imenso e mimos indescritíveis com os quais sempre me receberam.

A Nicolau Frederico Augusto e Mirna Mantecón, que tanto me ensinaram.

À Maria Clara, Maria Celeste, Capitu e Bebê, meus maiores amores.

À população do Estado de São Paulo que, através de seus impostos, faz com que todo este sistema funcione e que, infelizmente, nem sempre pode dele usufruir. Espero, sinceramente, que este trabalho possa beneficiar, de alguma forma, os pacientes acometidos por esta doença terrível e tão negligenciada.

Por fim, meus mais sinceros agradecimentos a Wilians Afonso, por ter sempre acreditado em mim, mesmo quando eu não conseguia mais fazê-lo. "Thoughts of hope understood (...), thoughts of love remain true".

“We don’t need no thought control.”

R. Waters

## RESUMO

Scavone de Oliveira, R. Paracoccidioidomicose: acompanhamento de parâmetros de imunidade adquirida e do estado de ativação de fagócitos em camundongos isogênicos suscetíveis submetidos à terapia antifúngica [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2008.

Camundongos suscetíveis e resistentes à infecção intraperitoneal com o isolado Pb18 do *Paracoccidioides brasiliensis* apresentam padrões imunológicos distintos. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da administração de drogas antifúngicas sobre parâmetros micológicos e imunológicos apresentados por animais suscetíveis. O tratamento com c-AmB, embora tenha reduzido a carga fúngica apresentada pelos animais, não foi capaz de reverter o padrão de suscetibilidade para o de resistência e foi associado ao desenvolvimento de lesões na área de inoculação da droga. A administração de L-AmB reduziu ainda mais a carga fúngica e levou a uma reversão mais eficiente, embora incompleta, de tais padrões, como observado na quantificação de NO e IgG2b. Porém, os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , GM-CSF e dos anticorpos específicos IgG total, IgM, IgG1, IgG2a e IgA não foram significativamente alterados. Dada a possível sinergia entre antifúngicos e fagócitos no combate a patógenos, neutrófilos e macrófagos peritoneais foram co-cultivados com Pb18 na presença ou não de L-AmB. Verificou-se que a capacidade fungicida destas células tende a ser maior na presença do fármaco, mas tal efeito não parece ser mediado por uma maior síntese dos mediadores analisados. O melhor desempenho de L-AmB poderia ser creditado a sua interação com o receptor TLR4. Em camundongos TLR4-deficientes ou não, infectados e não submetidos ao tratamento, a progressão da doença foi similar, indicando a ausência de um papel relevante do receptor na resposta anti-*P. brasiliensis*. A eficácia da terapia, porém, foi menor em camundongos TLR4-deficientes do que nos suficientes, como observado na quantificação de fungos viáveis; porém, os perfis leucocitários e as concentrações de NO, TNF- $\alpha$ , IL-12 e GM-CSF não foram

significativamente alterados pela interação entre L-AmB e TLR4. Portanto, conclui-se que a administração desta droga antifúngica é capaz de reverter os parâmetros micológicos, mas não os imunológicos, do padrão de suscetibilidade para o de resistência. A interação entre o receptor TLR4, o *P. brasiliensis* e a L-AmB não parece ser importante para o estabelecimento da imunidade antifúngica.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomicose. Anfotericina B. Receptor *Toll-like* 4. Macrófagos. Neutrófilos. Modelo murino isogênico.

## ABSTRACT

Scavone de Oliveira, R. Paracoccidioidomycoses: follow up of acquired immunity parameters and of the activation state of phagocytes in susceptible isogenic mice submitted to the antifungal therapy [PhD Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2008.

After intraperitoneal infection with Pb18 isolate of *Paracoccidioides brasiliensis*, susceptible and resistant mice present distinct immunological patterns. In this work, the effects of the administration of antifungal drugs in mycological and immunological parameters presented by susceptible animals were evaluated. Therapy with c-AmB, although diminished the fungal load presented by the animals, was unable to revert the susceptibility pattern to the resistant one and was associated with the development of lesions in the area of drug inoculation. Administration of L-AmB reduced the fungal load even more, and lead to a most efficient, although incomplete, reversion of such patterns, as noted in the measurement of NO and IgG2b. However, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , GM-CSF and specific IgG total, IgM, IgG1, IgG2a and IgA levels were not significantly altered. Given the possible synergy between antifungals and phagocytes in the killing of pathogens, peritoneal neutrophils and macrophages were co-cultivated with Pb18 in the presence or not of L-AmB. The fungicidal ability of these cells tends to be augmented in the presence of the drug, but this effect does not seem to be mediated by an increased synthesis of the analyzed mediators. The better performance of L-AmB could be due to its interaction with TLR4. In TLR4-deficient or sufficient mice, not submitted to therapy, the progression of the disease was similar, indicating the absence of a relevant role of the receptor in anti-*P. brasiliensis* response. However, therapy was less efficient in TLR4-deficient mice when compared with sufficient ones, as noted in viable fungi quantification; however, white blood cells profiles and NO, TNF- $\alpha$ , IL-12, and GM-CSF levels were not expressively altered by the interaction of L-AmB and TLR4. Therefore, it is concluded that the administration of

these antifungal drugs can revert the mycological parameters, but not the immunological ones, from the susceptible to the resistant pattern. Interaction between TLR4, *P. brasiliensis* and L-AmB does not seem to be important in the establishment of antifungal immunity.

**Key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomycosis. Amphotericin B. Toll-like receptor 4. Macrophages. Neutrophils. Isogenic murine model.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Respostas em reações de HTT em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, 24 horas após a inoculação do antígeno de Fava Netto, aos 7 e 15 dias de infecção ..... 53
- Figura 2. Quantificação de fungos viáveis em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção ..... 54
- Figura 3. Determinação da concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção ..... 56
- Figura 4. Determinação da concentração de IFN- $\gamma$  em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção ..... 57
- Figura 5. Determinação da concentração de GM-CSF em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção ..... 58
- Figura 6. Determinação da concentração de IL-10 em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de a infecção ..... 59
- Figura 7. Determinação da concentração de IL-5 em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção ..... 61

Figura 8. Titulação de IgG total anti-gp43 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em soros de camundongos inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção .....	62
Prancha I. Análise histopatológica aos 7 dias pós-infecção realizada em baço de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia .....	64
Prancha II. Análise histopatológica aos 7 dias pós-infecção realizada em epiploon de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia .....	66
Prancha III. Análise histopatológica aos 7 dias pós-infecção realizada em fígado de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia .....	67
Prancha IV. Análise histopatológica aos 15 dias pós-infecção realizada em epiploon de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia .....	68
Prancha V. Análise histopatológica aos 15 dias pós-infecção realizada em epiploon de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia .....	71
Figura 9. Respostas em reações de HTT em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção .....	73

Figura 10. Quantificação de fungos viáveis em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção .....	76
Figura 11. Determinação da concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção .....	77
Figura 12. Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção .....	79
Figura 13. Determinação da concentração de IL-12 em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção .....	81
Figura 14. Determinação da concentração de IFN- $\gamma$ em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção .....	82
Figura 15. Determinação da concentração de GM-CSF em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção .....	83

Figura 16. Titulação de IgG total anti-gp43 de <i>P. brasiliensis</i> em soros de camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 15 e 30 dias após a infecção .....	84
Figura 17. Titulação de anticorpos anti-gp43 de <i>P. brasiliensis</i> de isótipos IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA em soros de camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 30 dias após a infecção .....	85
Prancha VI. Ausência de lesões, aos 7 dias após a infecção, em baço de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia .....	88
Prancha VII. Análise histopatológica aos 15 dias pós-infecção realizada em epiploon de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia .....	88
Prancha VIII. Análise histopatológica em epiploon de camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não ao tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia, 30 dias após a infecção .....	89
Prancha IX. Análise histopatológica em fígado de camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não ao tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia, 30 dias após a infecção .....	91
Figura 18. Índice de morte do fungo após diferentes tempos de co-cultivo de neutrófilos com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB .....	94

Figura 19. Concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em sobrenadantes de cultura de neutrófilos em diferentes tempos de co-cultivo destas células com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB .....	96
Figura 20. Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por neutrófilos em diferentes tempos de co-cultivo destas células com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB .....	97
Figura 21. Concentração de citocinas em sobrenadantes de co-cultivos de neutrófilos com leveduras de Pb18 na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB, após 2 horas de incubação .....	99
Figura 22. Índice de morte do fungo após diferentes tempos de co-cultivo de macrófagos com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB .....	100
Figura 23. Concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em sobrenadantes de cultura de macrófagos, em diferentes tempos de co-cultivo destas células com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB .....	101
Figura 24. Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por macrófagos em diferentes tempos de co-cultivo destas células com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB .....	103
Figura 25. Sobrevida de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18 .....	105
Figura 26. Peso corpóreo de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18 .....	105

Figura 27. Respostas em reações de HTT em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18, aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias após a infecção .....	107
Figura 28. Quantificação de fungos viáveis em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18, aos 7, 15, 30 e 180 dias após a infecção .....	109
Figura 29. Determinação da concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas antes da inoculação com Pb18 e aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias de infecção .....	111
Figura 30. Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 .....	112
Figura 31. Determinação da concentração de IL-12 em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 .....	114
Figura 32. Determinação da concentração de IFN- $\gamma$ em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 .....	115
Figura 33. Determinação da concentração de GM-CSF em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 .....	117
Figura 34. Titulação de IgG total anti-gp43 de <i>P. brasiliensis</i> em soros de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas, aos 30 e 300 dias após a infecção .....	118
Prancha X. Análise histopatológica realizada em baço de camundongos C3H/HeJ inoculados com Pb18, aos 7 dias após a infecção .....	121

Prancha XI. Análise histopatológica realizada em baço de camundongos C3H/HeJ inoculados com Pb18, aos 15 dias após a infecção .....	122
Prancha XII. Análise histopatológica realizada em baço de camundongos C3H/HeJ inoculados com Pb18, aos 30 dias após a infecção .....	124
Figura 35. Respostas em reações de HTT em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia .....	127
Figura 36. Quantificação de fungos viáveis em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia .....	130
Figura 37. Determinação da concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia .....	131
Figura 38. Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia .....	133
Figura 39. Determinação da concentração de IL-12 em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia .....	134
Figura 40. Determinação da concentração de IFN- $\gamma$ em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia .....	135

Prancha XIII. Análise histopatológica realizada em baço e epiploon de camundongos C3H/HeJ infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 7 dias após a infecção .....	138
Prancha XIV. Análise histopatológica realizada em fígado e pulmão de camundongos C3H/HeJ infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 7 dias após a infecção .....	139
Prancha XV. Análise histopatológica realizada em baço e epiploon de camundongos C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 7 dias após a infecção .....	140
Prancha XVI. Análise histopatológica realizada em fígado de camundongos C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 7 dias após a infecção .....	141
Prancha XVII. Análise histopatológica realizada em baço, epiploon e fígado de camundongos C3H/HeJ infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 15 dias após a infecção .....	142
Prancha XVIII. Análise histopatológica realizada em baço, epiploon e fígado de camundongos C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 15 dias após a infecção .....	143
Prancha XIX. Análise histopatológica realizada em baço e epiploon de camundongos C3H/HeJ infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 30 dias após a infecção .....	145

## LISTA DE TABELAS

Tabela I. Exame anátomo-patológico em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias após a infecção .....	63
Tabela II. Análise semiquantitativa de <i>P. brasiliensis</i> de diferentes aspectos morfológicos em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata em camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não ao tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia .....	70
Tabela III. Perfis leucocitários de camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia .....	74
Tabela IV. Exame anátomo-patológico em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção .....	87
Tabela V. Análise semiquantitativa de <i>P. brasiliensis</i> de diferentes aspectos morfológicos em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata em camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não ao tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia .....	92
Tabela VI. Perfis leucocitários de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 .....	108
Tabela VII. Exame anátomo-patológico realizado aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias após a infecção em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 .....	120

Tabela VIII. Análise semiquantitativa de <i>P. brasiliensis</i> de diferentes aspectos morfológicos em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata, em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18 .....	125
Tabela IX. Perfis leucocitários de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5mg L-AmB/kg/dia .....	128
Tabela X. Exame anátomo-patológico realizado camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5mg L-AmB/kg/dia .....	136
Tabela XI. Análise semiquantitativa de <i>P. brasiliensis</i> de diferentes aspectos morfológicos em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata, em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia .....	146

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS - *2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiaoline-6-sulfonic acid) diammonium salt*
- Ad - aderência das vísceras ao peritônio e entre si
- AP-1 - proteína ativadora 1
- Bas - basófilos
- BHI - *brain heart infusion*
- BSA - albumina sérica bovina
- c-AmB - anfotericina B convencional
- CD - *cluster of differentiation*
- CP - comprometimento do peritônio (presença de focos fúngicos na serosa)
- CLRs - receptores de lectina do tipo C
- ELISA - ensaio imunossorvente ligado à enzima
- EM - esplenomegalia
- Eos - eosinófilos
- GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - ácido sulfúrico
- HE - hematoxilina-eosina
- HEp - hiperplasia do epiploon
- HM - hepatomegalia
- hsp - proteína de choque térmico
- HTT - hipersensibilidade do tipo tardio
- IDO - indoleamina 2,3-dioxigenase
- IFN- $\gamma$  - interferon gama
- IgA - imunoglobulina A
- IgG - imunoglobulina G
- IgG1 - imunoglobulina G1
- IgG2a - imunoglobulina G2a
- IgG2b - imunoglobulina G2b

IgG3 - imunoglobulina G3  
IgM - imunoglobulina M  
IL-1 - interleucina-1  
IL-1 $\alpha$  - interleucina-1 alfa  
IL-1 $\beta$  - interleucina-1 beta  
IL-2 - interleucina-2  
IL-4 - interleucina-4  
IL-5 - interleucina-5  
IL-6 - interleucina-6  
IL-10 - interleucina-10  
IL-12 - interleucina-12  
iNOS - forma indutível da enzima óxido nítrico sintase  
LAI - lesão peritoneal em área condizente com a inoculação de AmB  
L-AmB - anfotericina B lipossomal  
Le - leucócitos  
LPS - lipopolissacarídeo  
LRR - repetições ricas em leucina  
Ly - linfócitos  
M - monócitos  
MEC - matriz extracelular  
MHC - complexo de histocompatibilidade principal  
MIP-2 - proteína inflamatória de macrófagos 2  
MyD88 - fator de diferenciação mielóide 88  
NE - necrose esplênica  
NEED - N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina  
NF- $\kappa$ B - fator nuclear kappa B  
NO - óxido nítrico  
NOD-like - proteínas *nucleotide-binding oligomerization domain-like*  
NOS - óxido nítrico sintase  
OPD - ortofenilenediamina  
Pb18 - isolado 18, altamente virulento, do *Paracoccidioides brasiliensis*  
PBS - salina tamponada com fosfato

PCM - paracoccidioidomicose  
PMA - forbol 12-miristato 13-acetato  
PMNi - neutrófilos imaturos  
PMNm - neutrófilos maduros  
Pn - pneumonia  
PRR - receptores de reconhecimento de padrões  
SFB - soro fetal bovino  
TCB - tampão carbonato-bicarbonato  
TGF- $\beta$  - fator de crescimento tumoral beta  
Th1 - T *helper* 1  
Th2 - T *helper* 2  
TIR - receptor *Toll*/IL-1  
TLR - receptor *Toll-like*  
TLR2 - receptor *Toll-like* 2  
TLR4 - receptor *Toll-like* 4  
TLR6 - receptor *Toll-like* 6  
TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa  
UFC - unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	29
<b>1.1 O modelo murino experimental da paracoccidioidomicose</b> .....	29
<b>1.2 A terapia anti-<i>P. brasiliensis</i></b> .....	34
<b>1.3 Receptores <i>Toll-like</i> e seu papel em infecções fúngicas</b> .....	36
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	39
<b>2.1 Objetivos Gerais</b> .....	39
<b>2.2 Objetivos Específicos e Justificativa</b> .....	39
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
<b>3.1 Infecção dos animais</b> .....	41
<b>3.2 Terapia antifúngica</b> .....	41
<b>3.3 Pesagem dos animais</b> .....	42
<b>3.4 Contagem total e diferencial de leucócitos</b> .....	42
<b>3.5 Determinação de hipersensibilidade do tipo tardio</b> .....	43
<b>3.6 Quantificação de unidades formadoras de colônias</b> .....	43
<b>3.7 Obtenção e cultivo de neutrófilos e macrófagos de cavidade peritoneal</b> .....	44
<b>3.8 Determinação da liberação de óxido nítrico</b> .....	45
<b>3.9 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio</b> .....	46
<b>3.10 Determinação da concentração de citocinas</b> .....	47
<b>3.11 Titulação de anticorpos</b> .....	49
<b>3.12 Análise anátomo-patológica e coleta de material para histopatologia</b> .....	50
<b>3.13 Análise histopatológica</b> .....	51
<b>3.14 Forma de análise dos resultados</b> .....	52
<b>4 RESULTADOS</b> .....	53
<b>4.1 Efeitos da administração de anfotericina B convencional a camundongos suscetíveis infectados com Pb18</b> .....	53

<b>4.2 Efeitos da administração de anfotericina B lipossomal a camundongos suscetíveis infectados com Pb18 .....</b>	<b>72</b>
<b>4.3 Determinação da capacidade fungicida e do estado de ativação de fagócitos peritoneais de camundongos suscetíveis infectados com Pb18 e expostos ou não a diferentes doses de anfotericina B lipossomal .....</b>	<b>93</b>
<b>4.4 Estudo do papel do receptor <i>Toll-like 4</i> na paracoccidioidomicose murina .....</b>	<b>104</b>
<b>4.5 Efeitos da administração de anfotericina B lipossomal a camundongos deficientes ou não quanto à expressão do receptor <i>Toll-like 4</i> infectados com Pb18 .....</b>	<b>126</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>147</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>161</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>162</b>

## **1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 O modelo murino experimental da paracoccidiodomicose**

A paracoccidiodomicose (PCM), causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina (Wanke e Londero, 1994). Suas formas clínicas vão da infecção benigna e autolimitante à doença progressiva, grave e por vezes fatal. Os órgãos mais afetados são os pulmões, os linfonodos, as membranas mucosas do trato digestório superior e do trato respiratório, as adrenais, o fígado e a pele. Porém, felizmente, grande parte dos indivíduos infectados por este patógeno permanece assintomática (Mendes, 1994). O estabelecimento, a disseminação e a gravidade da doença são dependentes não apenas de fatores ligados ao fungo, como virulência e composição antigênica, mas também da resposta imune do hospedeiro. Assim, nos pacientes com PCM, as formas graves da doença são acompanhadas pela perda gradual de respostas imunes celulares específicas e por altos títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis*; já formas clínicas mais brandas, tendendo à cura, estão associadas a respostas celulares preservadas e baixos níveis de anticorpos específicos (Franco e Montenegro, 2000).

Para o estabelecimento do modelo experimental da PCM, o comportamento de diversas linhagens murinas isogênicas frente ao fungo foi estudado. Perfis polares de suscetibilidade e resistência foram encontrados, respectivamente, em camundongos B10.A e A/J (Calich et al., 1985). Em animais suscetíveis, há predominância de respostas imunes humorais; por outro lado, nos indivíduos resistentes, a imunidade celular, que conduz à resolução do processo infeccioso, é predominante. Neste modelo, não há o desenvolvimento de perfis T *helper* (Th) 1/Th2 inteiramente polarizados, embora a secreção de interleucina (IL)-12 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) seja considerada fundamental para a proteção contra o fungo e as maiores produções de IL-10 e fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) estejam ligadas à suscetibilidade ao patógeno. Camundongos resistentes apresentam ativação equilibrada e progressiva

de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, produção contínua de IFN- $\gamma$ , manutenção de respostas em reações de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT), secreção de imunoglobulina (Ig) G2a e ativação eficiente de macrófagos, com controle da multiplicação fúngica e resolução do processo infeccioso. Já indivíduos suscetíveis apresentam ativação mais intensa e precoce de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, baixa produção de IFN- $\gamma$  e alta secreção de IL-5 e IL-10, eosinofilia, produção preferencial de IgG1 e IgG2b, desenvolvimento progressivo de anergia em reações de HTT e ativação reduzida de macrófagos, o que leva ao estabelecimento de doença progressiva (Arruda et al., 2004). Em modelo pulmonar de PCM, ao estudarem o papel das subpopulações de linfócitos T em camundongos resistentes e suscetíveis ao patógeno, (Chiarella et al., 2007) relataram que, independentemente do padrão de suscetibilidade do hospedeiro, as células T CD8<sup>+</sup> são responsáveis, em grande parte, pelo controle da carga fúngica, enquanto a produção de anticorpos e as respostas em reações de HTT são reguladas por linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Ainda segundo estes autores, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel protetor nos animais resistentes, sendo depletados ou anérgicos nos indivíduos suscetíveis; além disso, a resistência genética à infecção está associada à imunidade mediada por ambas as populações linfocitárias, que secretam citocinas de tipo 1 ou 2.

As citocinas desempenham papéis importantes na defesa contra infecções fúngicas, uma vez que estabelecem e direcionam a resposta imune do hospedeiro. O IFN- $\gamma$ , sintetizado por linfócitos T e células NK, é um potente ativador de macrófagos. Além disso, esta citocina modula a expressão das moléculas de histocompatibilidade principal (MHC), ativa as células NK, induz a síntese de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e de óxido nítrico sintase (NOS), regula a produção do isótipo IgG e apresenta importantes propriedades imunomoduladoras e antivirais (De Mayer e De Mayer-Guignard, 1998). Como mencionado, a resistência, na PCM murina, é acompanhada pela produção de níveis constantes de IFN- $\gamma$  desde a fase inicial da infecção (Kashino et al., 2000). No modelo pulmonar de PCM murina, a depleção desta citocina agrava a infecção, por levar à

destruição da arquitetura do órgão, à maior disseminação do fungo e à anergia em reações de HTT (Cano et al., 1998). O efeito antifúngico de neutrófilos anti-*P. brasiliensis* é aumentado pela adição de IFN- $\gamma$ , *in vitro* e *in vivo* (Brummer et al., 1993); *in vitro*, foi também demonstrado que neutrófilos humanos tratados com esta citocina apresentam ação fungicida contra leveduras de *P. brasiliensis*, enquanto a ação de células não tratadas é apenas fungistática (Kurita et al., 1999). Em macrófagos, o IFN- $\gamma$  aumenta a resposta celular contra fungos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Casadevall e Pirofski, 2001). Macrófagos peritoneais ou pulmonares murinos, ou mesmo monócitos e macrófagos humanos, quando tratados com IFN- $\gamma$ , são capazes de inibir a replicação de *P. brasiliensis*, enquanto macrófagos peritoneais residentes, embora fagocitem as leveduras do fungo, não são capazes de matá-las; esta inibição pode ser abolida pela adição de anticorpos anti-IFN- $\gamma$  (Brummer et al., 1993; Moscardi-Bacchi et al., 1994). A IL-12, sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos desempenha um importante papel na ligação entre a imunidade inata e a adaptativa. Atuando de forma sinérgica com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a IL-2, a IL-12 induz a secreção de IFN- $\gamma$  em células *natural killers*, aumentando sua atividade citotóxica, bem como a de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Além disso, a IL-12 induz a diferenciação de linfócitos T *naïve* em Th1, que caracteristicamente secretam IFN- $\gamma$  e IL-2 (Chizzonite et al., 1999). Na PCM experimental, camundongos resistentes e suscetíveis ao fungo sintetizam esta citocina em concentrações relativamente baixas até a 4<sup>a</sup> semana de infecção; já aos 120 dias, esta produção é maior. No entanto, não foram observadas diferenças significativas quanto à secreção de IL-12 entre as duas linhagens murinas (Pina et al., 2006). Porém, a administração de IL-12 recombinante a camundongos suscetíveis diminuiu a disseminação do fungo, aumentou a infiltração de células mononucleares nos pulmões (onde se localizam os focos primários da doença quando a inoculação do fungo é feita pela via intratraqueal) e elevou os níveis de IFN- $\gamma$  e a relação entre as citocinas de perfil Th1 e Th2, o que lhe confere um papel protetor anti-*P. brasiliensis*

(Arruda et al., 2002). Empregando camundongos IL-12p40 *knock-out* e *wild-type* infectados com leveduras de Pb18 pela via intravenosa, (Livonesi et al., 2008) observaram que os indivíduos deficientes não controlam a proliferação e a disseminação do patógeno, sucumbindo no 21º dia de doença. Estes animais apresentam maior número de granulomas por milímetro quadrado de tecido pulmonar; estas lesões são desorganizadas e possuem grande quantidade de leveduras. Além disso, os camundongos IL-12p40 *knock-out* não liberam níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , mas produzem altos níveis de IL-10 e IgG1; assim, sugere-se que a IL-12p40 medeia a resistência à infecção paracoccidioidomicótica, por induzir a secreção de IFN- $\gamma$  e o estabelecimento de respostas Th1. A IL-15, produzida por diversas populações celulares, incluindo macrófagos, aumenta a morte de leveduras de *P. brasiliensis* mediada por neutrófilos humanos, por um mecanismo dependente, ao menos em parte, do metabolismo oxidativo (Tavian et al., 2008). A via Th17, recentemente descrita, pode ser responsável, nas infecções fúngicas, pela inflamação já atribuída ao descontrole de respostas Th1. A habilidade dos linfócitos T reguladores em inibir aspectos da imunidade antifúngica inata e adaptativa, incluindo o antagonismo funcional de Th17, é necessária para a tolerância protetora aos fungos; catabólitos derivados daIDO e do triptofano contribuem para tal homeostase, fornecendo aos hospedeiros os mecanismos imunológicos de defesa adequados à proteção, mas sem, necessariamente, eliminar os patógenos (o que prejudicaria o estabelecimento da memória imunológica) ou causar dano tecido em nível inaceitável (Romani e Puccetti, 2007). Infelizmente, até o momento, não há relatos, na literatura, acerca do papel desta via na PCM. O TNF- $\alpha$ , produzido por muitas populações celulares (principalmente monócitos e macrófagos), integra o grupo das proteínas de fase aguda. Esta citocina atua em diversos fenômenos fisiológicos e patológicos, como a ativação de monócitos e macrófagos, a citotoxicidade, o crescimento de linfócitos T e B, a síntese de outras citocinas (como a IL-1, a IL-6 e a IL-8) e o desenvolvimento de granulomas organizados (Beyart e Fiers, 1998). Esta

molécula, em camundongos BALB/c infectados com conídias de *P. brasiliensis*, aparece em altas concentrações nos pulmões nos primeiros 4 dias de infecção, juntamente com IL-1, IL-6 e proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 2 (González et al., 2003). A citocina fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) é, assim como o TNF- $\alpha$ , produzida por muitas populações celulares, incluindo os linfócitos T e B, os monócitos, os mastócitos e os fibroblastos. O GM-CSF é um importante ativador de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Além disso, sua ação sobre progenitores celulares presentes na medula óssea leva ao desenvolvimento não apenas desta população celular, como também de neutrófilos, células igualmente imprescindíveis para o sucesso da defesa do hospedeiro contra fungos (Devereux e Linch, 1998). O GM-CSF aumenta a atividade antimicrobiana de neutrófilos e monócitos; *in vitro*, a adição da citocina a culturas destas células acentua sua atividade fungicida contra *Candida albicans*. Tais observações foram confirmadas *in vivo*: em humanos e em diversos modelos animais, a administração de GM-CSF recombinante aumenta o número de neutrófilos e monócitos e, em camundongos imunossuprimidos infectados com *C. albicans*, esta terapia reduz a carga fúngica e a mortalidade dos animais (Roilides e Walsh, 2004). Neutrófilos humanos ativados com GM-CSF apresentam significativa atividade fungicida contra *P. brasiliensis*, mediada por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ânion superóxido (Rodrigues et al., 2007).

Além das citocinas, os produtos do metabolismo intermediário do nitrogênio e do oxigênio são fundamentais para a morte de patógenos intracelulares. O óxido nítrico (NO) é produzido principalmente por macrófagos e neutrófilos a partir da L-arginina, sob a ação da forma induzida da enzima NO sintase (iNOS) (Campbell et al., 1994). Embora sua produção esteja envolvida na morte de *P. brasiliensis*, sabe-se que altos níveis de NO são imunossupressores (Nascimento et al., 2002), já que inibem a linfoproliferação, a produção de TNF- $\alpha$  e a expressão de moléculas do MHC de classe II. De acordo com (Livonesi et al., 2009,

prelo), que estudaram a progressão da infecção paracoccidioidomicótica de disseminação hematogênica em camundongos iNOS *knock out* e *wild-type*, esta enzima é um fator de resistência, por controlar a proliferação fúngica, influenciar a síntese de citocinas e participar do desenvolvimento de uma potente resposta inflamatória. Já o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é liberado em maiores concentrações por macrófagos e neutrófilos de animais resistentes à PCM, que apresentam maior atividade fungicida do que as células de camundongos suscetíveis (Teixeira, 1991; Cano et al., 1995; Meloni-Bruneri et al., 1996).

## **1.2 A terapia anti-*P. brasiliensis***

O tratamento da PCM é composto por uma fase inicial, que deve persistir até o desaparecimento da sintomatologia e a observação de uma diminuição acentuada nos níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* (o que geralmente não ocorre antes de 2 a 6 meses de terapia contínua) e de uma fase de manutenção, que deve ser iniciada quando os testes sorológicos se tornarem negativos e continuar por pelo menos 12 meses. Dentre as drogas antifúngicas empregadas na terapêutica da PCM, a anfotericina B é ainda considerada o *golden standard*. Descoberta nos anos 1950, esta droga liga-se ao ergosterol da membrana celular, desfazendo sua integridade e levando ao extravazamento do conteúdo citoplasmático e, conseqüentemente, à morte do fungo (Mendes et al., 1994). Porém, seu uso é muitas vezes inviabilizado pela ocorrência de graves efeitos colaterais, em especial de nefrotoxicidade. Mais recentemente, foram desenvolvidas formulações da droga que não causam tais reações; dentre elas, destaca-se a anfotericina B lipossomal (L-AmB), que apresenta eficácia similar ou superior à droga convencional (c-AmB) mas que, mesmo em altas doses, é mais segura (Viviani et al., 1998; Johnson et al., 2002; Walsh et al., 1998).

Estas duas formas da droga apresentam algumas particularidades funcionais. Observou-se que a c-AmB, mas não L-AmB, diminui a proliferação de linfócitos T e B de camundongos imunocompetentes

(Schindler et al., 1993). A droga convencional também é capaz de inibir completamente a indução de transglutaminase, um marcador de diferenciação de macrófagos, e a produção de ânion superóxido por estas células. Além de não ter produzido tais efeitos, a L-AmB não afetou as respostas blastogênicas de células T, que foram inibidas por altas concentrações da droga não lipossomal (Mehta et al., 1985). Portanto, a inclusão do fármaco em lipossomas não apenas previne seus efeitos imunossupressores como também pode levar a eventos estimuladores. Atualmente, credita-se tal efeito modulador à interação da droga com o receptor *Toll-like* (TLR) 4, o que ativa as populações fagocitárias de forma mais eficiente e, assim, otimiza a atividade antifúngica (Sau et al., 2003; Bellocchio et al., 2005). Além disso, na última década, foi estabelecido o consenso de que os mecanismos microbicidas de fagócitos, em especial os produtos do metabolismo oxidativo do oxigênio e do nitrogênio, podem interagir de maneira sinérgica com antibióticos, via mecanismos diretos ou regulados por citocinas (Labro, 2000). Patógenos que sofrem desestabilização da membrana celular, como os expostos a L-AmB, podem ser mais suscetíveis a tais produtos oxidativos, mesmo em quantidades normais (Labro, 2000; Roilides et al., 1999). Neutrófilos e L-AmB atuam de forma sinérgica na indução de danos às hifas de *Rhizopus microsporus* (Simitsopoulou et al., 2008). Quatro diferentes formulações lipídicas de anfotericina B (deoxicolato, L-AmB, dispersão coloidal e complexo lipídico) aumentam, em graus variáveis, os danos às hifas de *A. fumigatus* e *Fusarium solani* mediados por neutrófilos e monócitos humanos; uma vez que tal fenômeno não é acompanhado por elevações significativas na produção de  $O_2^-$ , sugere-se que outros mecanismos da imunidade inata, talvez não-oxidativos, sejam responsáveis pelos efeitos observados (Dotis et al., 2008). Demonstrou-se também a interação entre a L-AmB e o TLR4 pode estimular macrófagos, influenciando positivamente a imunidade desenvolvida (Sau et al., 2003). Em camundongos, a L-AmB aumenta a atividade fungicida destas células (Meier et al., 2003), sendo inclusive descrita como um fator ativador desta população, por aumentar sua

atividade fungicida (Mehta et al., 1985; Mehta et al., 1997), bem como a produção de TNF- $\alpha$  (Louie et al., 1994). Em um modelo murino de aspergilose, a incubação de neutrófilos com L-AmB faz com que estas células sejam ativadas a um estado antifúngico por mudança de sinalização de TLR2 para TLR4, o que se reflete em otimização da eficácia da terapia (Bellocchio et al., 2005); relata-se também que neutrófilos expostos a esta droga matam *Aspergillus fumigatus* de maneira mais eficiente (Roilides et al., 2002).

### **1.3 Receptores *Toll-like* e seu papel em infecções fúngicas**

Logo após a descoberta, em *Drosophila* spp, do papel protetor do receptor *Toll* na defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas, um homólogo deste receptor foi identificado em mamíferos. Em pouco tempo, diversas proteínas de estruturas similares ao receptor *Toll* foram identificadas e denominadas coletivamente de TLR. Os TLR pertencem a uma categoria de receptores genericamente denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRR), a qual também pertencem os receptores para manose, glicana e proteínas do sistema complemento (CD11c/CD18 e CD11b/CD18), as proteínas *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like* e os receptores de lectina do tipo C (CLRs) (Takeda et al., 2003 e Calich et al., 2008); estes receptores reconhecem padrões moleculares conservados de patógenos e têm como principais funções a opsonização, a ativação do sistema complemento e de cascatas de coagulação, a fagocitose, a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e a indução de apoptose. Apesar de serem encontrados em diversas populações celulares, os TLR são expressos, principalmente, fagócitos, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Tal descoberta revelou que a imunidade inata desempenha um importante papel na detecção de patógenos invasores; além disso, verificou-se que os TLR regulam a ativação tanto da imunidade inata quanto da adaptativa (Takeda et al., 2003 e Akira et al., 2006).

Até o momento, foram identificados 13 membros da família TLR em camundongos, caracterizados por possuírem um domínio extracelular rico em leucina [*leucine-rich repeat*, repetições ricas em leucina (LRR)], que se liga diretamente aos PRRs, e um domínio intracelular com grande homologia com a região citoplasmática do receptor da IL-1, chamado receptor *Toll*/IL-1 (TIR), responsável pela transdução do sinal gerado pelo engajamento da porção LRR a seu ligante específico. Após esta interação, inicia-se uma cascata de sinalização que culmina na ativação dos fatores de transcrição fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e proteína ativadora 1 (AP-1); conseqüentemente, ocorre a transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Zhang et al., 2004; Medzhitov, 2001, Takeda et al., 2003 e Takeda e Akira, 2005).

Juntamente com seu co-receptor CD14, o TLR4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS; produto derivado de bactérias Gram-negativas), algumas proteínas de choque térmico, como as hsp60 e 70, o fibrinogênio e a glucuronoxilomanana, o principal componente da cápsula de *Cryptococcus neoformans* (Mambula et al., 2002; Takeda et al., 2003). Na aspergilose, foi verificado que o TLR4, assim como o TLR2, é essencial para a ativação de macrófagos murinos pelo fungo (Meier et al., 2003). Além disso, observou-se que apenas a conídia, mas não a hifa, de *A. fumigatus*, estimula o TLR4, caracterizando um novo mecanismo de escape deste patógeno das defesas do hospedeiro (Netea et al., 2003). Nas infecções por *C. albicans*, foi postulado o envolvimento da molécula adaptadora MyD88, participante da cascata de sinalização desencadeada pela ligação ao TLR, na fagocitose e morte do fungo (Marr et al., 2003). Em um modelo de disseminação hematogênica, (González et al., 2008) mostraram que a resposta ao *P. brasiliensis* independe não apenas de MyD88, com também de TLR2, TLR4 e dectina 1. Foi também verificado que a fosfolipomanana, um glicolípido de membrana expresso unicamente em *C. albicans*, liga-se principalmente a TLR2, mas também a TLR4 e TLR6 (Jouault et al., 2003). Nas infecções por *C. neoformans*, a carga fúngica isolada de camundongos TLR4<sup>-/-</sup> é muito maior do que a

observada em controles *wild-type*, sem que haja alteração na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por macrófagos ou na atividade fungicida de macrófagos e neutrófilos; porém, há diminuição na produção macrofágica de quimiocinas, o que reduz o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção (Netea et al., 2002).

Os mecanismos moleculares que medeiam o reconhecimento do *P. brasiliensis* pelas células do sistema imune inato ainda não foram bem caracterizados (Calich et al., 2008). Embora (González et al., 2008) não tenham encontrado evidências de que a imunidade a este patógeno dependa de TLR2, TLR4, MyD88 e dectina 1, como anteriormente mencionado, Loures (2007) sugere, a partir de resultados obtidos em modelo *ex vivo*, empregando macrófagos, que o *P. brasiliensis* utiliza TLR2 e TLR4 para adentrar estas células e, assim, infectar o hospedeiro, configurando um mecanismo patogênico que garantiria sua multiplicação. No início do desenvolvimento do modelo murino experimental da PCM, foi demonstrado que camundongos da linhagem C3H/HeJ são resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis*. Porém, à época, esta linhagem de camundongos era reconhecida apenas como hiporresponsiva ao LPS; hoje, sabe-se que estes animais são naturalmente deficientes na expressão de TLR4 (Hoshino et al., 1999). A resistência foi determinada em análises de sobrevivência de camundongos C3H/HeJ infectados com o isolado virulento Pb18 do *P. brasiliensis*. Animais da linhagem coisogênica C3Heb/Fe, responsivos ao LPS, foram caracterizados como suscetíveis, por apresentarem sobrevivência cerca de 40 dias menor do que C3H/HeJ (Calich et al., 1985). Porém, a resistência ou suscetibilidade apresentada por estas duas linhagens é intermediária, sendo classificados como realmente resistentes e suscetíveis os animais A/SN e A/J e B10.A, respectivamente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração de anfotericina B na PCM experimental, empregando camundongos isogênicos infectados com o isolado de alta virulência do *P. brasiliensis* (Pb18).

### 2.2 Objetivos Específicos e Justificativa

2.2.A Avaliação dos efeitos da administração de anfotericina B sobre parâmetros imunológicos e micológicos apresentados por camundongos suscetíveis à PCM, da linhagem B10.A, infectados com o isolado Pb18 e submetidos ao tratamento com a forma convencional (c-AmB) ou lipossomal (L-AmB) da droga. Para determinação da reversão do padrão de suscetibilidade para o de resistência por ação da terapia antifúngica, analisamos:

- a) o peso corpóreo dos animais
- b) a contagem total e diferencial de leucócitos
- c) as respostas em reações de HTT
- d) a carga fúngica em baço, epiploon, fígado e pulmão
- e) as concentrações de NO em sobrenadantes dos órgãos supra-mencionados
- f) as concentrações de citocinas de perfis Th1 e Th2 em sobrenadantes dos órgãos supra-mencionados
- g) os títulos de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*
- h) as lesões anátomo-patológicas
- i) as lesões histopatológicas

2.2.B. Avaliação de neutrófilos e macrófagos peritoneais de camundongos B10.A co-cultivados com leveduras de Pb18, na presença ou não de L-

AmB, para verificação da presença de efeitos moduladores do fármaco sobre a função fagocitária anti-*P. brasiliensis*. Para tanto, analisamos:

- a) a capacidade fungicida de ambas as populações celulares em diferentes tempos de incubação
- b) a produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e citocinas por estas células

2.2.C. Avaliação do papel de TLR4 na infecção paracoccidiodomicótica murina, empregando camundongos deficientes ou não quanto à expressão do receptor (respectivamente, das linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas) inoculados com Pb18, nas fases inicial e tardia da doença (7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias). Para tanto, analisamos os mesmos parâmetros utilizados na avaliação dos efeitos da administração de drogas antifúngicas em indivíduos suscetíveis.

2.2.D. Avaliação dos efeitos da administração de L-AmB a camundongos deficientes ou não quanto à expressão de TLR4, dados o melhor desempenho de L-AmB em relação à c-AmB em nosso modelo experimental (como será visto adiante) e o possível envolvimento da interação TLR4-L-AmB neste fenômeno. Neste estudo, analisamos os parâmetros utilizados na caracterização do papel do receptor na infecção paracoccidiodomicótica murina.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Infecção dos animais

Camundongos fêmeas das linhagens B10.A [suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* (Calich et al., 1985)], C3H/HeJ e C3H/HePas (respectivamente TLR4-deficientes e suficientes), com idade entre 7 e 10 semanas, foram utilizados neste estudo. Os animais foram adquiridos do Biotério de Criação de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia (ICB-USP) e mantidos no Biotério de Experimentação deste mesmo Departamento. Todos os protocolos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do referido Instituto, sob número 224/02.

Os animais foram infectados com o isolado altamente virulento Pb18 de *P. brasiliensis* (Singer-Vermes et al., 1989), recentemente reisolado após uma passagem *in vivo*, o que previne a perda de patogenicidade. O fungo, proveniente da Micoteca do Laboratório de Imunopatologia das Micoses, foi cultivado em meio de cultura Fava Netto (Fava Netto, 1955) a 35 °C por 7 dias. As células leveduriformes foram lavadas com solução salina a 0,85% estéril e uma suspensão fúngica com concentração de  $10 \times 10^6$  leveduras/mL e viabilidade superior a 80% foi preparada. A inoculação foi feita pela via intraperitoneal com 0,5 mL da suspensão obtida, que contém cinco milhões de leveduras de *P. brasiliensis*.

#### 3.2 Terapia antifúngica

A administração de c-AmB ou L-AmB foi iniciada 24 horas antes da infecção. As concentrações de droga empregadas foram definidas de acordo com o peso médio dos animais, de cerca de 20 gramas, verificado por pesagens prévias à infecção.

Doses de 2 mg c-AmB/kg/dia (Fungizon<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb, São Paulo, SP, Brasil) e de 5 mg L-AmB/kg/dia (AmBiSome<sup>®</sup>, Gilead Sciences, Inc., Foster City, EUA), determinadas como ideais no modelo murino isogênico da paracoccidiodomicose em estudos preliminares, foram

administradas, por via intraperitoneal, aos camundongos B10.A. Nos estudos empregando camundongos das linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas, foi utilizada a dose de 2,5 mg L-AmB/kg/dia. Para diluição da droga, foram seguidos os protocolos determinados pelos respectivos fabricantes; a c-AmB foi diluída em um volume de 0,5 mL de solução em H<sub>2</sub>O destilada estéril. Uma solução-mãe, contendo 4 mg de L-AmB por mililitro, foi preparada em H<sub>2</sub>O destilada estéril e, a cada dia de tratamento, foi diluída em H<sub>2</sub>O destilada estéril contendo 5% de dextrose (Difco, 0155-17-4, BD Diagnostics, Sparks, EUA), para obtenção da solução-uso, que contendo 0,5 mg L-AmB por mililitro. Especial atenção foi dada às diluições de droga, assegurando que as soluções utilizadas para administração contivessem a concentração correta dos sais e não das formulações comerciais, que contém excipientes.

O tratamento foi realizado em dias alternados, três vezes por semana (o que mantém os níveis séricos do fármaco de ambas as formulações no patamar ideal) e foi mantido até o sacrifício dos animais.

### **3.3 Pesagem dos animais**

Os camundongos anestesiados com 20 mg/kg da associação tiletamina-zolazepam (Zoletil<sup>®</sup>, Virbac, São Paulo, SP, Brasil) pela via intramuscular (Fantoni e Cortopassi, 1996), foram pesados em balança digital (modelo AS 500, Marte, São Paulo, SP, Brasil), antes da infecção e em diferentes tempos após a inoculação.

### **3.4 Contagem total e diferencial de leucócitos**

Amostras de sangue periférico foram coletadas através do plexo ocular, utilizando capilares heparinizados. Para a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer, 10 µL de sangue foram diluídos em 90 µL de Turk [composto por 1 mL de ácido acético glacial (Synth, A1019.01.B, Diadema, SP, Brasil), 1 mL de azul de metileno a 1% (Merck, 9203, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 mL]. Para a contagem diferencial, foram preparados esfregaços que, após secagem ao ar, foram corados

pelo método panótico (Bio-Cor<sup>®</sup>, Bioshop, Goiânia, GO, Brasil). Cem células foram contadas, identificando linfócitos, neutrófilos maduros, neutrófilos imaturos, basófilos, monócitos e eosinófilos; os resultados obtidos em porcentagem foram transformados em números de células por milímetros cúbicos com base na contagem total de leucócitos.

### **3.5 Determinação de hipersensibilidade do tipo tardio**

Respostas em reações de HTT contra o antígeno Fava Netto (Fava Netto et al., 1969) foram avaliadas durante o curso da infecção, com o intuito de verificar a integridade da imunidade celular desenvolvida pelos animais. Após a anestesia, realizada como já descrito, foram injetados, por via intradérmica, 25 µL de solução antigênica entre os coxins plantares do membro posterior esquerdo de cada camundongo. A espessura da pata foi medida imediatamente antes e 24 horas após a inoculação do antígeno, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo Corporation, Tóquio, Japão); a diferença entre estas espessuras foi determinada e expressa em milímetros (Fazioli et al., 1994).

### **3.6 Quantificação de unidades formadoras de colônias**

A quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC), que permitem determinar o número de *P. brasiliensis* viáveis isolados de um animal infectado, foi realizada para avaliar a gravidade da doença. Os animais foram anestesiados como anteriormente descrito, exsanguinados pelo plexo axilar e sacrificados por meio de deslocamento cervical. O soro obtido foi aliquoteado e resfriado a -20 °C, para posterior titulação de anticorpos circulantes. Baço, epíplon, fígado e pulmão de cada animal foram assepticamente retirados, pesados e homogeneizados em *potters* contendo 5 mL de salina tamponada com fosfato (PBS). O macerado obtido de cada órgão foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi recolhido, aliquoteado em volumes de cerca de 2 mL e congelado a -70 °C para utilização em ensaios de ELISA (ensaio imunossorvente ligado à enzima) para quantificação de citocinas e em

determinações da concentração de NO. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de PBS e semeado em meio *brain heart infusion* (BHI) enriquecido. As placas foram incubadas a 37 °C e o crescimento das colônias foi acompanhado por um período de 15 dias, sendo o resultado expresso em log UFC por grama de tecido (Singer-Vermes et al., 1992).

### **3.7 Obtenção e cultivo de neutrófilos e macrófagos de cavidade peritoneal**

Após 24 horas de infecção, os camundongos foram anestesiados, exsanguinados e sacrificados por meio de deslocamento cervical. O peritônio foi exposto e uma alíquota de 5 mL de meio RPMI estéril (*HyQ RPMI-1640 without L-glutamine*, HyClone, SH30096.02, Logan, EUA) foi injetada na cavidade peritoneal; após uma leve massagem no abdômen, o lavado peritoneal foi retirado. Este procedimento foi realizado duas vezes. O material obtido foi então centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C; o sobrenadante foi armazenado a -70 °C para determinação da concentração de NO e de citocinas. O precipitado foi ressuspenso em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Sigma, F-2442, St Louis, EUA), além de 63 mg penicilina G (Sigma, P-7794) e 100 mg sulfato de estreptomicina (Sigma, S-6501) (concentrações em cada 100mL de meio). As suspensões celulares foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (*12 well cell culture plate*, Corning, 3506, Corning, EUA) por 2 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). As células aderentes, compostas por macrófagos (mínimo de 95%), foram retiradas por meio de lavagens com PBS resfriado após as placas serem deixadas no gelo por 20 minutos; as células não aderentes, primariamente neutrófilos (mínimo de 95%), foram retiradas por meio de lavagens com meio RPMI suplementado. Após o recolhimento, as células foram centrifugadas novamente e ambas as populações celulares foram contadas e tiveram sua morfologia e viabilidade analisadas após coloração com *trypan blue* 0,2% (Sigma, T-6146) (Bruneri, 1995). Para os co-cultivos de neutrófilos e macrófagos com leveduras de *P. brasiliensis*,

suspensões fúngicas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 30% de soro normal de camundongos [para opsonização das leveduras com o fragmento C3b do sistema complemento, o que facilita a fagocitose do fungo pelas células (Calich et al., 1979)] foram obtidas do isolado Pb18. A concentração desta suspensão foi ajustada segundo as concentrações de neutrófilos ou macrófagos obtidos, de modo que os co-cultivos fossem realizados na proporção de 25 fagócitos por levedura (determinada como ideal na padronização deste ensaio). A L-AmB foi diluída em meio RPMI não suplementado e adicionada à parte das culturas, em diferentes concentrações. Controles, contendo fungo em RPMI na presença ou não de L-AmB, ou apenas neutrófilos ou macrófagos sem adição de leveduras *in vitro*, mas expostos à droga, também foram realizados. Após incubação de neutrófilos por 2, 6 e 18 horas e de macrófagos por 24, 48 e 72 horas, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, o material foi coletado e centrifugado (Bruneri, 1995). Os sobrenadantes foram armazenados a -70 °C para posteriores determinações da concentração de NO e citocinas. Os sedimentos, compostos por fagócitos e fungos, foram ressuspensos a concentrações conhecidas para ensaios de determinação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou na relação 1:10 em H<sub>2</sub>O destilada estéril e semeados, em duplicata, em alíquotas de 100 µL em meio BHI enriquecido (Singer-Vermes et al., 1992). O crescimento das colônias de *P. brasiliensis* foi acompanhado por um período de 15 dias, sendo contado o número de UFC. Os resultados foram expressos em índices de morte do fungo, obtido através da fórmula  $[100 - (\text{UFC experimental}/\text{UFC controle}) \times 100]$ , onde UFC experimental e controle referem-se ao número de *P. brasiliensis* isolados, respectivamente, nos diferentes co-cultivos realizados e nas culturas de fungo em RPMI sem a presença de fagócitos ou L-AmB no mesmo período de tempo.

### **3.8 Determinação da liberação de óxido nítrico**

Neste ensaio, 50 µL de reagente de Griess (solução aquosa contendo sulfonilamida a 1%, N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina [NEED] a

0,1% e ácido fosfórico a 2,5% [reagentes produzidos por Sigma; números de catálogo, respectivamente, S-9251, N-5889 e P-6560]) foram adicionados ao mesmo volume de sobrenadantes de órgão ou de cultivo celular obtidos conforme descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em duplicata e, após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a leitura das densidades ópticas foi realizada em microleitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Fischer, Pittsburgh, EUA), em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em micromoles de nitrito por grama de tecido, comparando-se a densidade óptica obtida com uma curva-padrão contendo concentrações conhecidas de nitrito de sódio (Sigma, 251-4). O limite de detecção do ensaio, em micromoles de nitrito, foi de 0,03 µg/mL (Ding et al., 1990).

### **3.9 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio**

Neutrófilos ou macrófagos, obtidos como já descrito, tiveram sua concentração acertada para  $2 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI suplementado. Alíquotas de 100 µL da suspensão celular foram incubadas por 1 hora com igual volume de tampão vermelho de fenol [composto por cloreto de sódio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio, bicarbonato de potássio (fabricados por Synth), cloreto de cálcio (Merck, 2382), cloreto de magnésio (Reagen, 10060, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), vermelho de fenol (Fisher Scientific, P-74, Fair Lawn, EUA), glicose (Difco, 0155-17-4) e peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma, P-8250)]. Os ensaios foram realizados em octuplicata, sendo que metade das amostras foi tratada com PMA (forbol 12-miristato 13-acetato, Sigma, P-8139). Após 1 hora, a reação foi interrompida através da adição de 10 µL de hidróxido de sódio 1N (Synth). Os resultados, expressos em nanomoles, foram obtidos após a leitura em microleitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Fischer), em comprimento de onda de 620 nm, do branco constituído de vermelho de fenol e hidróxido de sódio, da curva-padrão contendo quantidades conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e das amostras a serem testadas (Pick e Mizel, 1981;

Russo et al., 1989). O limite de detecção do ensaio foi de 5 nm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2 x 10<sup>5</sup> células.

### **3.10 Determinação da concentração de citocinas**

A concentração das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10, IL-5 e GM-CSF foi determinada por testes de ELISA de captura, baseados na utilização de pares de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, um dos quais marcado por biotina. Para a detecção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, foram utilizados *ELISA Development Kits 900-K98, 900-K54 e 900-K97* (Peprotech, Ciudad de Mexico, México); as demais citocinas foram tituladas empregando reagentes fabricados por BD Pharmingen (San Diego, EUA). O uso dos complexos biotina-avidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase permite a determinação da concentração da citocina presente através de medidas de densidade óptica (Coligan et al., 1991).

Os anticorpos primários anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-12 foram diluídos à concentração de 1  $\mu$ g/mL, determinada pelo fabricante, em um diluente composto por PBS acrescido de 0,05% de *Tween-20* (Sigma, P-1379) e 0,1% de albumina sérica bovina (BSA; Sigma, A-2153). A sensibilização das placas de poliestireno (*96 well cell culture cluster flat bottom with low evaporation lid, Costar, Corning, Inc.*) foi feita com 100  $\mu$ L por orifício de anticorpo primário diluído; as placas foram então incubadas à temperatura ambiente por pelo menos 18 horas. Os sítios livres foram bloqueados pela adição de 300  $\mu$ L por orifício de uma solução contendo 1% de BSA em PBS. Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionadas as respectivas citocinas, em diluições seriadas em PBS contendo *Tween-20* e BSA nas concentrações anteriormente mencionadas, em volumes de 100  $\mu$ L por orifício, para obtenção das curvas-padrão. As amostras, puras ou diluídas neste mesmo tampão, foram adicionadas em duplicata aos demais orifícios. A incubação à temperatura ambiente foi realizada por 2 horas; findo este tempo, os anticorpos de detecção, marcados com biotina, foram adicionados aos orifícios. Tais anticorpos foram previamente diluídos às concentrações

determinadas pelo fabricante (0,25 µg/mL para os anticorpos anti-TNF-α e anti-IL-12 e 0,5 µg/mL para o anticorpo anti-IFN-γ). Nova incubação à temperatura ambiente foi realizada por 2 horas e procedeu-se então à adição do conjugado avidina-peroxidase, em alíquotas de 100 µL por orifício, e à incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, 100 µL do substrato cromogênico ABTS [2.2'-azino-bis(3-ethylbenzthiaoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Sigma, A-1888] foram adicionados a cada orifício e as placas foram mantidas ao abrigo da luz. O desenvolvimento de cor foi monitorado a cada 5 minutos por cerca de 1 hora, até que a curva-padrão pudesse ser visualizada. Destaca-se que cada adição de reagente mencionada foi precedida por quatro lavagens das placas com PBS acrescido de 0,05% *Tween-20*. A leitura das densidades ópticas foi realizada em leitor automático (Multiskan EX, Labsystems, Fischer), a 405 nm de comprimento de onda. O limite de detecção deste ensaio foi de 31,25 pg/mL.

Os anticorpos primários anti-GM-CSF, anti-IL-10 e anti-IL-5 (oriundos, respectivamente, dos clones celulares MP1-22E9, JES5-2A5 e TRFK5) foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (TCB, de pH 9,5) e utilizados em alíquotas de 100 µL por orifício para a sensibilização das placas de poliestireno (*96 well cell culture cluster flat bottom with low evaporation lid*, Costar, Corning, Inc.). A concentração empregada de cada anticorpo foi determinada na padronização deste ensaio e foi igual a 2 µg anti-GM-CSF, 5 µg anti-IL-10 e 1 µg anti-IL-5 por mililitro. As placas foram então incubadas por pelo menos 18 horas a 4 °C. O bloqueio dos sítios livres foi feito pela adição de 200 µL por orifício de uma solução de Molico® (Nestlé Brasil Ltda, São José do Rio Preto, SP) a 5% em PBS. Após a incubação por duas horas a 37 °C em câmara úmida, foram adicionadas as respectivas citocinas recombinantes, em diluições seriadas em PBS acrescido de 10% de SFB, em volume de 100 µL por orifício, para obtenção das curvas-padrão. As amostras, puras ou diluídas no mesmo tampão, foram adicionadas em duplicata aos demais orifícios. A incubação a 4 °C foi realizada por um período aproximado de 18 horas. Os

anticorpos secundários, biotinizados, foram adicionados após diluição em PBS acrescido de 10% SFB, em volume de 100 µL para cada orifício. Tais anticorpos, anti-GM-CSF, anti-IL-10 e anti-IL-5, são provenientes dos clones MP1-31G6, SXG-1 e TRFK4 e foram empregados, respectivamente, nas concentrações de 2 µg, 2 µg e 0,5 µg. Após 2 horas à temperatura ambiente, o conjugado estreptavidina-peroxidase, diluído a 1:1.000 em PBS com 0,25% de gelatina (Difco, 0143-01), foi acrescentado e a placa incubada a 37 °C em câmara úmida por 1 hora. Novamente, cada adição de reagente foi precedida por quatro lavagens das placas com PBS acrescido de 0,05% de *Tween 20*. Como substrato, foi utilizada uma solução de ortofenilenodiamina (OPD; Sigma, 78410) em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5, ácido cítrico 0,1M, pH 2,0 e H<sub>2</sub>O destilada, acrescida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, 822287, Schuchardt) imediatamente antes do uso, em alíquotas de 100 µL por orifício. As placas foram mantidas ao abrigo da luz e o desenvolvimento de cor foi monitorado a cada 5 minutos, até que as curvas-padrão pudessem ser adequadamente visualizadas. A reação foi interrompida pela colocação de 100 µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, UN1830, Merck) 4N em cada orifício. A leitura das densidades ópticas foi realizada em leitor automático (Multiskan EX, Labsystems, Fischer) em comprimento de onda de 492 nm. O limite de detecção deste ensaio foi de 15,625 pg/mL.

As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear obtida com os dados referentes às curvas-padrão. Os resultados foram expressos em picogramas por 100 µL de sobrenadante de cultura celular ou em picogramas por grama de tecido nas amostras provenientes de sobrenadante de órgãos.

### **3.11 Titulação de anticorpos**

A dosagem dos anticorpos séricos anti-gp43 de isótipos IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM foi feita por ELISA (Camargo et al., 1994). Para a sensibilização da placa de poliestireno (*96 well cell culture cluster flat bottom with low evaporation lid*, Costar, Corning, Inc.), foi utilizado o

antígeno gp43, o principal epítipo imunodominante do *P. brasiliensis* (Lopes et al., 1994). O antígeno foi diluído em tampão TCB 0,05M, a uma concentração de 500 ng/100 µL; foram colocados 100 µL desta solução em cada orifício da placa, exceto na primeira coluna. A incubação foi feita primeiramente por 1 hora a 37 °C e depois por 24 horas a 4 °C. Os sítios livres foram bloqueados pela adição de 200 µL de Molico<sup>®</sup> (Nestlé Brasil Ltda) a 1% em TCB por orifício, seguida pela incubação da placa por 1 hora a 37 °C. Os soros a serem testados foram diluídos à proporção 1:50 em PBS-*Tween 20* e colocados na placa. A placa foi novamente incubada a 37°C por 1 hora. Os anticorpos secundários marcados com peroxidase, de especificidade anti-IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM murinas feitos em cabra (Sigma, respectivamente A3673, M8770, M4434, M4523, M8270, A4789 e A8786), foram diluídos a concentração ótima pré-determinada em PBS-*Tween 20* e colocados em alíquotas de 100 µL em cada orifício, exceto na primeira coluna. Nova incubação a 37 °C por 1 hora foi feita. Findo este tempo, foram colocados, em cada orifício, 100 µL de uma solução composta por 10 mg de OPD (78410, Sigma), 25 mL de tampão citrato de sódio 0,1M, pH 4,5 e 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Merck, 822287). A placa foi protegida da luz, agitada suavemente e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Merck, UN1830) a cada orifício. Antes de cada adição de reagentes, a placa foi lavada com PBS-*Tween 20* a 1% (Sigma, P-1379) por três vezes e seca contra papel de filtro. A leitura das densidades ópticas foi realizada em leitor automático (Multiskan EX, Labsystems, Fischer) em 492 nm de comprimento de onda.

### **3.12 Análise anátomo-patológica e coleta de material para histopatologia**

Após o sacrifício dos animais realizado como já descrito, cada carcaça foi individualmente analisada quanto às suas características anátomo-patológicas. Os principais aspectos observados foram a aderência das vísceras ao peritônio e entre si, a necrose esplênica, a

hiperplasia do epiploon, o comprometimento do peritônio (ou seja, a presença de focos fúngicos na serosa), a esplenomegalia, a hepatomegalia e a pneumonia. Estas alterações foram graduadas em cruces, sendo (-) nada digno de nota, ( $\pm$ ) muito discreto, (+) discreto, (++) moderado, (+++) grave e (++++) muito grave.

Concomitantemente aos ensaios de quantificação de UFC, fragmentos de baço, epiploon, fígado e pulmão dos animais foram coletados e fixados em Methacarn (Putchler et al., 1970), composto por 60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial (fabricados por Synth), por 4 horas a 4 °C, sob agitação, de onde foram transferidos para álcool absoluto até a inclusão em parafina. O epiploon foi estendido em papel-cartão, para permitir uma fixação mais homogênea. O material foi submetido ao Serviço de Histopatologia do Departamento de Imunologia, ICB-USP, onde foi incluído, seccionado e corado pelos métodos de impregnação pela prata-metamina (Grocott, 1955) e hematoxilina-eosina (HE).

### **3.13 Análise histopatológica**

Cortes histológicos corados com HE foram utilizados para verificação da arquitetura e celularidade das lesões fúngicas. A partir da impregnação pela prata-metamina, que permite a visualização da morfologia do fungo, foi realizada a análise semiquantitativa de leveduras nos cortes. A presença e a morfologia do patógeno observadas foram graduadas em cruces, sendo (-) ausência completa de *P. brasiliensis*, (+) presença de poeira fúngica, (++) presença de pequena quantidade de *P. brasiliensis* com morfologia alterada e ausência do fungo com morfologia preservada, (+++) predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada, com presença de fungo com morfologia preservada e (++++) presença de *P. brasiliensis* com morfologia preservada.

### **3.14 Forma de análise dos resultados**

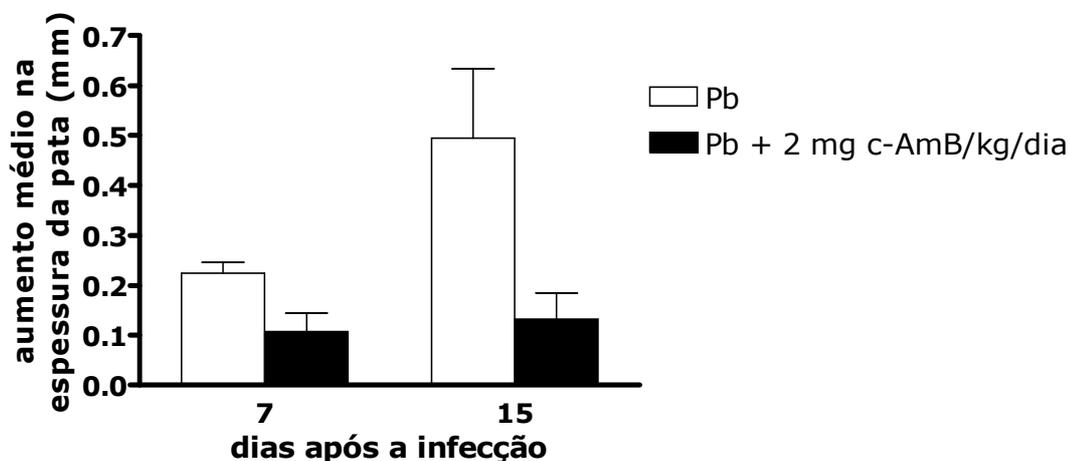
Os resultados foram submetidos à análise de variância, seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer ou testes *t* não pareados, de acordo com o número de grupos experimentais comparados (Zar, 1984). Todas as análises foram feitas em software *GraphPad Prism 4 for Windows* (GraphPad Softwares, 2003). O *n* utilizado, em cada experimento, foi igual ou superior a cinco animais B10.A apenas infectados e a dez nos demais grupos experimentais. O valor de *p* adotado para o nível de significância foi de, pelo menos, menor que 0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da administração de anfotericina B convencional a camundongos suscetíveis infectados com Pb18

Camundongos da linhagem B10.A, suscetíveis à PCM, foram infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia. Os resultados obtidos nas diversas análises, realizadas aos 7 e 15 dias após a infecção, são relatados a seguir.

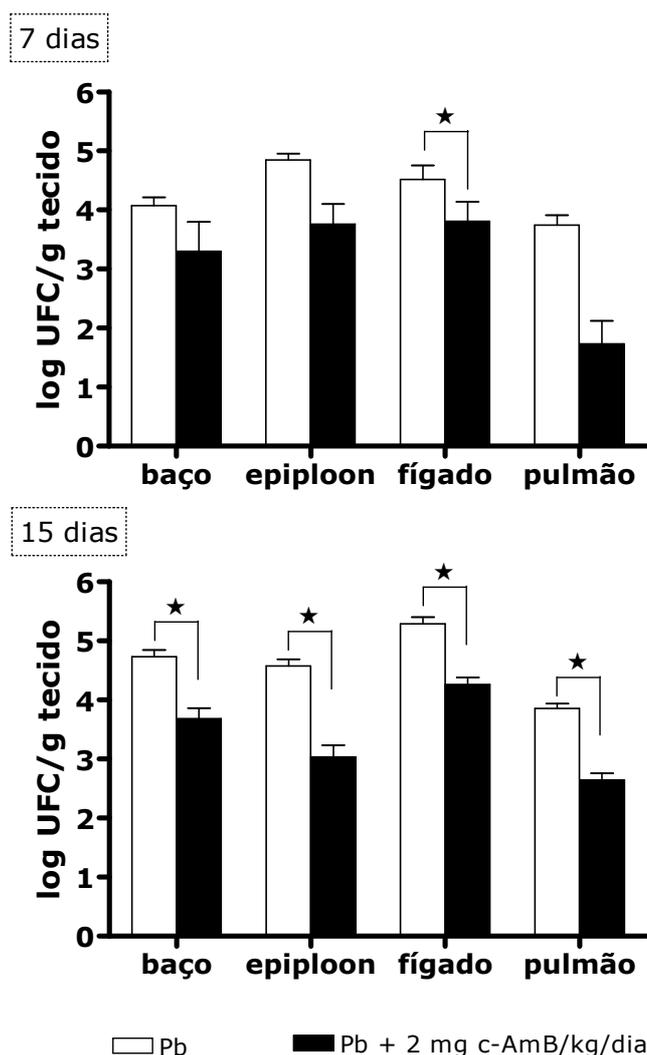
As respostas em reações de HTT apresentadas por estes animais são mostradas na **Figura 1**. Aos 7 dias de infecção, camundongos submetidos ou não à terapia apresentam respostas consideradas baixas. Nos animais apenas infectados, tais respostas são maiores no 15º dia após a infecção; no entanto, esta elevação não é significativa. Neste mesmo tempo após a infecção, as respostas em reações de HTT permanecem baixas nos camundongos submetidos à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia.



**Figura 1** - Respostas em reações de HTT em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, 24 horas após a inoculação do antígeno de Fava Netto, aos 7 e 15 dias de infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados de um experimento (N = 5 [Pb] ou 10 [Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas por meio de testes t não pareados.

Nas quantificações de fungos viáveis, nota-se que, aos 7 dias após a infecção, a terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia reduz a carga fúngica em todos os órgãos avaliados, mas apenas no fígado a diferença entre o número de *P. brasiliensis* isolado de animais submetidos ou não ao tratamento é significativa. Já aos 15 dias de infecção, a administração da droga diminui a carga fúngica de forma significativa em todos os órgãos avaliados (**Figura 2**).



**Figura 2** - Quantificação de fungos viáveis em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados de um experimento (N = 5 [Pb] ou 10 [Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

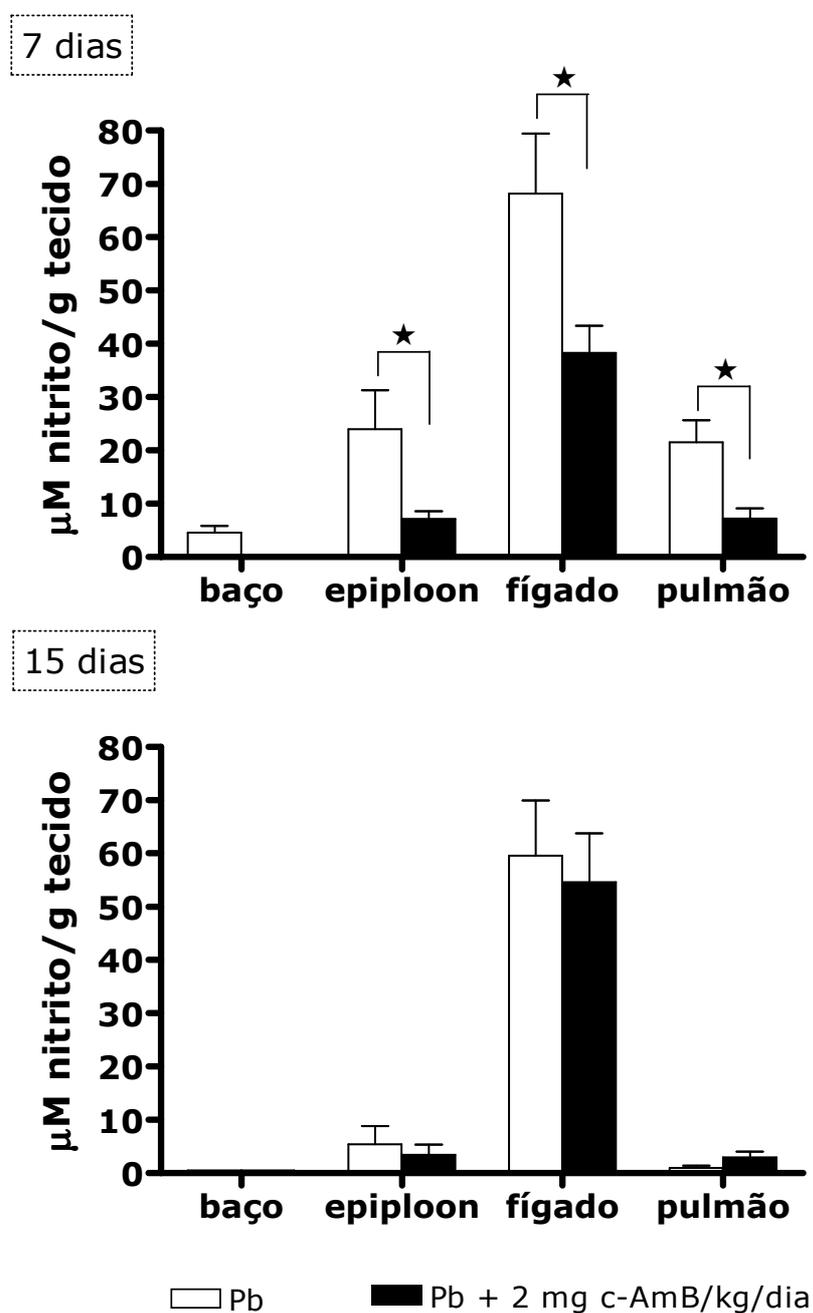
★: diferença estatística significativa.

As concentrações de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em baço, epíloon, fígado e pulmão, antes da inoculação do fungo, são muito baixas (dados não mostrados). Aos 7 dias de infecção, as concentrações de nitrito em todos os órgãos de animais submetidos à terapia com c-AmB são menores do que as apresentadas pelos controles apenas infectados; diferenças significativas entre as concentrações encontradas em animais tratados ou não são observadas no epíloon, no fígado e no pulmão. Já aos 15 dias de infecção, as concentrações de nitrito apresentadas pelos animais submetidos ou não ao tratamento, no epíloon, no fígado e no pulmão, são bastante semelhantes. No baço, em ambos os grupos experimentais, porém, o reativo não foi detectado (**Figura 3**).

As concentrações de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de baço, epíloon, fígado e pulmão são mostradas na **Figura 4**. Aos 7 dias de infecção, no baço, as concentrações da citocina são significativamente maiores nos camundongos submetidos ao tratamento. No fígado, camundongos apenas infectados apresentam níveis significativamente menores de IFN- $\gamma$  do que os indivíduos tratados. Já aos 15 dias de infecção, praticamente não há diferença entre as concentrações de IFN- $\gamma$  observadas em todos os órgãos de camundongos infectados e submetidos ou não ao tratamento; diferenças estatísticas significativas entre não são observadas.

Os níveis de GM-CSF nos sobrenadantes de baço, epíloon, fígado e pulmão são mostrados na **Figura 5**. Aos 7 dias de infecção, nos quatro órgãos avaliados, as concentrações de GM-CSF em animais infectados submetidos à terapia com c-AmB tendem a ser maiores do que as apresentadas por não tratados; porém, diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais não são detectadas. Já aos 15 dias de infecção, os níveis desta citocina em camundongos infectados e tratados são menores do que as apresentadas pelos somente infectados, em baço, epíloon, fígado e pulmão; novamente, diferenças estatísticas significativas entre os grupos de camundongos não foram encontradas.

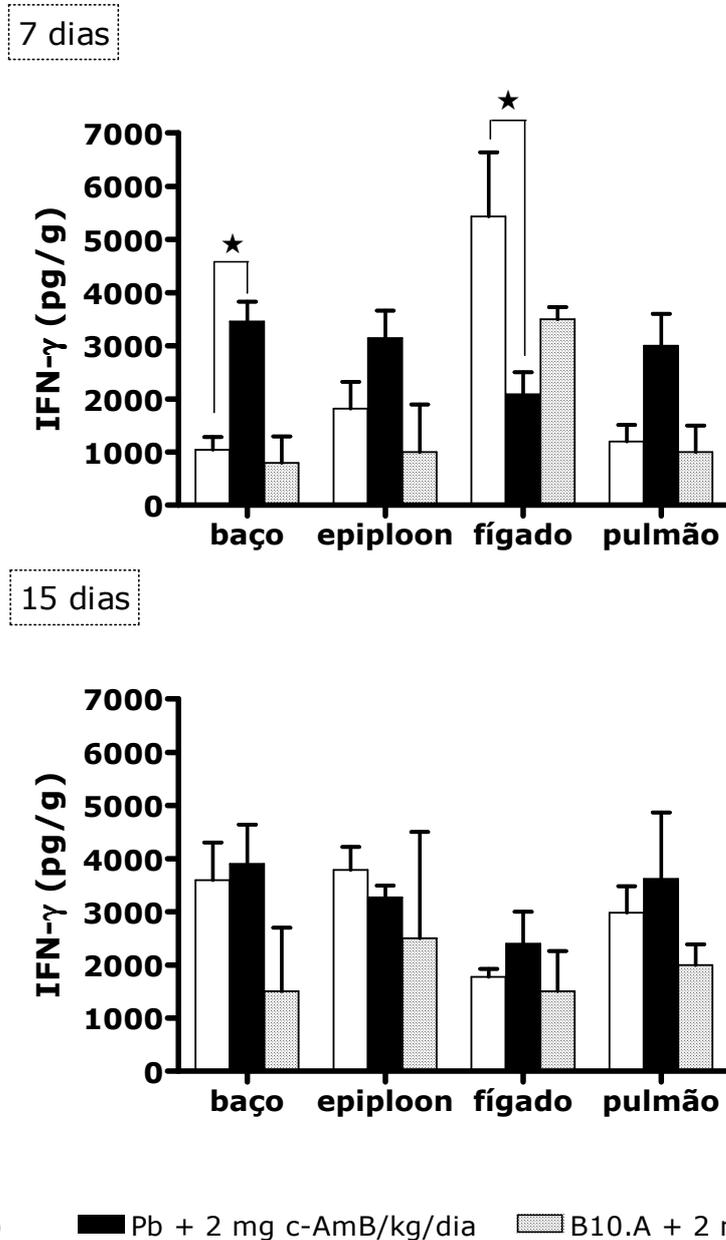
As concentrações de IL-10 nos sobrenadantes de órgãos são mostradas na **Figura 6**. No baço, nos dois tempos analisados, os níveis da



**Figura 3** - Determinação da concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção.

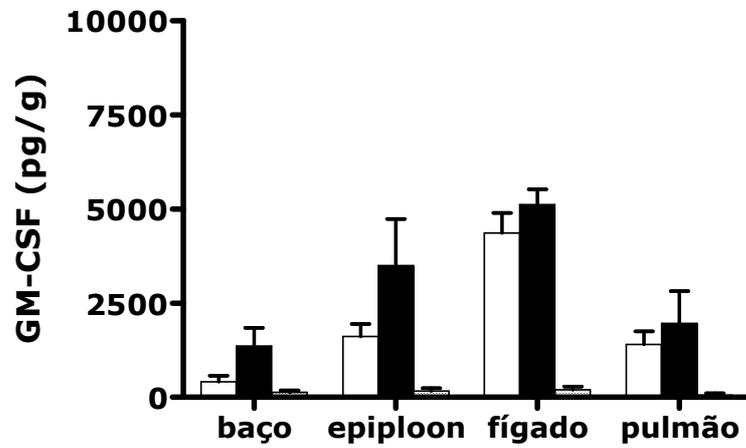
As barras indicam o erro médio padrão. Dados de um experimento (N = 5 [Pb] ou 10 [Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa.

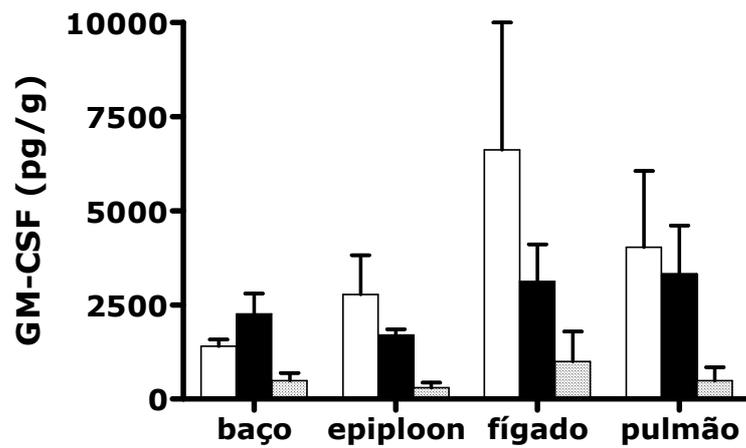


**Figura 4** - Determinação da concentração de IFN- $\gamma$  em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção. As barras indicam o erro médio padrão. Dados de um experimento (N = 5 [Pb ou B10.A + 2 mg c-AmB/kg/dia] ou 10 [Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

7 dias

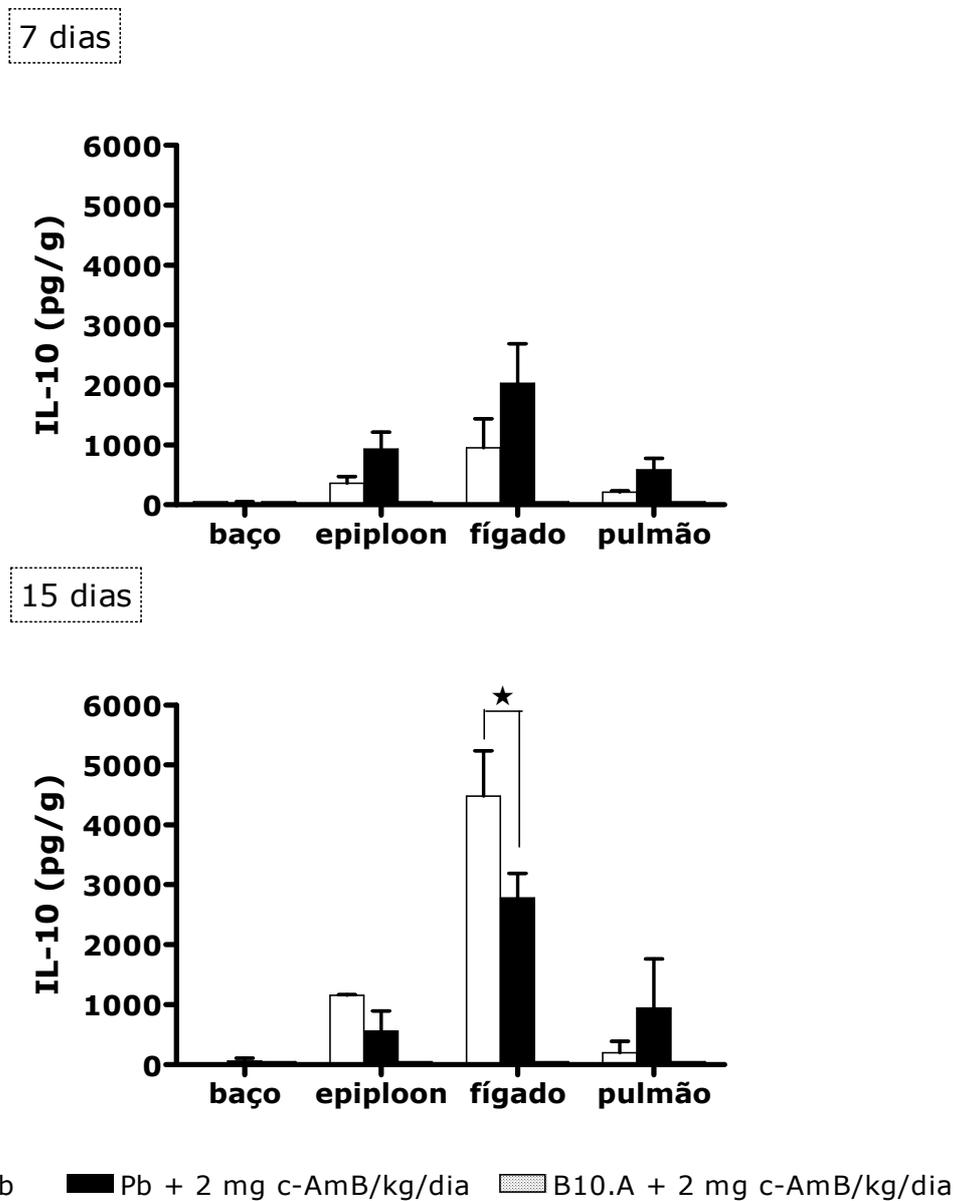


15 dias



□ Pb    ■ Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia    ▨ B10.A + 2 mg c-AmB/kg/dia

**Figura 5** - Determinação da concentração de GM-CSF em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção. As barras indicam o erro médio padrão. Dados de um experimento (N = 5 [Pb ou B10.A + 2 mg c-AmB/kg/dia] ou 10 [Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.



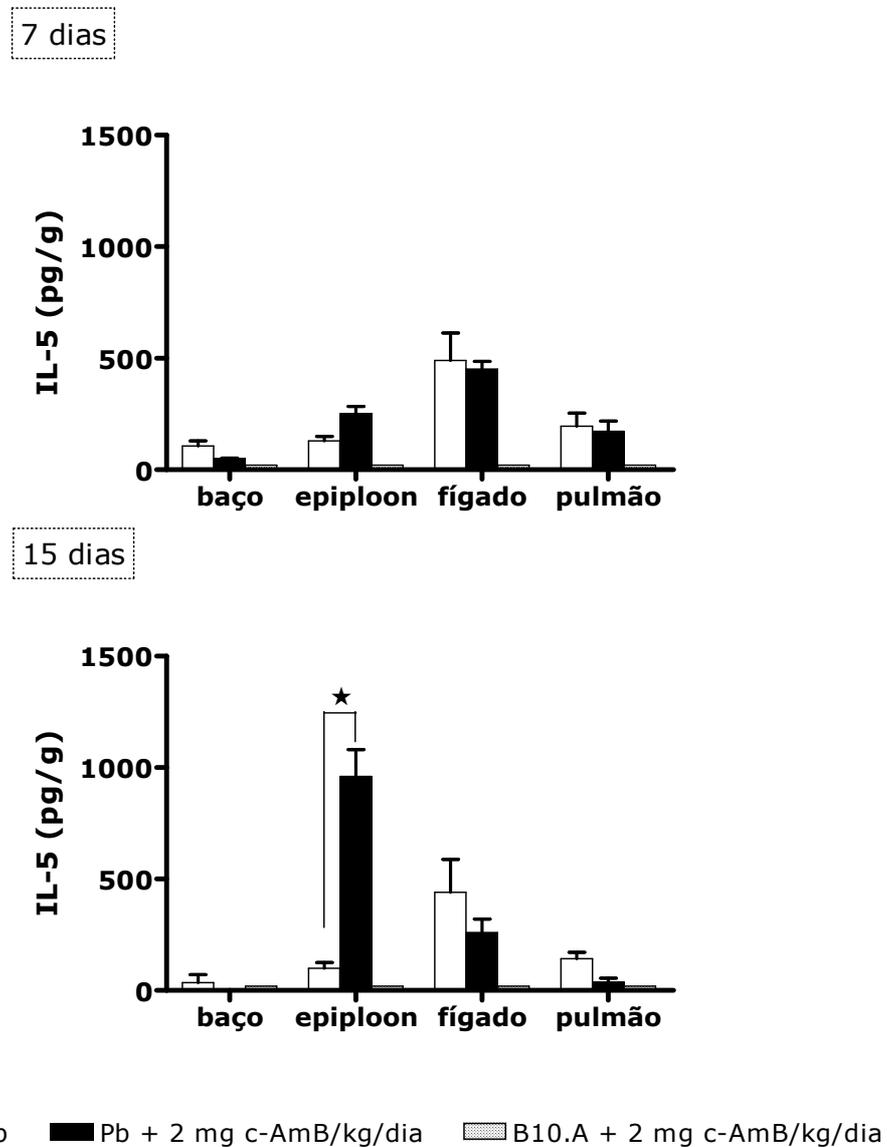
**Figura 6** - Determinação da concentração de IL-10 em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 5 [Pb ou B10.A + 2 mg c-AmB/kg/dia] ou 10 [Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia]) e submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer. ★: diferença estatística significativa.

citocina são baixos e bastante semelhantes em animais infectados e tratados ou não. Aos 7 dias de infecção, nos demais órgãos, as concentrações de IL-10 tendem a ser maiores em animais infectados e tratados do que nos apenas infectados; porém, apenas no fígado a secreção de IL-10 é significativamente maior nos camundongos que receberam a droga. Já aos 15 dias de infecção, no epiploon, as concentrações da citocina tendem a ser menores em animais infectados e tratados do que nos infectados; no fígado, estes níveis são significativamente menores nos camundongos tratados do que nos não submetidos ao tratamento. Por fim, no pulmão, os níveis de IL-10 tendem a ser mais elevados nos indivíduos infectados e tratados. Não há diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos experimentais.

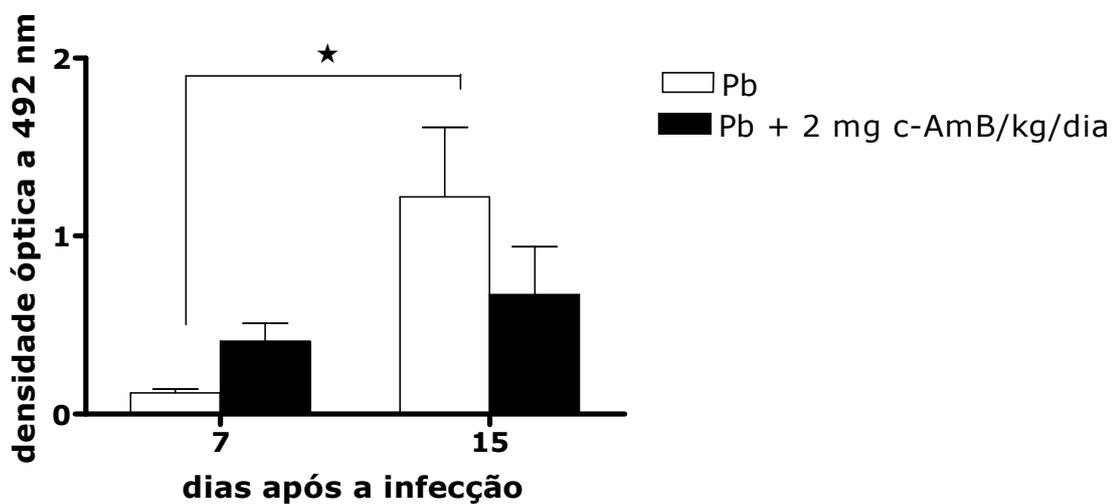
Os níveis de IL-5 nos sobrenadantes de órgãos são mostrados na **Figura 7**. Aos 7 dias de infecção, as concentrações de IL-5 nos quatro órgãos analisados, de camundongos infectados e submetidos ou não à terapia, são semelhantes. Já aos 15 dias de infecção, a secreção de IL-5 tende a ser menor no baço, no fígado e no pulmão dos camundongos infectados submetidos ao tratamento. No epiploon, porém, esta citocina é encontrada em níveis significativamente mais altos em animais infectados e tratados do que nos controles apenas infectados.

A titulação de IgG total anti-gp43 de *P. brasiliensis* é mostrada na **Figura 8**. Camundongos da linhagem B10.A, submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, apresentam, aos 7 dias de infecção, níveis baixos e similares de anticorpos IgG. Aos 15 dias, tais concentrações se elevam, mas de forma significativa apenas nos animais não tratados.

Às análises anátomo-patológicas, mostradas na **Tabela I**, observa-se que, em ambos os tempos após a infecção, as lesões apresentadas por camundongos submetidos à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia são de gravidade menor do que as observadas nos animais apenas infectados. Porém, nota-se a presença de lesões inflamatórias intensas, em sítios compatíveis à área de inoculação da droga, nos indivíduos submetidos ao tratamento antifúngico.



**Figura 7** - Determinação da concentração de IL-5 em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias de infecção. As barras indicam o erro médio padrão. Dados de um experimento (N = 5 [Pb] ou 10 [Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.



**Figura 8** - Titulação de IgG total anti-gp43 de *P. brasiliensis* em soros de camundongos inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias após a infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados de um experimento (N = 5 [Pb] ou 10 [Pb + 2 mg c-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre os dois tempos após a inoculação.

**Tabela I** - Exame anátomo-patológico em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 2 mg c-AmB/kg/dia, aos 7 e 15 dias após a infecção.

	Ad	NE	HEp	CP	LAI	EM	HM	Pn
<b>Pb, 7d</b>	-	+	++	±	-	+	+	-
<b>Pb+c-AmB, 7d</b>	-	±	±	±	+++	±	-	-
<b>Pb, 15d</b>	-	+	++	±	-	+	+	-
<b>Pb+c-AmB, 15d</b>	-	-	±	-	++++	±	-	-

Dados de um experimento ( $N = 5$  [Pb] e 10 [Pb + c-AmB]).

NOTA: Abreviaturas:

Ad: aderência das vísceras ao peritônio e entre sistema imunológico

NE: necrose esplênica

HEp: hiperplasia do epíloon

CP: comprometimento do peritônio (presença de focos fúngicos na serosa)

LAI: lesão peritoneal em área condizente com a inoculação de L-AmB

EM: esplenomegalia

HM: hepatomegalia

Pn: pneumonia

(-): nada digno de nota

(±): muito discreto

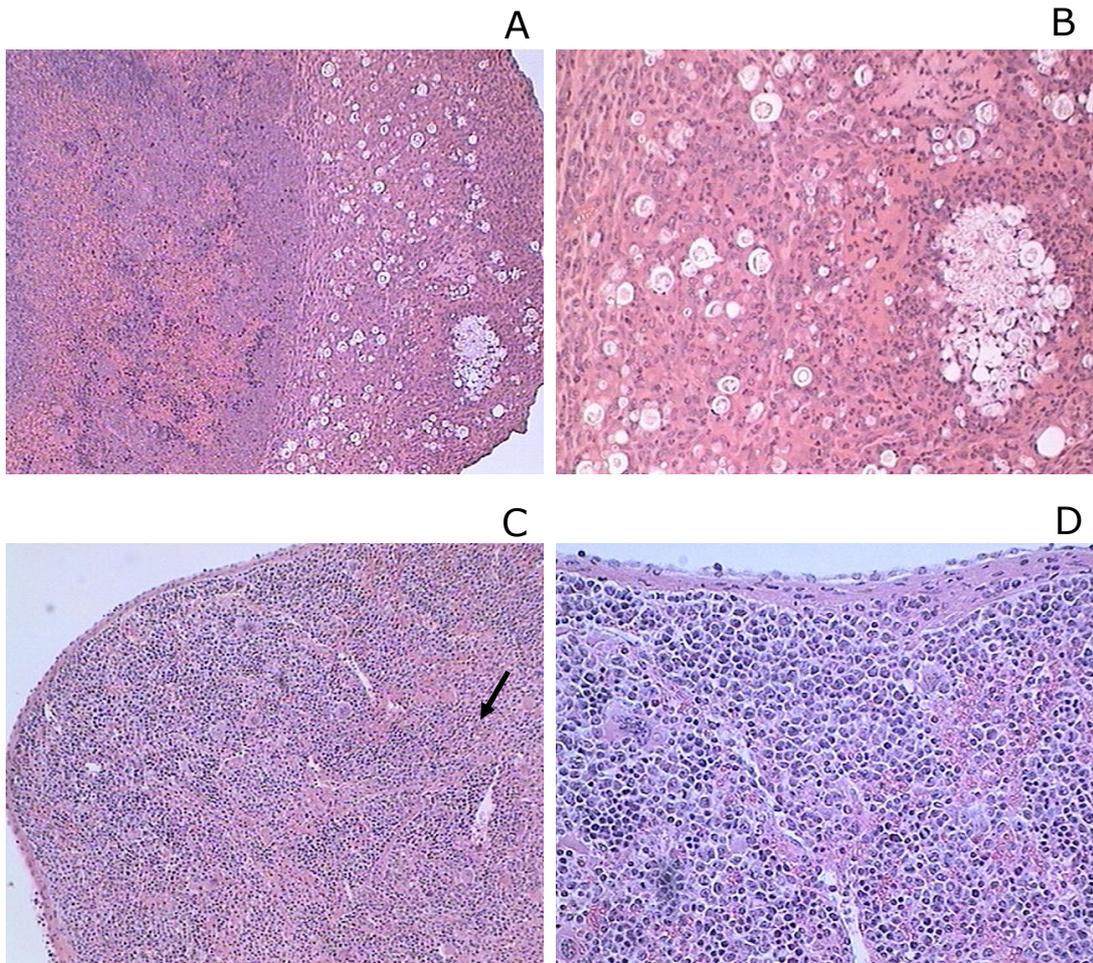
(+): discreto

(++): moderado

(+++): grave

(++++): muito grave

Às análises histopatológicas, observa-se que, aos 7 dias de infecção, há lesões frouxas na cápsula do baço de camundongos não tratados, mas não no parênquima do órgão (**Prancha IA**). Em maior aumento, verifica-se a existência de áreas necróticas, leveduras de *P. brasiliensis*, macrófagos e algumas células gigantes; na periferia da lesão, são encontrados neutrófilos (**Prancha IC**). Neste mesmo tempo após a infecção, não são encontradas lesões nem na porção capsular nem no parênquima esplênico em camundongos submetidos à terapia com c-AmB



**Prancha I** - Análise histopatológica aos 7 dias pós-infecção realizada em baço de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 (A, B) e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia (C, D); HE.

A: lesão na cápsula esplênica; 245x.

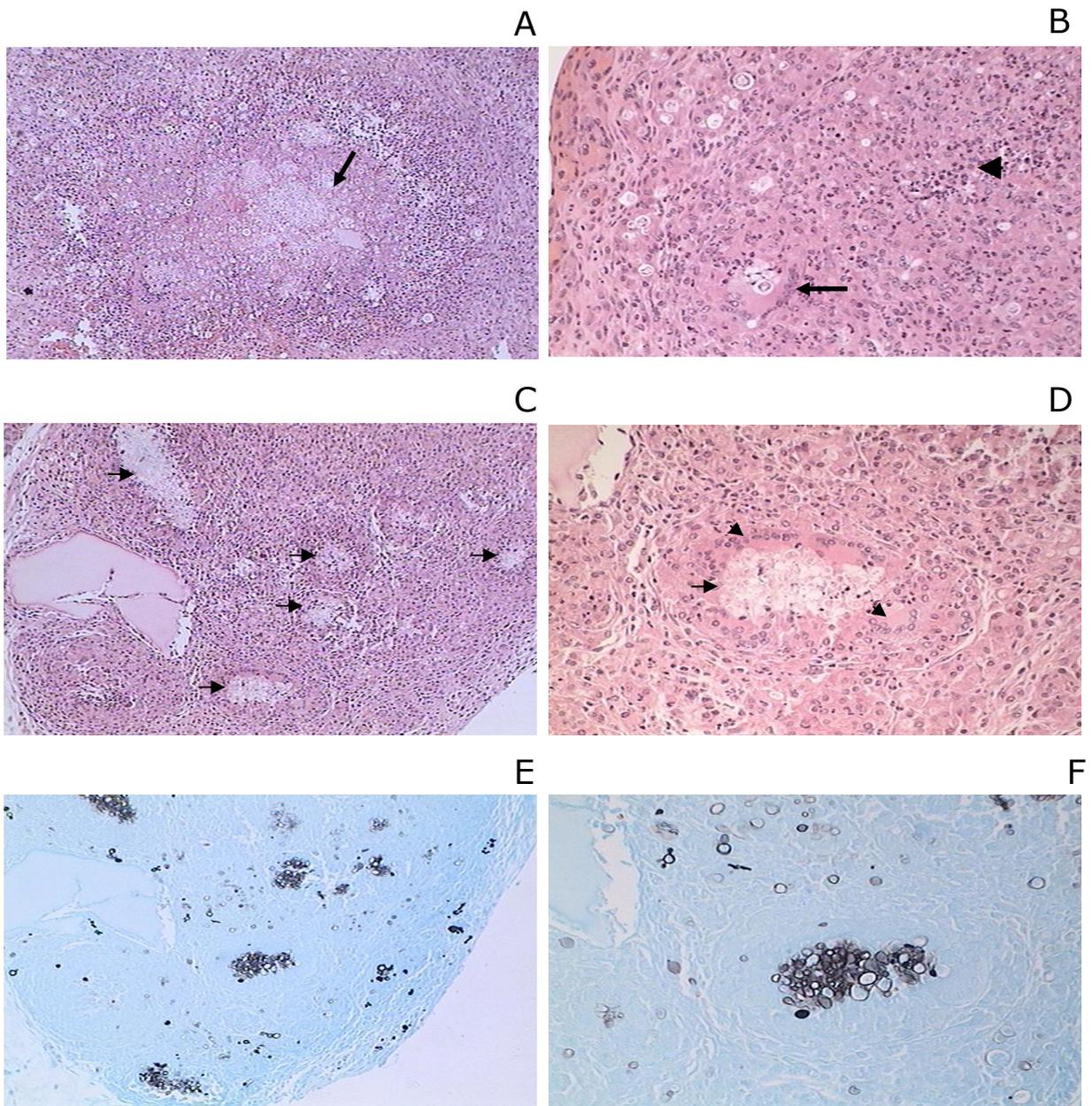
B: presença de leveduras de *P. brasiliensis*, área necrótica (seta) e infiltrado celular contendo principalmente neutrófilos e macrófagos; 614x.

C e D: ausência de lesões; 245x e 614x, respectivamente.

(**Prancha IB e ID**). No epiploon, animais infectados apresentaram, aos 7 dias de infecção, vários focos de lesão nos órgãos, com extensas áreas de necrose (**Prancha IIA**), além de leveduras, células gigantes e infiltrado neutrofílico (**Prancha IIB**). Camundongos tratados com 2 mg c-AmB/kg/dia, por sua vez, apresentam menor grau de lesão tecidual; as lesões observadas contêm áreas de necrose (**Prancha IIC**) e células gigantes (**Prancha IID**). À coloração pela prata, podem ser visualizadas leveduras de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no interior destas áreas necróticas (**Prancha IIE e IIF**). No fígado de animais controles, uma extensa lesão granulomatosa capsular, que se estende até o parênquima hepático, pode ser visualizada (**Prancha IIIA**); em maior aumento, constata-se a existência de lesões necróticas, com presença de leveduras de *P. brasiliensis*, neutrófilos e macrófagos (**Prancha IIIB**). Em animais submetidos à terapia, há, no fígado, lesões capsulares, com focos de *debris* (**Prancha IIIC e IIID**). À coloração pela prata, podem novamente ser visualizadas leveduras de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no interior das áreas de necrose (**Prancha IIIE e IIIF**).

Aos 15 dias de infecção, as lesões encontradas em baço e fígado dos animais não diferem daquelas relatadas aos 7 dias. No epiploon de animais não tratados, observam-se extensas lesões granulomatosas (**Prancha IVA**). Em maior aumento, verifica-se a existência de leveduras de *P. brasiliensis* com brotamentos, neutrófilos, células gigantes, material extracelular e plasmócitos (**Prancha IVB**). Nos camundongos submetidos ao tratamento, observam-se lesões necróticas concêntricas, circundadas por grandes áreas de material extracelular. Esta maior deposição de material extracelular em animais tratados é similar à apresentada por indivíduos resistentes no modelo murino isogênico da PCM (**Prancha IVC e D**). Não foram encontradas lesões pulmonares nos dois grupos experimentais em ambos os tempos após a infecção.

A presença de *P. brasiliensis* nos órgãos de camundongos submetidos ou não à terapia com c-AmB foi analisada de forma



**Prancha II** - Análise histopatológica aos 7 dias pós-infecção realizada em epiploon de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 (A, B) e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia (C-F).

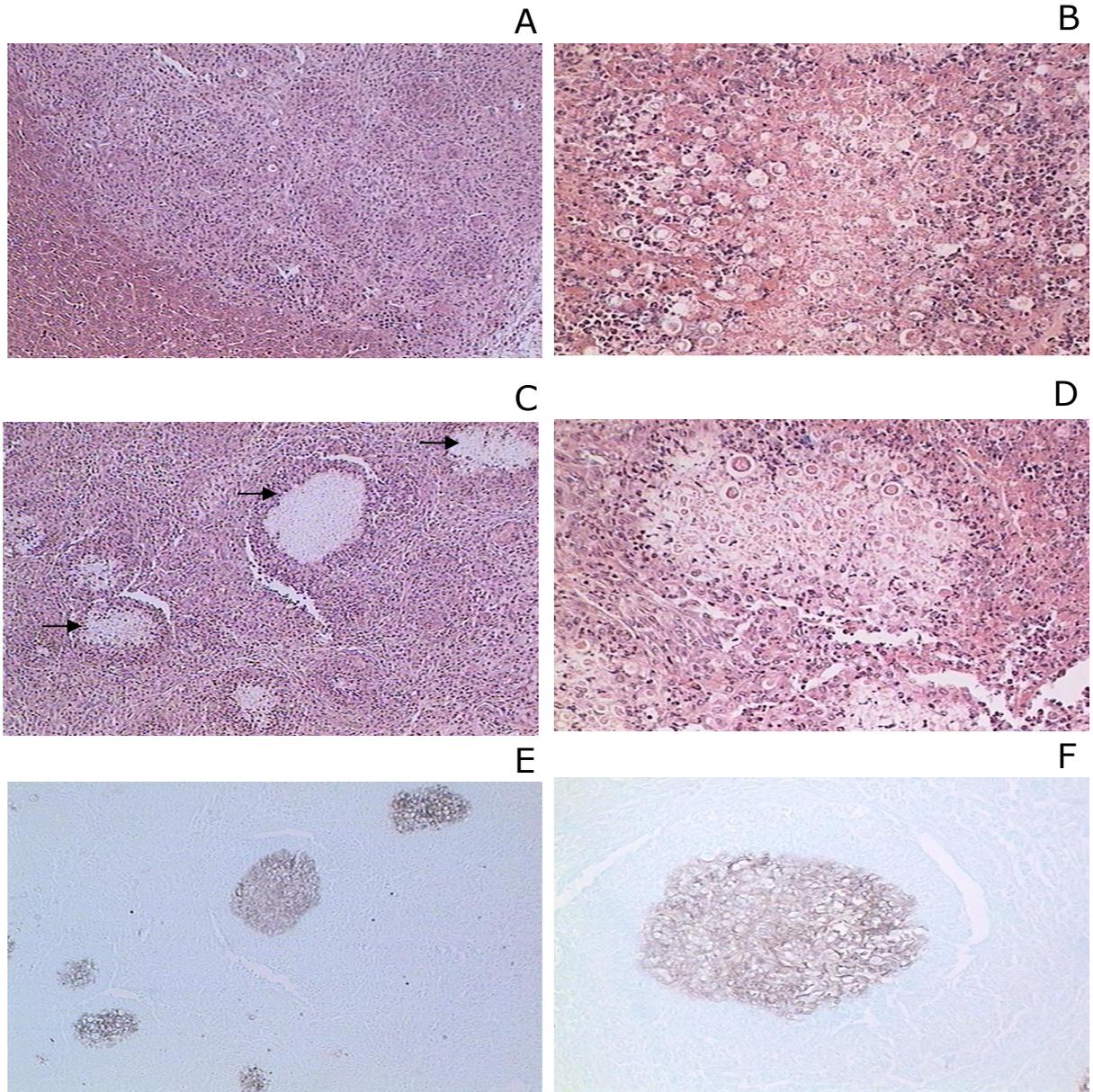
A: presença de vários focos de lesão no órgão, com extensas áreas de necrose (seta); HE, 245x.

B: presença de leveduras de *P. brasiliensis*, célula gigante (seta) e infiltrado neutrofílico (ponta de seta); HE, 614x.

C: menor grau de lesão tecidual; presença de áreas de necrose (setas); HE, 245x.

D: área de necrose (seta) e células gigantes (pontas de seta); HE, 614x.

E e F: focos de debris de *P. brasiliensis*; prata-metamina, 245x e 614x, respectivamente.



**Prancha III** - Análise histopatológica aos 7 dias pós-infecção realizada em fígado de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 (A, B) e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia (C-F).

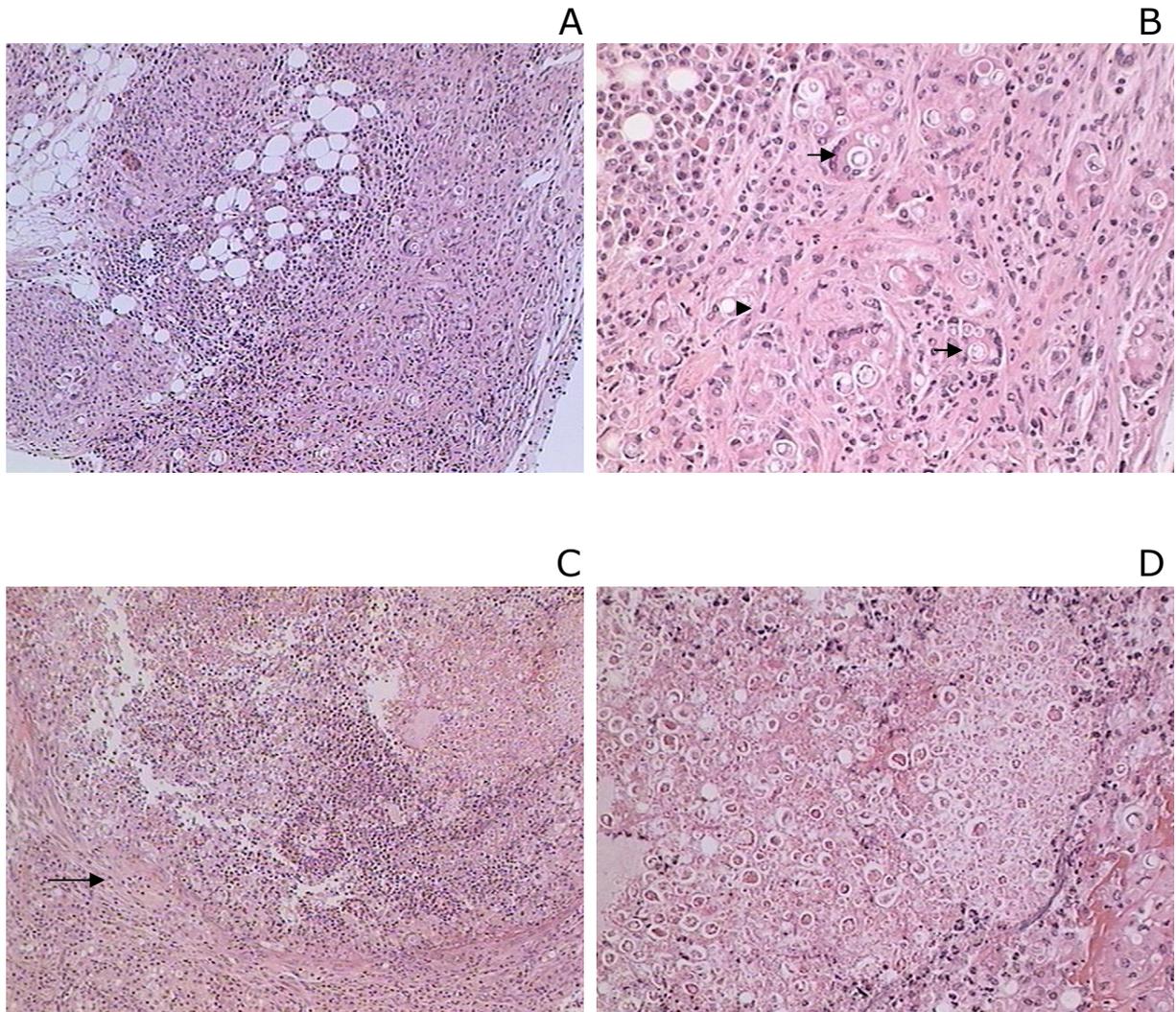
A: lesão granulomatosa capsular, que se estende até o parênquima do órgão; HE, 245x.

B: lesão necrótica com presença de leveduras de *P. brasiliensis*, neutrófilos e macrófagos; HE, 614x.

C: lesão capsular, com focos de debris (setas); HE, 245x.

D: foco de debris; HE, 614x.

E e F: focos de debris de *P. brasiliensis*; prata-metamina, 245x e 614x, respectivamente.



**Prancha IV** - Análise histopatológica aos 15 dias pós-infecção realizada em epíplon de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 (A, B) e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia (C, D).

A: extensa lesão granulomatosa; HE, 245x.

B: presença de leveduras de *P. brasiliensis* com brotamentos, neutrófilos, células gigantes (setas), material extracelular (ponta de seta) e plasmócitos; HE, 614x.

C e D: lesão necrótica concêntrica, com presença de grandes áreas de material extracelular (seta); HE, 245x e 614x, respectivamente.

semiquantitativa, como pode ser verificado na **Tabela II**. Aos 7 dias de infecção, camundongos não tratados apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no baço e no fígado. No epiploon, as leveduras encontradas possuem morfologia preservada. No pulmão, não foram encontrados fungos. Por outro lado, camundongos submetidos à terapia apresentam poucos fungos, com morfologia alterada, no baço, no epiploon e no fígado; no pulmão, novamente, não foram encontradas leveduras de *P. brasiliensis*. Já aos 15 dias de infecção, camundongos não tratados apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia preservada no baço, no epiploon (**Prancha VA**) e no fígado e com morfologia alterada no pulmão. Camundongos tratados, por sua vez, apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no baço e pequena quantidade de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no epiploon (**Prancha VB**). Nestes animais, não foram encontradas leveduras no pulmão.

Aos 7 dias de infecção, camundongos não tratados apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no baço e no fígado. No epiploon, são encontradas leveduras com morfologia preservada. No pulmão, não são observadas leveduras do fungo. Por outro lado, nos camundongos submetidos à terapia, encontram-se pouquíssimas leveduras, com morfologia alterada, no baço, epiploon e fígado; no pulmão, novamente, não são observadas leveduras de *P. brasiliensis*. Já aos 15 dias de infecção, camundongos não tratados apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia preservada no baço, no epiploon e no fígado e com morfologia alterada no pulmão. Camundongos tratados, por sua vez, apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no baço e pequena quantidade de fungo com morfologia alterada no epiploon. Nestes animais, não são observadas leveduras do fungo no pulmão. Aos 30 dias de infecção, em camundongos apenas infectados, verifica-se o predomínio de leveduras de morfologia preservada nos quatro órgãos avaliados. Nos animais submetidos à terapia, há predomínio de *P. brasiliensis* de morfologia alterada, com

presença de leveduras de morfologia preservada, no baço e no fígado, e predomínio de fungos de morfologia preservada no epiploon. No pulmão, não são observadas leveduras de *P. brasiliensis*.

**Tabela II** - Análise semiquantitativa de *P. brasiliensis* de diferentes aspectos morfológicos em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata em camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não ao tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia.

	Baço	Epiploon	Fígado	Pulmão
<b>Pb, 7d</b>	+++	++++	+++	-
<b>Pb + c-AmB, 7d</b>	++	++	++	-
<b>Pb, 15d</b>	++++	++++	++++	+++
<b>Pb + c-AmB,15d</b>	+++	++	++	-

Dados de um experimento ( $N = 5$  [Pb] e 10 [Pb + c-AmB]).

NOTA:

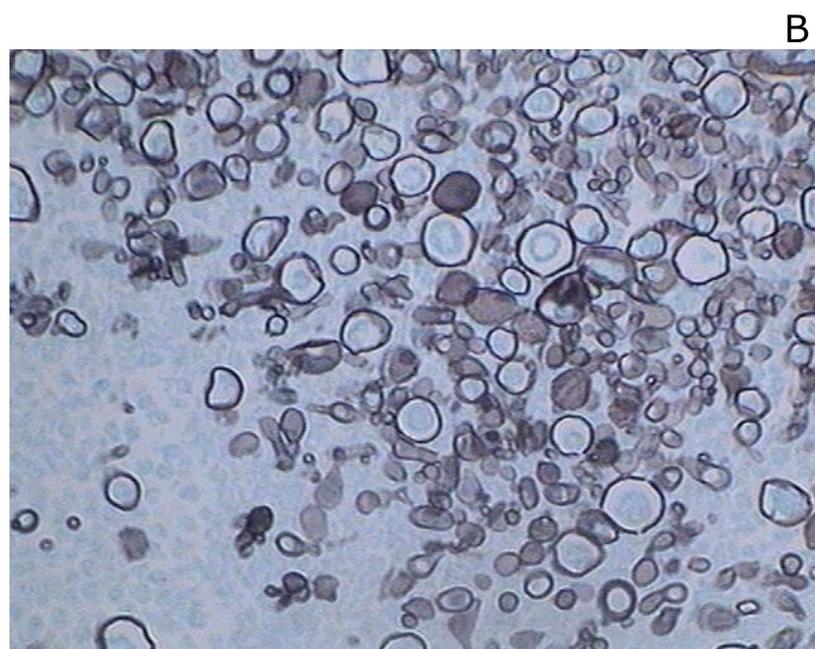
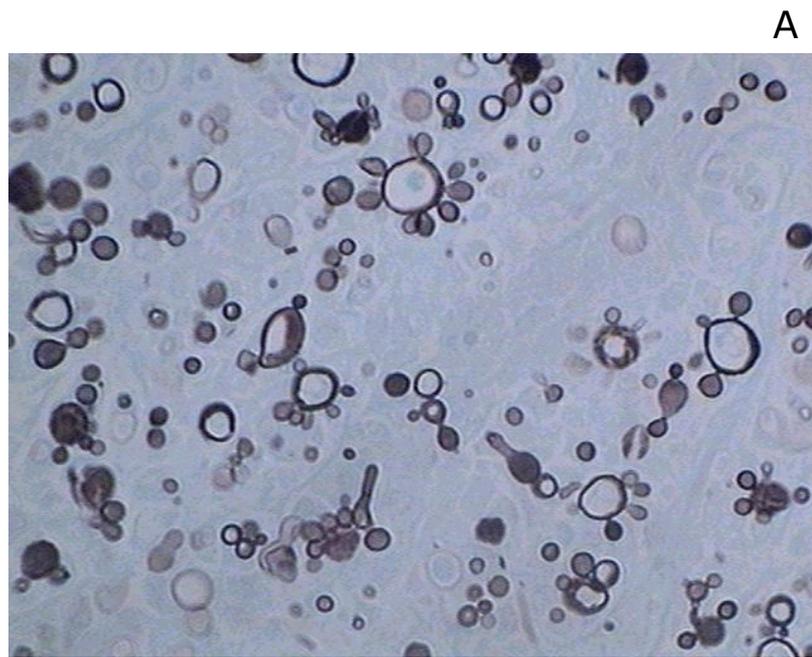
(-): ausência completa de *P. brasiliensis*

(+): presença de poeira fúngica

(++): presença de pequena quantidade de *P. brasiliensis* com morfologia alterada e ausência de fungo com morfologia preservada

(+++): predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada, com presença de fungo com morfologia preservada

(++++): presença de *P. brasiliensis* com morfologia preservada



**Prancha V** - Análise histopatológica de epiploon de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 (A) e submetidos a tratamento com 2 mg c-AmB/kg/dia (B), aos 15 dias pós-infecção; prata-metamina, 982x.

A: presença de *P. brasiliensis* com morfologia preservada.

B: presença de *P. brasiliensis* com morfologia alterada.

#### **4.2 Efeitos da administração de anfotericina B lipossomal a camundongos suscetíveis infectados com Pb18**

Camundongos da linhagem B10.A, suscetíveis à PCM, foram infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia. Os resultados obtidos nas diversas análises, realizadas aos 7, 15 e 30 dias após a infecção, são relatados a seguir.

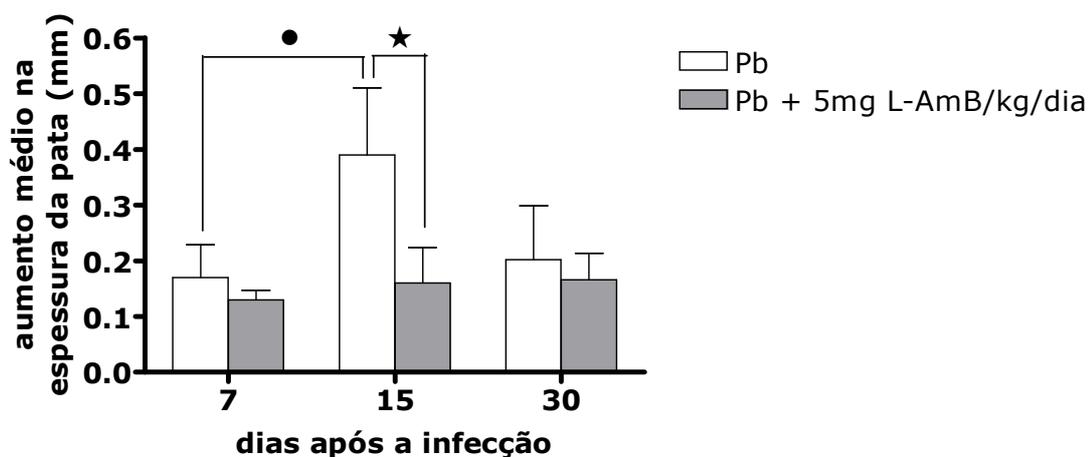
O peso dos camundongos foi mensurado antes da primeira administração de L-AmB e aos 7, 15 e 30 dias após a infecção (dados não mostrados). Embora tenha sido constatado ganho de peso nas fases mais tardias da doença, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos experimentais nos tempos analisados.

Às reações de HTT, aos 7 dias após a infecção, os camundongos submetidos ou não à terapia apresentam respostas consideradas baixas; aos 15 dias, as respostas dos animais não tratados elevam-se de forma significativa, enquanto as dos indivíduos tratados mantem-se baixas. Aos 30 dias de infecção, em ambos os grupos experimentais, as respostas são, novamente, consideradas baixas (**Figura 9**).

Os perfis leucocitários de animais infectados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com L-AmB são mostrados na **Tabela III**.

Os números de leucócitos totais, nos três tempos após a infecção, são significativamente menores em ambos os grupos experimentais do que os apresentados por camundongos não infectados. Nota-se ainda que, no 7º dia pós-infecção, animais submetidos ao tratamento apresentam menos leucócitos na circulação do que camundongos apenas infectados.

Na quantificação de neutrófilos imaturos, nota-se que, em nenhum dos grupos experimentais, estas células são observadas antes da infecção; da mesma forma, nos primeiros 15 dias após a inoculação, esta população celular também não é encontrada. Aos 30 dias, porém, camundongos submetidos ou não à terapia apresentam números significativamente mais altos de neutrófilos imaturos do que nos demais tempos de infecção.



**Figura 9** - Respostas em reações de HTT em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5mg L-AmB/kg/dia, 24 horas após a inoculação do antígeno de Fava Netto, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 10 [Pb] ou 20 [Pb + 5 mg L-AmB/kg/dia]) e submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre os dois grupos experimentais; •: diferença estatística significativa entre o 7º e o 15º dia de infecção.

Em relação aos neutrófilos maduros, observa-se que, na 1ª semana de infecção, camundongos apenas infectados, não tratados, apresentam números significativamente maiores destas células do que os indivíduos submetidos ao tratamento. Além disso, tais números também são mais elevados do que os encontrados nos demais pontos analisados, em ambos os grupos experimentais.

As concentrações de eosinófilos, até o 15º dia de infecção, não são alterados pela inoculação do fungo ou a administração de L-AmB. No entanto, aos 30 dias, os camundongos não submetidos à terapia apresentam mais eosinófilos circulantes do que aqueles que receberam a droga; tais números também são maiores do que os observados nos demais pontos da infecção.

**Tabela III** - Perfis leucocitários de camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia.

	<b>Le</b>	<b>PMNi</b>	<b>PMNm</b>	<b>Eos</b>	<b>Ly</b>	<b>M</b>	<b>Bas</b>
<b>B10.A, -1d</b>	7800 ± 720	0 ± 0	520 ± 174	43 ± 28	6930 ± 684	92 ± 26	78 ± 43
<b>Pb18, 7d</b>	3300 ± 653 ★◇	0 ± 0	5570 ± 111 ★◇❖⌘	0 ± 0	2718 ± 656 ★◇	6 ± 6 ★	6 ± 6
<b>Pb18 + L-AmB, 7d</b>	1325 ± 309 ★	0 ± 0	162 ± 79	44 ± 41	1073 ± 248 ★	3 ± 3 ★	0 ± 0
<b>Pb18, 15d</b>	1950 ± 350 ★	0 ± 0	784 ± 10	0 ± 0	677 ± 51 ★	48 ± 1 ★	0 ± 0
<b>Pb18 + L-AmB, 15d</b>	2400 ± 1097 ★	0 ± 0	874 ± 363	0 ± 0	1852 ± 968 ★	11 ± 6 ★	11 ± 6
<b>Pb18, 30d</b>	1033 ± 333 ★	63±15 ★⌘■	138±19	185±51 ◇⌘■	647±322 ★	0±0 ★	0±0
<b>Pb18 + L-AmB, 30d</b>	967±67 ★	172±50 ★⌘■	205±106	17±14	338±193 ★	52±12 ★	0±0

Os resultados foram expressos como número de células por milímetro cúbico ± erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos ( $N = 20$  [B10.A], 10 [Pb] e 20 [Pb + L-AmB]) e submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

NOTA: Abreviaturas e símbolos:

Le: leucócitos totais

PMNi: neutrófilos imaturos

PMNm: neutrófilos maduros

Eos: eosinófilos

Ly: linfócitos

M: monócitos

Bas: basófilos

★: diferença estatística significativa em relação a camundongos não infectados

◇: diferença estatística significativa entre animais submetidos ou não à terapia

❖: diferença estatística significativa entre os 7 e os 15 dias após a infecção

⌘: diferença estatística significativa entre os 7 e os 30 dias após a infecção

■: diferença estatística significativa entre os 15 e os 30 dias de infecção

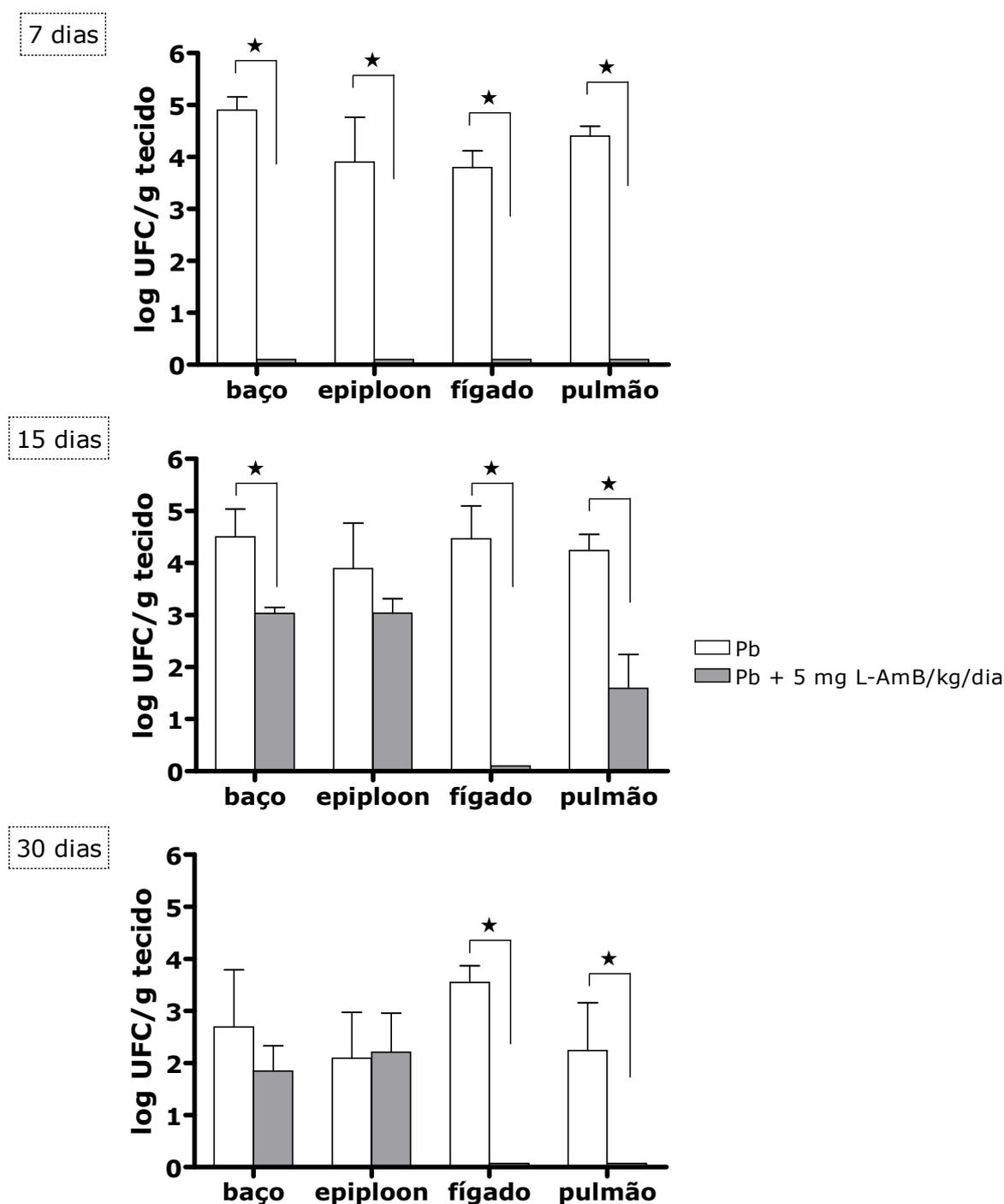
Quanto ao número de linfócitos circulantes, observa-se o desenvolvimento de linfopenia em ambos os grupos experimentais durante todo o curso da infecção; nos três tempos analisados, camundongos infectados submetidos ou não à terapia apresentam números significativamente menores destas células do que indivíduos não inoculados. Aos 7 dias de infecção, nota-se também que animais tratados apresentam números significativamente menores de linfócitos do que camundongos apenas infectados.

Em relação à quantificação de monócitos, observa-se o desenvolvimento de monocitopenia em ambos os grupos experimentais após a infecção pelo *P. brasiliensis*. Nos três pontos analisados, os números destas células, em camundongos submetidos ou não ao tratamento, são significativamente menores do que os observados em indivíduos não infectados.

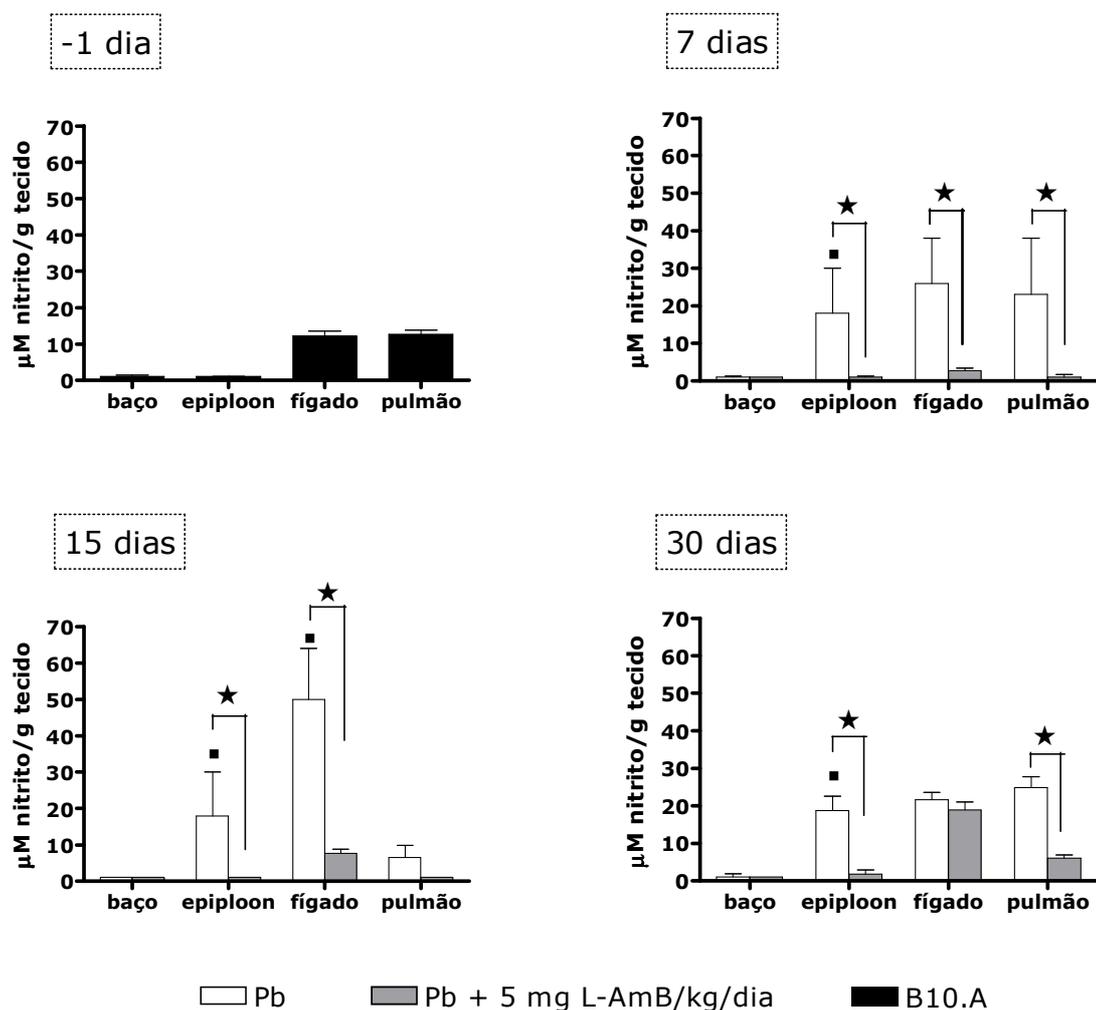
Em todos os pontos analisados, as contagens de basófilos não são alteradas pela infecção e/ou pela administração do tratamento.

Os resultados referentes à quantificação de fungos viáveis são mostrados na **Figura 10**. Aos 7 dias de infecção, verifica-se esterilização de todos os órgãos (baço, epíplon, fígado e pulmão) de camundongos submetidos à terapia com L-AmB. Aos 15 dias, o número de *P. brasiliensis* viáveis recuperados é significativamente menor nos indivíduos tratados, exceto no epíplon. Aos 30 dias, a quantidade de UFC recuperada do baço e do epíplon não é significativamente diferente em indivíduos submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia. Porém, novamente, no fígado e no pulmão, camundongos tratados apresentam diminuição significativa da carga fúngica.

Na **Figura 11**, são mostrados os resultados referentes à determinação da concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito. Previamente à infecção, não se detecta a presença do reativo nos sobrenadantes de baço e epíplon; porém, observa-se síntese basal de NO no fígado e no pulmão. No 7º dia após a inoculação, o reativo não foi encontrado no baço de camundongos de ambos os grupos experimentais.



**Figura 10** - Quantificação de fungos viáveis em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 10 [Pb] ou 20 [Pb + 5 mg L-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer. ★: diferença estatística significativa.



**Figura 11** - Determinação da concentração de NO, mensurado como nitrito, em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 10 [B10.A ou Pb] ou 20 [Pb + 5 mg L-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

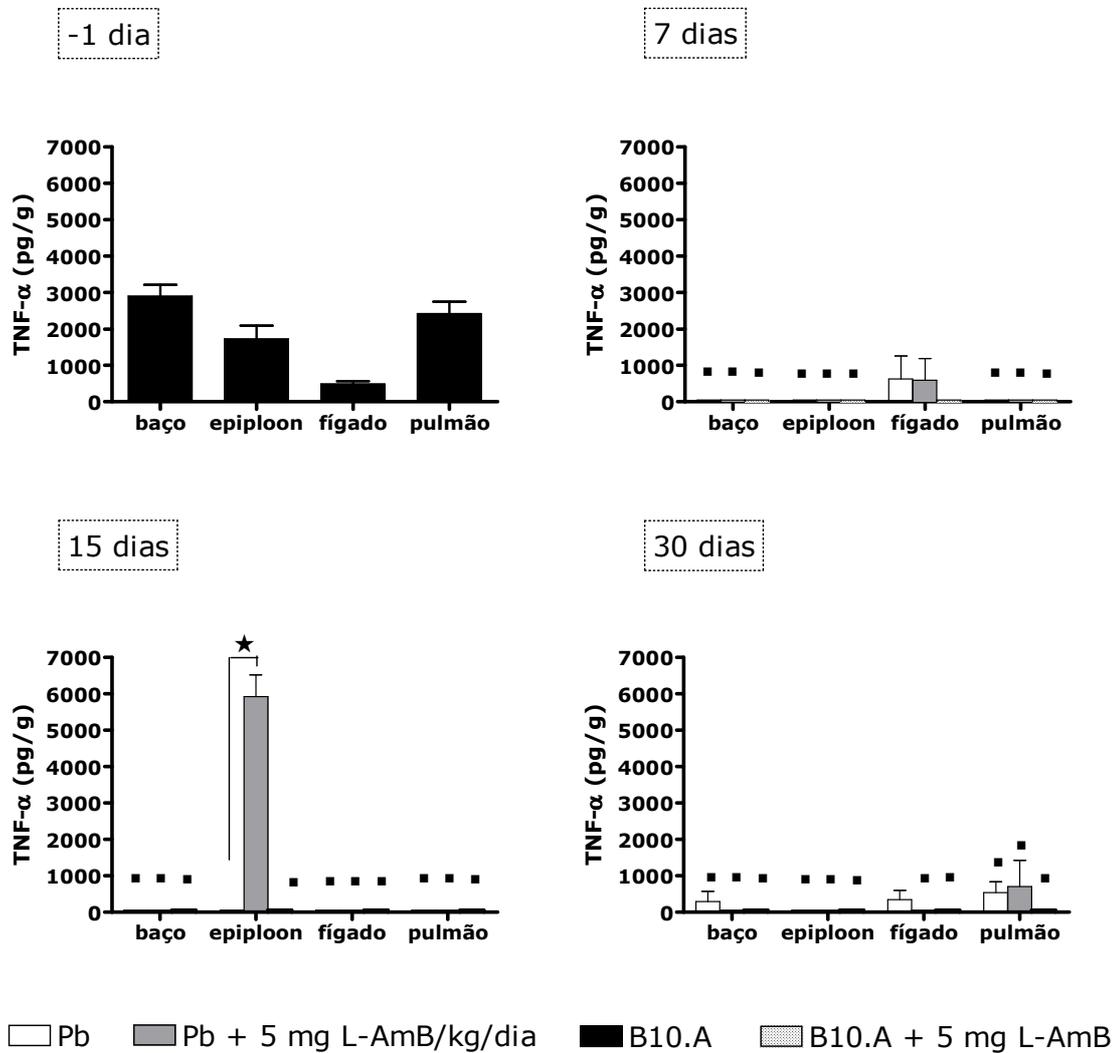
★: diferença estatística significativa entre os grupos experimentais

▪: diferença estatística significativa em relação ao dia -1.

No epiploon, no fígado e no pulmão, as concentrações de NO são significativamente menores nos indivíduos submetidos à terapia do que nos controles não tratados. Já aos 15 dias de infecção, as concentrações apresentadas por indivíduos tratados e não tratados no baço e no pulmão são bastante semelhantes. No epiploon e no fígado, porém, indivíduos que receberam L-AmB apresentam níveis de NO significativamente menores do que os camundongos apenas infectados. Aos 30 dias de infecção, as concentrações de NO no baço e no fígado não são alteradas pela administração da terapia. No epiploon e no pulmão, porém, há diminuição significativa da secreção de NO em animais tratados. Em relação ao observado antes da infecção, há aumento na síntese deste reativo no epiploon em animais apenas infectados, nos três tempos analisados, e no fígado, no 15º dia da doença.

Os resultados obtidos através da determinação da concentração de TNF- $\alpha$  são mostrados na **Figura 12**.

Antes da infecção, a citocina é encontrada em níveis relativamente elevados em todos os órgãos estudados. Aos 7 dias de infecção, o TNF- $\alpha$  não é detectado em sobrenadantes de baço, epiploon e pulmão; no fígado, as concentrações da citocina são similares nos três grupos experimentais. Na segunda semana de infecção, não há secreção do reativo no baço, no fígado e no pulmão em camundongos infectados submetidos ou não ao tratamento. No epiploon, o TNF- $\alpha$  é encontrado apenas nos indivíduos infectados e submetidos à terapia, em níveis significativamente altos. Já aos 30 dias, esta citocina é encontrada apenas em sobrenadantes de baço e fígado de animais apenas infectados e no pulmão de indivíduos dos três grupos experimentais. Diferenças estatísticas significativas em relação às concentrações de TNF- $\alpha$  encontradas antes da infecção são observadas nos três grupos experimentais nos três tempos analisados, exceto no fígado, aos 7 e 30 dias (em camundongos infectados e tratados e infectados e não tratados, respectivamente) e no epiploon, aos 15 dias de infecção (em indivíduos infectados submetidos à terapia).



**Figura 12** - Determinação da concentração de TNF- $\alpha$  em camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia.

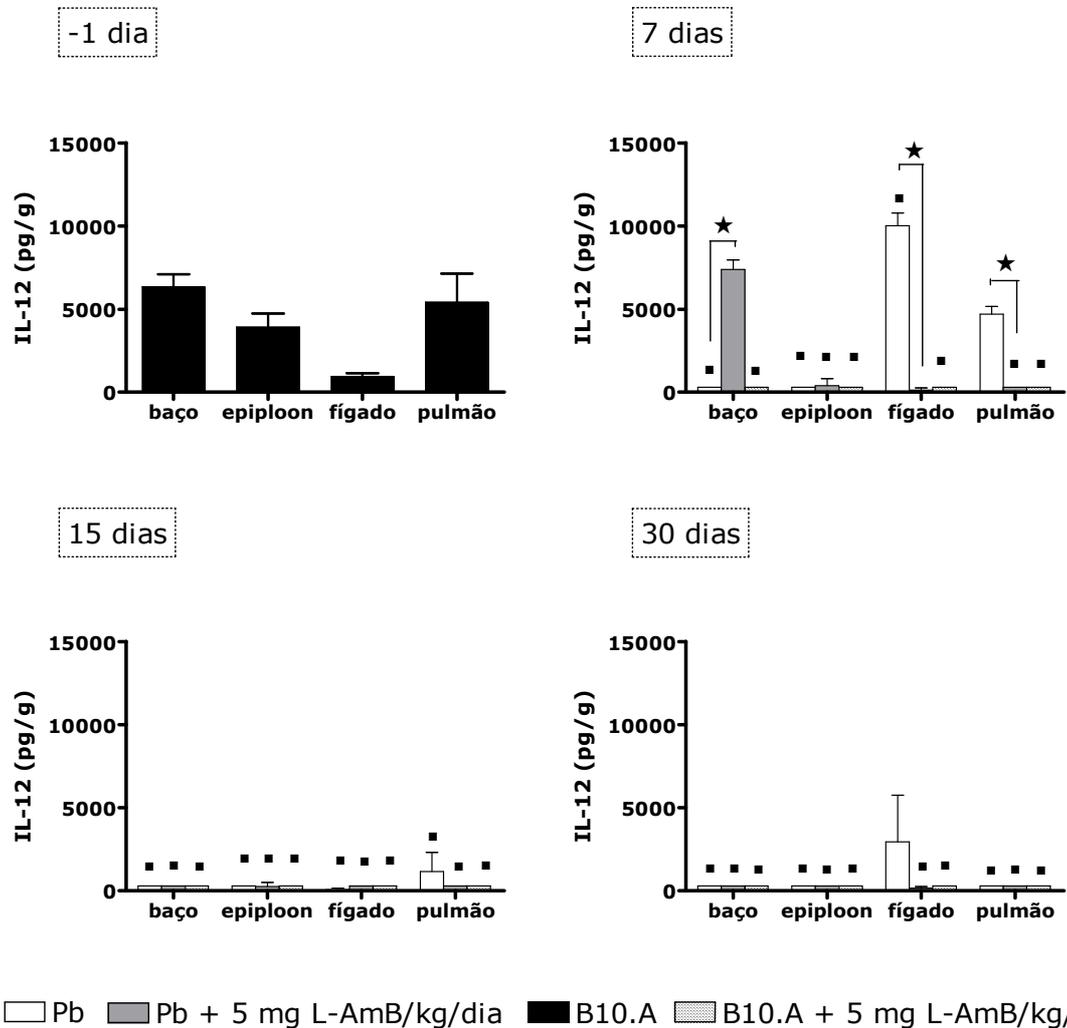
As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 10 [Pb, B10. A ou B10.A + 5 mg L-AmB/kg/dia] ou 20 [Pb + 5 mg L-AmB/kg/dia]) e submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre os grupos experimentais; ■: diferença estatística significativa em relação ao dia -1.

Em relação aos resultados obtidos nas quantificações de IL-12 (**Figura 13**), observa-se que, antes da infecção, a citocina é detectada em concentrações relativamente altas em todos os órgãos analisados. Aos 7 dias, nos animais apenas infectados, a citocina não é encontrada no baço e no epiploon; no fígado e no pulmão, as concentrações de IL-12 são mais altas e significativamente maiores do que as encontradas em animais infectados e submetidos à terapia. Nos indivíduos infectados e tratados, concentrações significativamente mais elevadas da citocina são observadas no baço e níveis muito baixos são detectados no epiploon. Nos outros dois tempos de infecção, praticamente não há secreção de IL-12, exceto no pulmão e no fígado de camundongos não infectados ou tratados, respectivamente, aos 15 e 30 dias.

Na **Figura 14**, são mostrados os resultados referentes à quantificação de IFN- $\gamma$ . Antes da infecção, níveis moderados da citocina são encontrados. Aos 7 dias, não há secreção de IFN- $\gamma$  no baço e no epiploon de camundongos infectados e submetidos ou não à terapia e no pulmão de indivíduos inoculados e tratados. No fígado, em indivíduos infectados, infectados e tratados ou apenas tratados, e no pulmão de animais controles, as concentrações da citocina são mais altas. No entanto, não há diferenças estatísticas entre camundongos infectados e tratados ou não neste ponto da infecção. Aos 15 dias, apenas indivíduos não submetidos ao tratamento apresentam altos títulos de IFN- $\gamma$ ; tais concentrações são significativamente maiores do que as observadas em camundongos que receberam a droga. Finalmente, no 30º dia de infecção, níveis elevados da citocina são encontrados nos sobrenadantes de fígado e pulmão de camundongos apenas infectados; novamente, estes títulos são significativamente maiores do que os verificados em animais infectados e tratados.

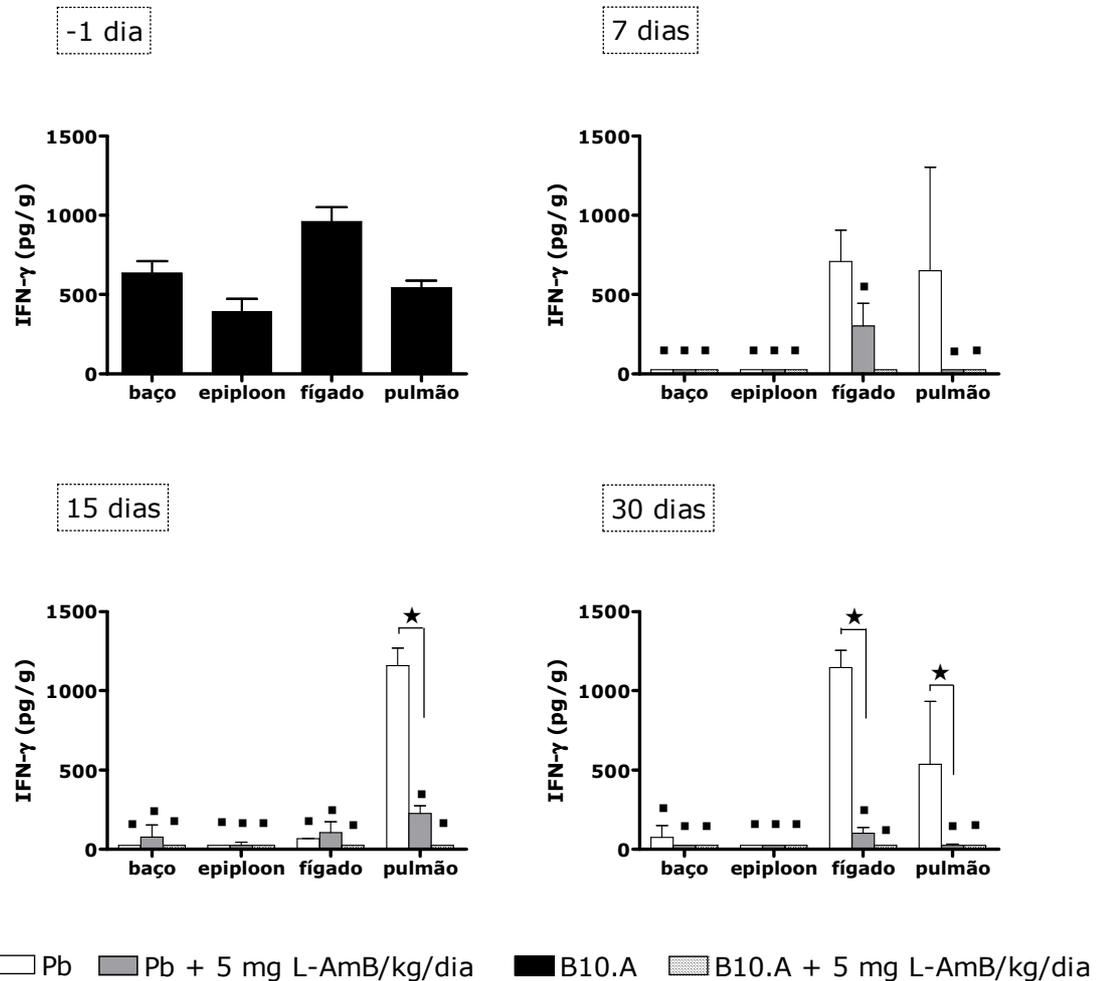
Os resultados referentes às dosagens de GM-CSF são mostrados na **Figura 15**. Aos 7 dias de infecção, as concentrações da citocina no baço e no pulmão são significativamente maiores nos camundongos infectados e submetidos à terapia com L-AmB do que em indivíduos apenas infectados.



**Figura 13** - Determinação da concentração de IL-12 em camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 10 [Pb, B10.A ou B10.A + 5 mg L-AmB/kg/dia] ou 20 [Pb + 5 mg c-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

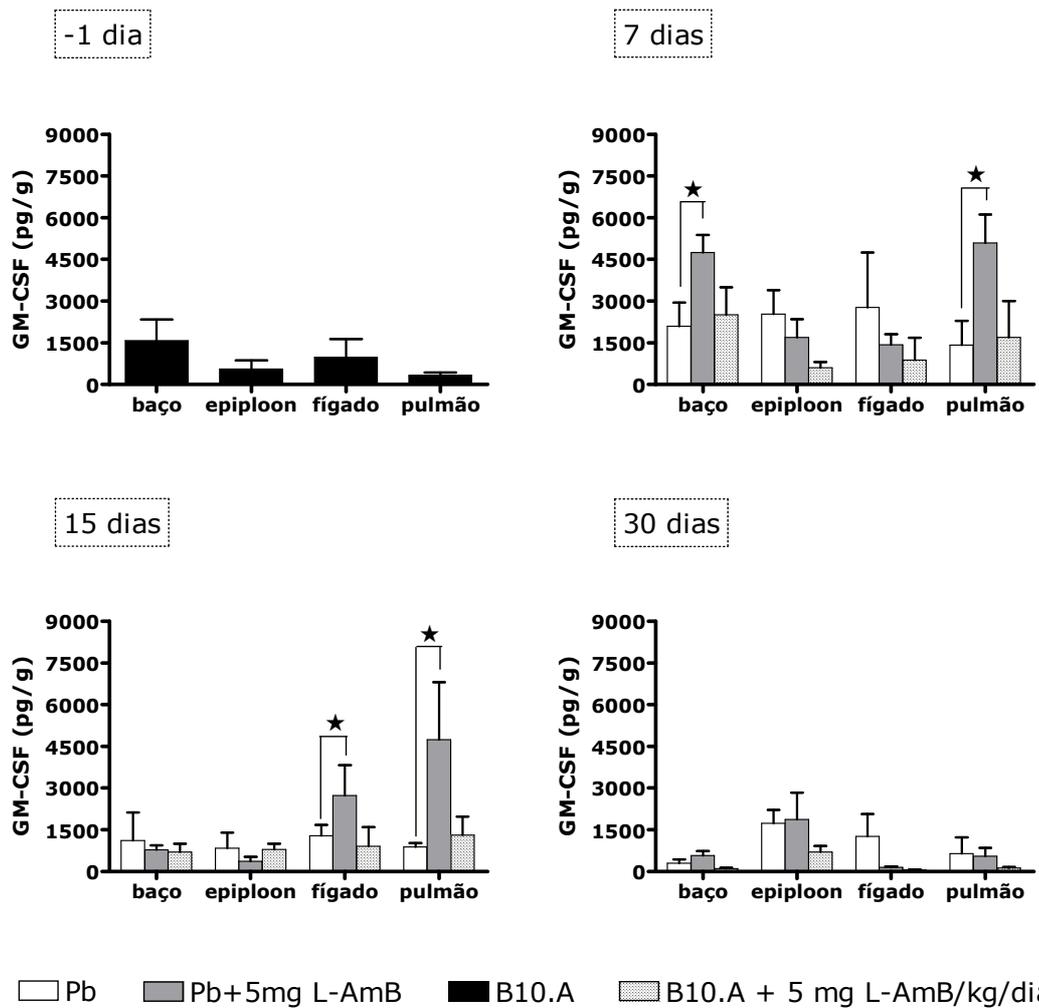
★: diferença estatística significativa entre os grupos experimentais; ▪: diferença estatística significativa em relação ao dia -1.



**Figura 14** - Determinação da concentração de IFN- $\gamma$  em camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 10 [Pb, B10.A ou B10.A + 5 mg L-AmB/kg/dia] ou 20 [Pb + 5 mg L-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre os grupos experimentais; ▪: diferença estatística significativa em relação ao dia -1.



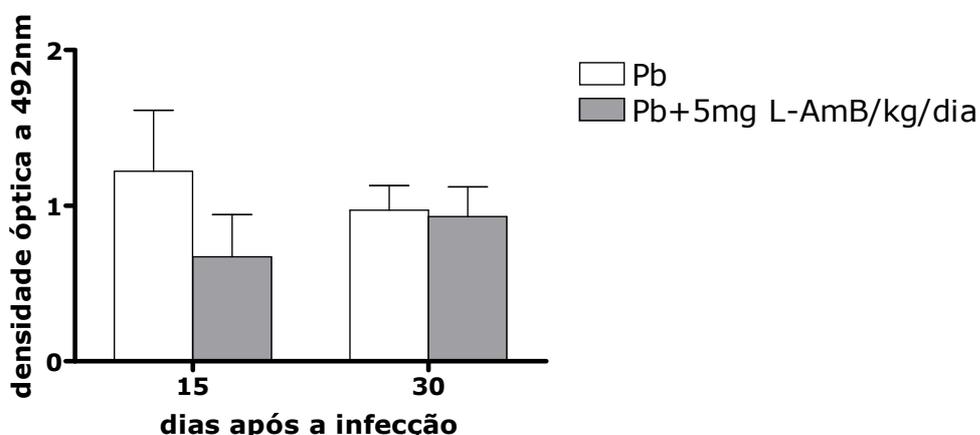
**Figura 15** - Determinação da concentração de GM-CSF em camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 10 [Pb, B10.A ou B10.A + 5 mg L-AmB/kg/dia] ou 20 [Pb + 5 mg L-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre os grupos experimentais.

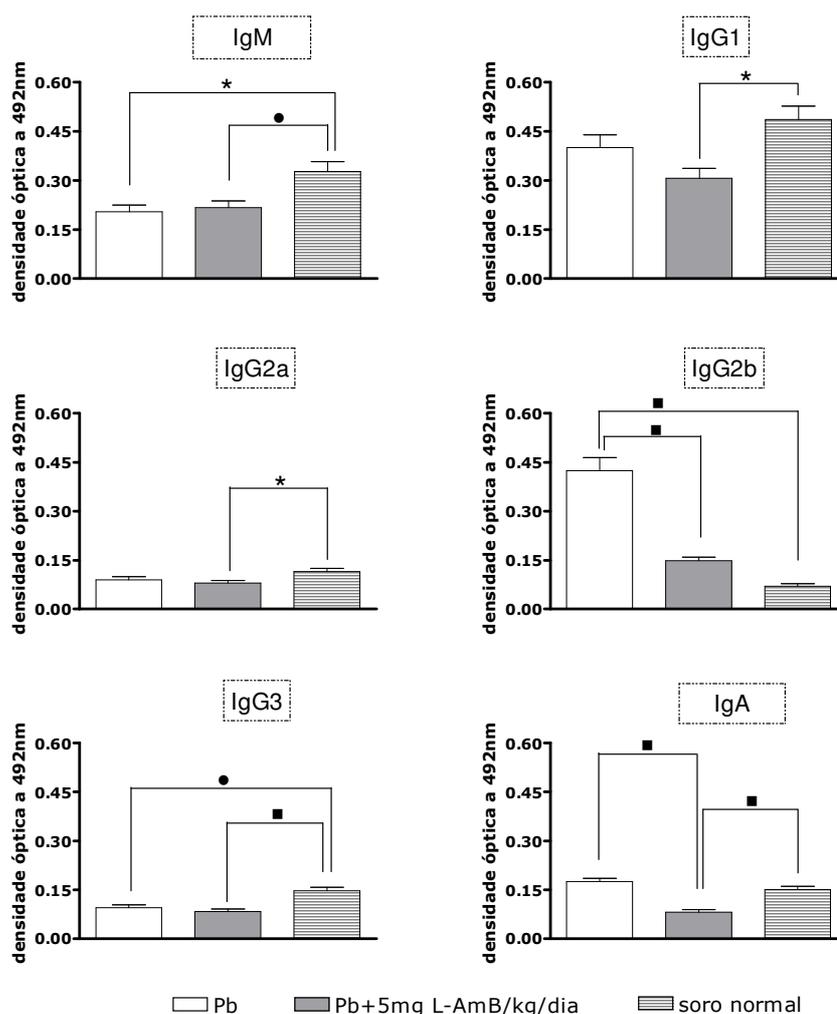
No epiploon e no fígado, os níveis de GM-CSF são similares nestes dois grupos experimentais. Aos 15 dias após a infecção, no fígado e no pulmão, as concentrações da citocina são significativamente maiores em camundongos infectados e submetidos ao tratamento do que nos controles apenas infectados. Aos 30 dias, não são encontradas diferenças estatísticas significativas entre os níveis de GM-CSF observados nos três grupos experimentais.

A titulação de IgG total anti-gp43 de *P. brasiliensis* é mostrada na **Figura 16**. A densidade óptica média obtida nos controles negativos (soros de camundongos não infectados) é igual  $-0,023$ , enquanto a de controles positivos (soros de camundongos B10.A infectados há 30 dias com Pb18) é de  $0,534$ . Nota-se que, aos 15 e 30 dias de infecção, em animais submetidos ou não ao tratamento com  $5\text{ mg L-AmB/kg/dia}$ , as concentrações séricas de IgG-anti-gp43 de *P. brasiliensis* são similares.



**Figura 16** - Titulação de IgG total anti-gp43 de *P. brasiliensis* em soros de camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com  $5\text{ mg L-AmB/kg/dia}$ , aos 15 e 30 dias após a infecção. Os soros foram diluídos a 1:50 antes da realização do ensaio. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos ( $N = 10$  [B10.A ou Pb] ou  $20$  [Pb +  $5\text{ mg L-AmB/kg/dia}$ ]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

Na **Figura 17**, são mostrados os resultados referentes à pesquisa de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM anti-gp43 de *P. brasiliensis* em soros de camundongos B10.A infectados e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 30 dias de infecção, e também em soros normais, de animais desta mesma linhagem não inoculados com o fungo (controles negativos).



**Figura 17** - Titulação de anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis* de isótipos IgM, IgG1, IgG2, IgG3 e IgA em soros de camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 30 dias após a infecção.

Os isótipos também foram titulados em soros obtidos de camundongos B10.A não infectados. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de dois experimentos (N = 10 [B10.A ou Pb] ou 20 [Pb + 5 mg L-AmB/kg/dia]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★, •, ▪: diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ ,  $0,01$  e  $0,001$ , respectivamente.

As concentrações de IgM, IgG2a e IgG3 observadas em ambos os grupos experimentais são similares e consideradas baixas. Os títulos de IgG2b são significativamente mais altos em animais apenas infectados do que nos submetidos ao tratamento. Por fim, as concentrações de IgA são significativamente menores em camundongos tratados do que naqueles apenas infectados.

Na **Tabela IV**, são colocados os resultados referentes às análises anátomo-patológicas. Nota-se que, nos três tempos após a infecção, as lesões encontradas em camundongos apenas inoculados são mais graves do que as observadas nos indivíduos submetidos à terapia. Aos 30 dias, percebe-se ainda que as lesões encontradas em animais submetidos ao tratamento tendem a ser de menor gravidade do que as observadas aos 7 e 15 dias de infecção. Em nenhum dos indivíduos analisados observam-se lesões na área de inoculação da droga.

Às análises histopatológicas de baço, epíplon, fígado e pulmões em cortes corados com HE, nota-se que, em camundongos apenas infectados, não submetidos à terapia com 5mg L-AmB/kg/dia, as lesões são bastante similares às relatadas anteriormente nas Pranchas I a VI (dados não mostrados). Aos 7 dias de infecção, nos indivíduos tratados, não são observadas lesões no baço (**Prancha VI**), no epíplon, no fígado ou no pulmão. Aos 15 dias de infecção, observam-se, no epíplon de animais submetidos à terapia, lesões necróticas concêntricas, contendo *debris* de *P. brasiliensis* (**Prancha VII**). Nos demais órgãos, não são observadas alterações dignas de nota. Aos 30 dias de infecção, em ambos os grupos experimentais, as lesões esplênicas não diferem de forma expressiva daquelas encontradas na primeira quinzena da doença. No epíplon de animais não submetidos ao tratamento com L-AmB, observam-se numerosas lesões de natureza necrótica, compostas por fungos, plasmócitos (seta), células gigantes (seta aberta), linfócitos e eosinófilos (ponta de seta) (**Prancha VIII A**). Nos camundongos tratados, o número e a gravidade das lesões não são diferentes dos encontrados nos indivíduos apenas infectados. Nestas lesões, observa-se um grande

**Tabela IV** - Exame anátomo-patológico em camundongos B10.A inoculados com Pb18 e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia, aos 7, 15 e 30 dias após a infecção.

	Ad	NE	HEp	CP	LAI	EM	HM	Pn
<b>Pb, 7d</b>	+	++	-	-	-	+	-	-
<b>Pb+L-AmB, 7d</b>		+	-	-	-	±	-	-
<b>Pb, 15d</b>	+++	++++	++	+++	-	+++	++++	+++
<b>Pb+L-AmB, 15d</b>	-	±	-	-	-	++	+	±
<b>Pb, 30d</b>	-	+	++	±	-	+	+	-
<b>Pb+L-AmB, 30d</b>	-	-	±	-	-	±	-	-

Dados representativos de dois experimentos ( $N = 10$  [Pb] ou  $20$  [Pb + L-AmB]).

NOTA: Abreviaturas e símbolos:

Ad: aderência das vísceras ao peritônio e entre sistema imunológico

NE: necrose esplênica

HEp: hiperplasia do epíloon

CP: comprometimento do peritônio (presença de focos fúngicos na serosa)

LAI: lesão peritoneal em área condizente com a inoculação de L-AmB

EM: esplenomegalia

HM: hepatomegalia

Pn: pneumonia

(-): nada digno de nota

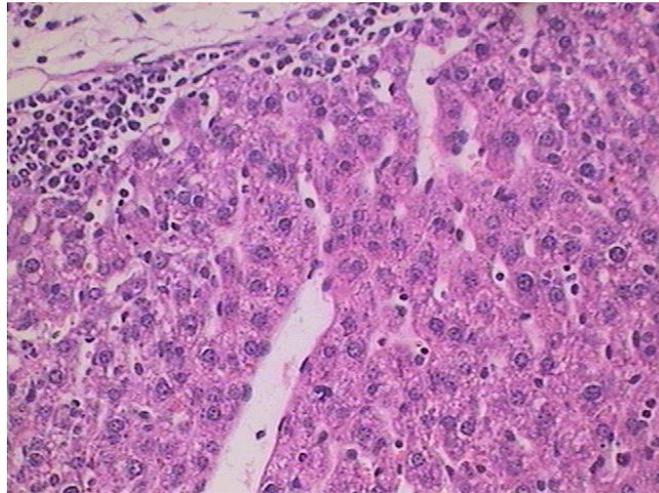
(±): muito discreto

(+): discreto

(++): moderado

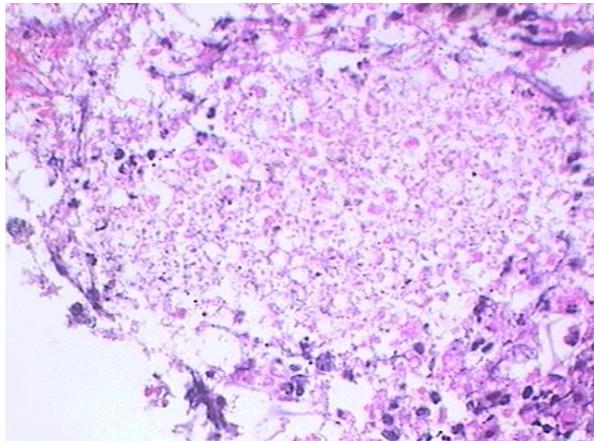
(+++): grave

(++++): muito grave

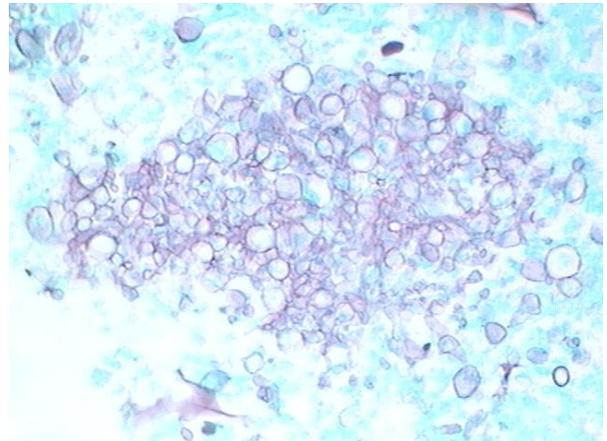


**Prancha VI** – Ausência de lesões, aos 7 dias após a infecção, em baço de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia; HE, 245x.

A



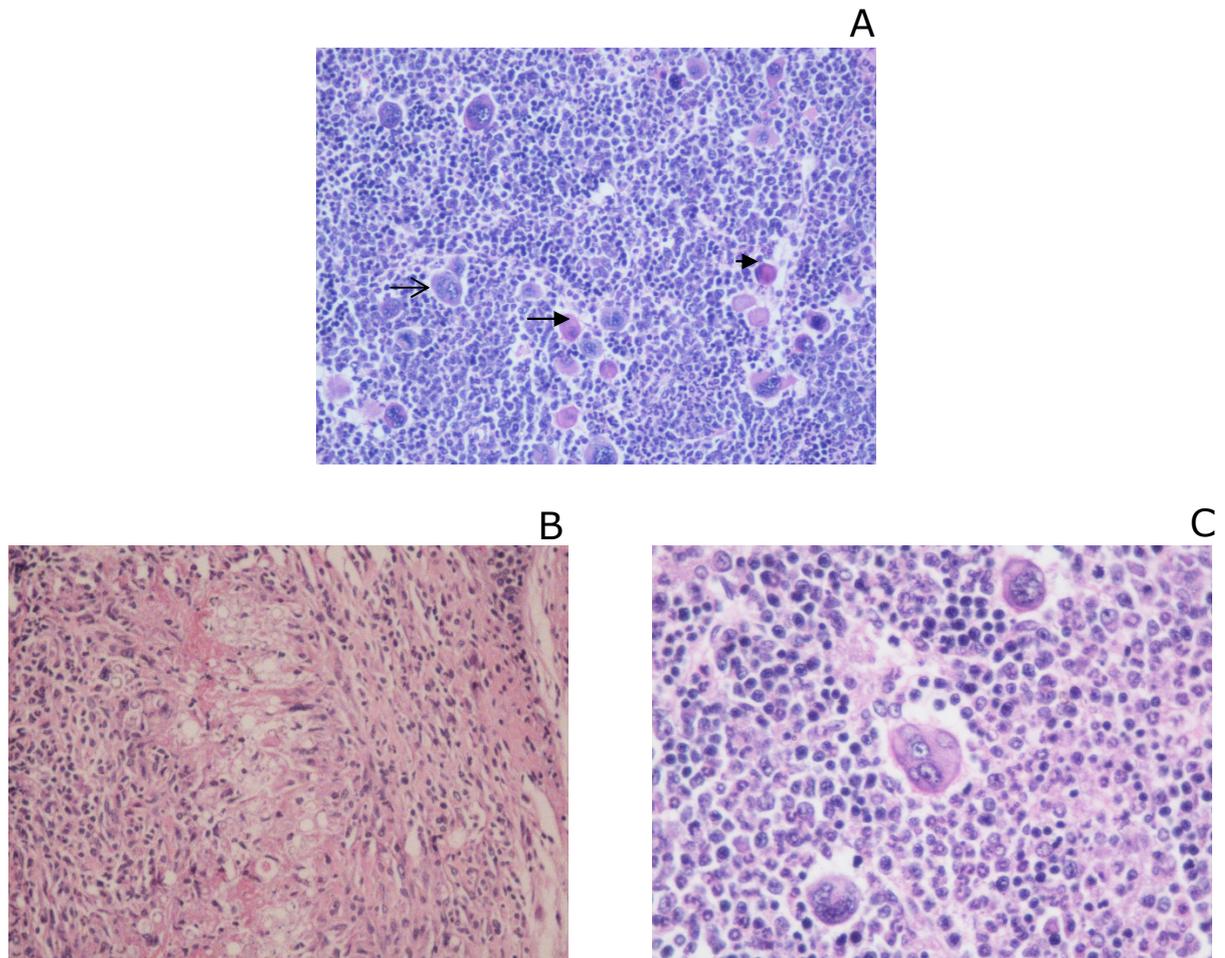
B



**Prancha VII** - Análise histopatológica aos 15 dias pós-infecção realizada em epiploon de camundongos infectados com o isolado virulento Pb18 e submetidos a tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia.

A: lesão necrótica concêntrica; HE, 614x.

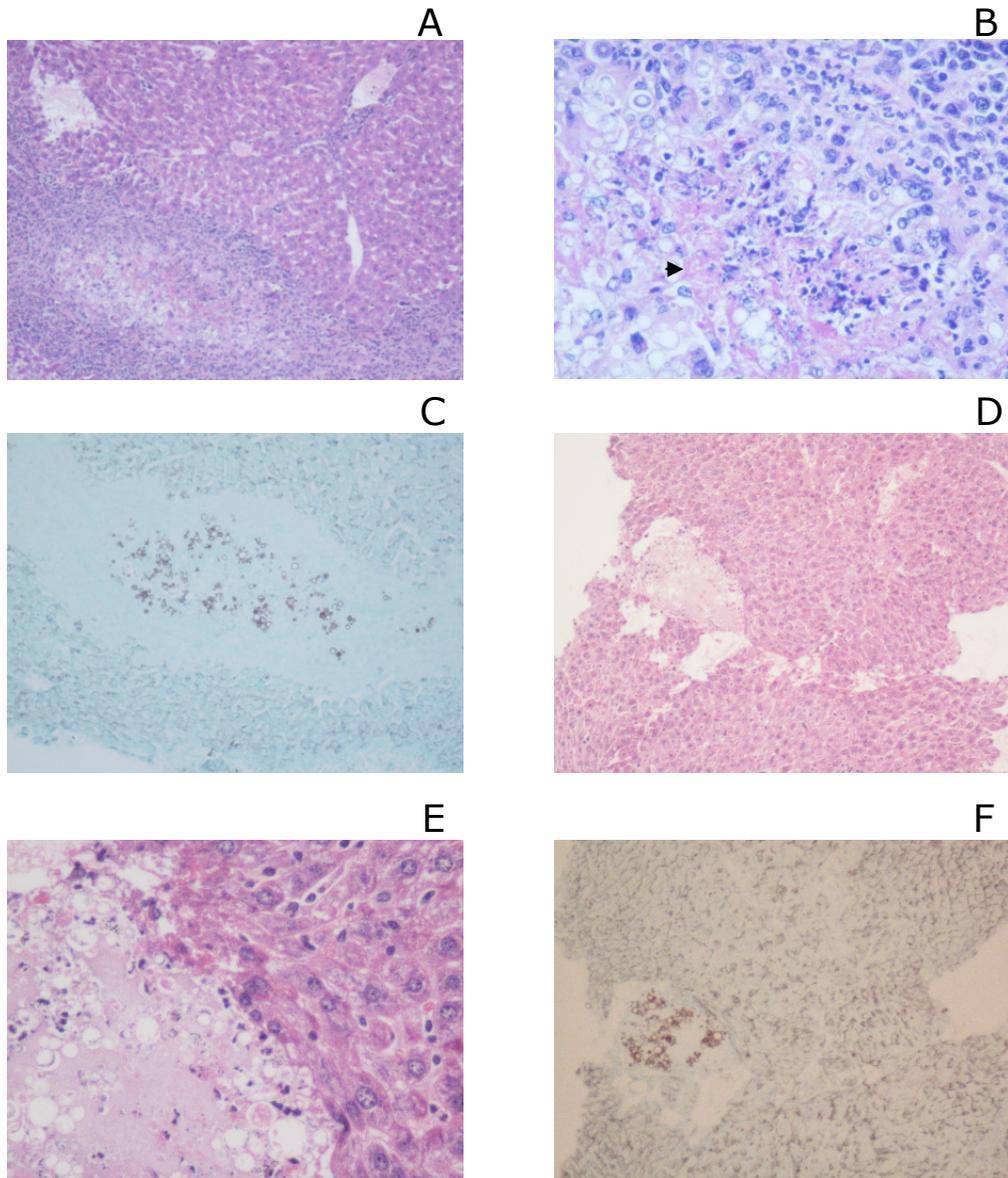
B: focos de debris de *P. brasiliensis*; prata-metamina, 614x.



**Prancha VIII** - Análise histopatológica em epiploon de camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não ao tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia, 30 dias após a infecção.  
A: lesão em camundongos não tratados. São observados plasmócitos (seta), eosinófilos (ponta de seta), linfócitos, células gigantes (seta aberta) e leveduras de *P. brasiliensis*; HE, 614x.  
B e C: lesão em camundongos tratados, com células gigantes, linfócitos, extravasamento de material extracelular, leveduras de *P. brasiliensis* e acúmulo de matriz extracelular; HE, 245x e 614x.

número de fungos, acompanhados por células gigantes, linfócitos, extravasamento de material extracelular e acúmulo de matriz extracelular (MEC) (**Pranchas VIII B e VIII C**). Novamente, observam-se extensas lesões granulomatosas no fígado dos indivíduos não tratados; estas lesões são compostas por *debris* celulares, células gigantes, linfócitos, extravasamento de material extracelular, leveduras de *P. brasiliensis* e acúmulo de MEC (**Pranchas IX A e IX B**). À coloração pela prata, são observados fungos de morfologia preservada. Nos camundongos submetidos à terapia, o número e a gravidade das lesões são menores. Nas **Pranchas IX D e IX E**, observa-se uma pequena lesão localizada na cápsula hepática, com poucas leveduras (mostradas na **Prancha IX F**, coradas com prata-metamina) e linfócitos. No parênquima do órgão, não são observadas alterações dignas de nota. Os pulmões de animais de ambos os grupos experimentais não apresentam lesões.

Os resultados referentes às análises semiquantitativas da presença de *P. brasiliensis* nos órgãos de camundongos infectados submetidos ou não ao tratamento com L-AmB são mostrados na **Tabela V**. Aos 7 dias de infecção, camundongos não tratados apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no baço e no fígado. No epíplon, são encontradas leveduras com morfologia preservada. No pulmão, não são observadas leveduras do fungo. Por outro lado, nos camundongos submetidos à terapia, encontram-se pouquíssimas leveduras, com morfologia alterada, no baço, epíplon e fígado; no pulmão, novamente, não são observadas leveduras de *P. brasiliensis*. Já aos 15 dias de infecção, camundongos não tratados apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia preservada no baço, no epíplon e no fígado e com morfologia alterada no pulmão. Camundongos tratados, por sua vez, apresentam predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no baço e pequena quantidade de fungo com morfologia alterada no epíplon. Nestes animais, não são observadas leveduras do fungo no pulmão. Aos 30 dias de infecção, em camundongos apenas infectados, verifica-se o predomínio de leveduras de morfologia preservada nos



**Prancha IX** - Análise histopatológica em fígado de camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não ao tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia, 30 dias após a infecção.  
A e B: lesão em camundongos não tratados, com *debris* celulares, células gigantes, linfócitos, extravasamento de material extracelular, leveduras de *P. brasiliensis* e acúmulo de matriz extracelular (ponta de seta); HE, 245x e 614x.  
C: em camundongos não tratados, são observadas leveduras de *P. brasiliensis* de morfologia preservada; prata-metamina, 245x.  
D e E: em camundongos tratados, pequena lesão localizada na cápsula hepática, com poucas leveduras e linfócitos. HE, 245x e 614x.  
F: presença de leveduras de *P. brasiliensis* em camundongos tratados; prata-metamina, 245x.

quatro órgãos avaliados. Nos animais submetidos à terapia, há predomínio de *P. brasiliensis* de morfologia alterada, com presença de leveduras de morfologia preservada, no baço e no fígado, e predomínio de fungos de morfologia preservada no epiploon. No pulmão, não são observadas leveduras de *P. brasiliensis*.

**Tabela V** - Análise semiquantitativa de *P. brasiliensis* de diferentes aspectos morfológicos em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata em camundongos B10.A infectados com Pb18 e submetidos ou não ao tratamento com 5 mg L-AmB/kg/dia.

	Baço	Epiploon	Fígado	Pulmão
<b>Pb, 7d</b>	+++	++++	+++	-
<b>Pb + L-AmB, 7d</b>	++	++	++	-
<b>Pb, 15d</b>	++++	++++	++++	+++
<b>Pb + L-AmB, 15d</b>	+++	++	++	-
<b>Pb, 30d</b>	++++	++++	++++	++++
<b>Pb + L-AmB, 30d</b>	+++	++++	+++	-

Dados representativos de dois experimentos ( $N = 10$  [Pb] ou  $20$  [Pb + L-AmB]).

NOTA:

(-): ausência completa de *P. brasiliensis*

(+): presença de poeira fúngica

(++): presença de pequena quantidade de *P. brasiliensis* com morfologia alterada e ausência de fungo com morfologia preservada

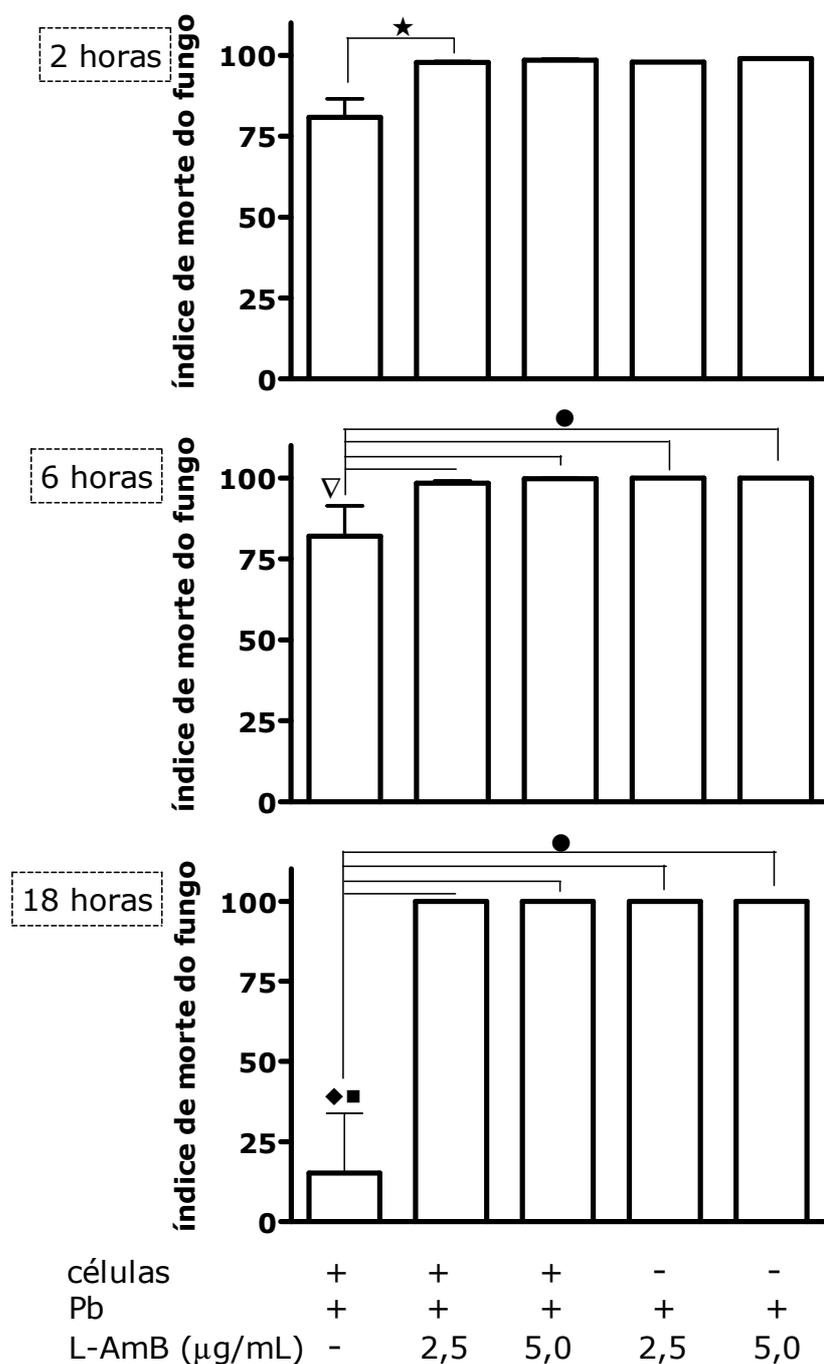
(+++): predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada, com presença de fungo com morfologia preservada

(++++): presença de *P. brasiliensis* com morfologia preservada

### **4.3 Determinação da capacidade fungicida e do estado de ativação de fagócitos peritoneais de camundongos B10.A infectados com Pb18 e expostos ou não a diferentes doses de L-AmB**

Os ensaios referentes à determinação da capacidade fungicida e do estado de ativação de neutrófilos e macrófagos foram realizados quatro vezes, empregando um total de 80 camundongos; os resultados aqui expressos correspondem à média dos dados obtidos em todos os experimentos. O número médio de células viáveis obtidas de cada animal é de  $(12,84 \pm 1,78) \times 10^6$  células, com aproximadamente 94,69% de viabilidade. No exsudato peritoneal, a concentração média de NO, mensurado sob a forma de nitrito, é de  $0,37 \pm 0,07 \mu\text{M}$  de nitrito/100  $\mu\text{L}$ . As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, porém, não são detectadas no exsudato. Após a separação das populações de células aderentes e não aderentes, o número médio de neutrófilos e macrófagos viáveis obtidos é, respectivamente, de  $(8,32 \pm 1,56) \times 10^6$  e  $(44,01 \pm 22,60) \times 10^6$ , com viabilidades médias observadas de  $98,10 \pm 0,62\%$  e  $91,60 \pm 1,77\%$ .

Nos ensaios referentes aos efeitos da interação entre neutrófilos de camundongos B10.A, leveduras de Pb18 e L-AmB sobre a morte do patógeno nota-se que, às 2 horas de co-cultivo (**Figura 18**), o menor índice de morte é apresentado pelas células incubadas com o fungo, sem a adição de L-AmB. Embora tais índices sejam similares nos demais grupos experimentais, diferenças significativas são encontradas apenas entre os co-cultivos de neutrófilos e fungos na presença ou não de 2,5  $\mu\text{g}$  L-AmB/mL ( $p < 0,05$ ). Às 6 horas, o índice de morte apresentado pelas células incubadas apenas com o fungo é significativamente menor que o observado na presença das duas concentrações L-AmB ou nos co-cultivos de fungo com a droga, sem a adição de células ( $p < 0,01$ ). Fenômeno similar é observado às 18 horas; porém, neste tempo, o índice de morte apresentado pelo co-cultivo de fungo com neutrófilos é muito inferior aos anteriormente observados; além disso, a diferença entre este grupo experimental e àquele acrescido de 2,5  $\mu\text{g}$  L-AmB/mL ocorreu em nível de



**Figura 18** - Índice de morte do fungo após diferentes tempos de co-cultivo de neutrófilos com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB.

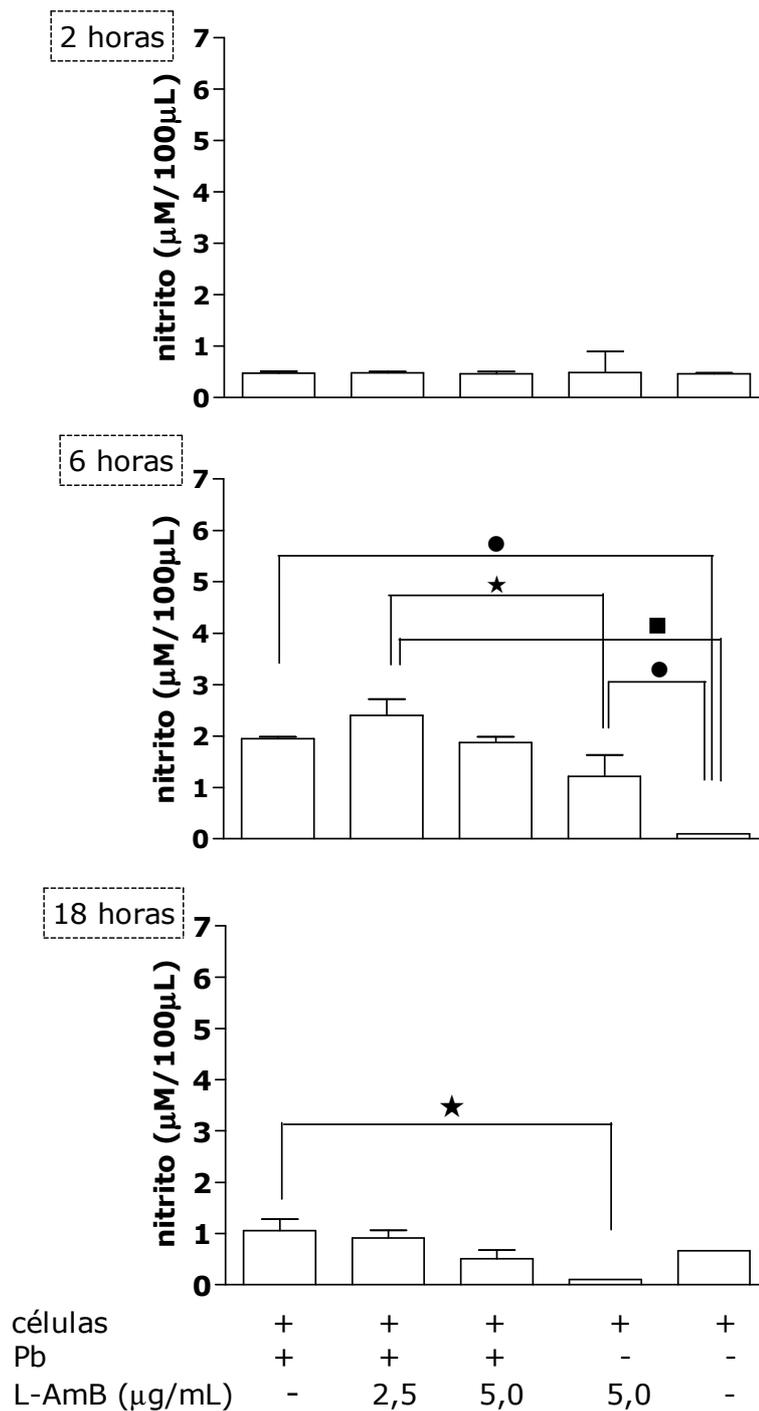
As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de quatro experimentos (N = 80 animais), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★, ●, ■: diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ ,  $0,01$  e  $0,001$ , respectivamente. ◆, ▽: diferença estatística significativa entre o índice de morte de [células + Pb] observado entre 2h ou 6h e 18h,  $p < 0,01$  e  $0,001$ , respectivamente.

significância ainda menor, de  $p < 0,001$ . A viabilidade dos neutrófilos, nos três pontos analisados, foi similar e acima de 80% (dados não mostrados). Embora os neutrófilos peritoneais apresentem capacidade fungicida mesmo quando não estimulados com L-AmB, esta diminui ao longo da incubação, sendo significativamente maior às 2 ou 6 horas em relação às 18 horas ( $p < 0,001$  e  $0,01$ , respectivamente).

Os resultados referentes à produção de NO por neutrófilos submetidos às diferentes condições de co-cultivo são mostrados na **Figura 19**. Às 2 horas de co-cultivo, a síntese de NO é baixa e similar nos diferentes grupos experimentais. Às 6 horas de cultura, a produção do reativo tende a aumentar, exceto no controle composto apenas por células, onde o NO é encontrado em níveis significativamente menores do que os observados em células incubadas apenas com o fungo ou a droga ou ainda com o fungo e  $2,5 \mu\text{g L-AmB/mL}$  ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Na 18ª hora de incubação, a produção do reativo diminui em todos os grupos experimentais, em especial naquele onde os neutrófilos são incubados apenas com a droga na dose de  $5 \mu\text{g L-AmB/mL}$ ; em tais células, a síntese do reativo é significativamente menor do que à observada nos neutrófilos co-cultivados com leveduras de *P. brasiliensis*.

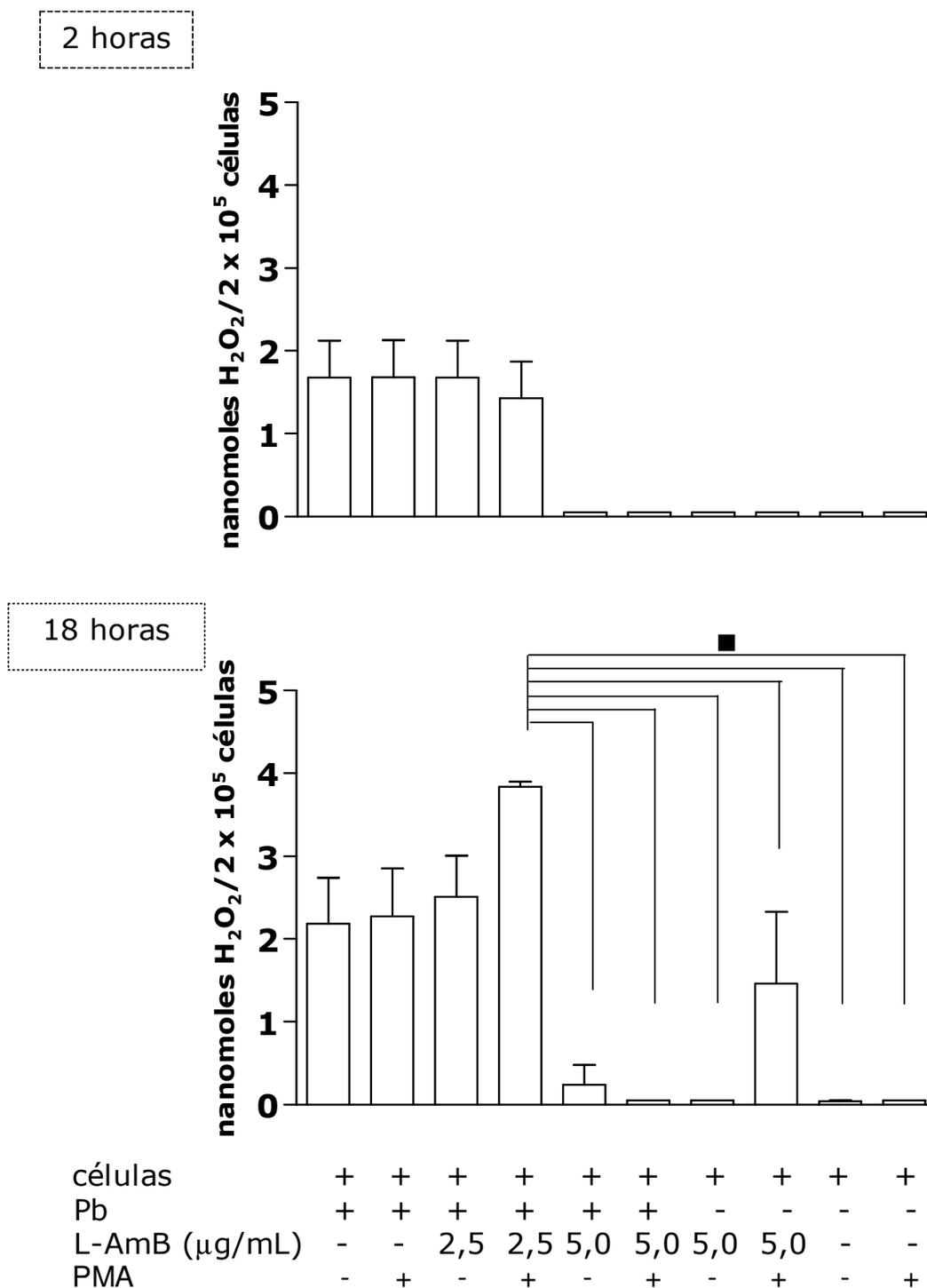
Os resultados obtidos na quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  após o co-cultivo de neutrófilos com Pb18 e L-AmB encontram-se na **Figura 20**. A adição de PMA aos co-cultivos não altera de maneira expressiva a síntese deste metabólito. Às 2 horas, apenas neutrófilos co-cultivados com fungo e expostos ou não à dose de  $2,5 \mu\text{g L-AmB/mL}$  produzem o reativo; diferenças significativas não são observadas. Às 6 horas de cultura, o reativo não é detectado em nenhum dos diferentes co-cultivos (dados não mostrados). Na 18ª hora de incubação, os neutrófilos co-cultivados com leveduras de *P. brasiliensis* e expostos ou não às duas doses de L-AmB (exceto as células cultivadas com a maior dose e PMA) e os neutrófilos incubados apenas com a droga produzem  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A presença de PMA tende a elevar, embora não de forma significativa, a síntese deste metabólito



**Figura 19** - Concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em sobrenadantes de cultura de neutrófilos em diferentes tempos de co-cultivo de células com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de quatro experimentos (N = 80 animais), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★, •, ▪: diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ ,  $0,01$  e  $0,001$ , respectivamente.



**Figura 20** - Produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por neutrófilos, em diferentes tempos de co-cultivo com leveduras do isolado Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de quatro experimentos ( $N = 80$  animais), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

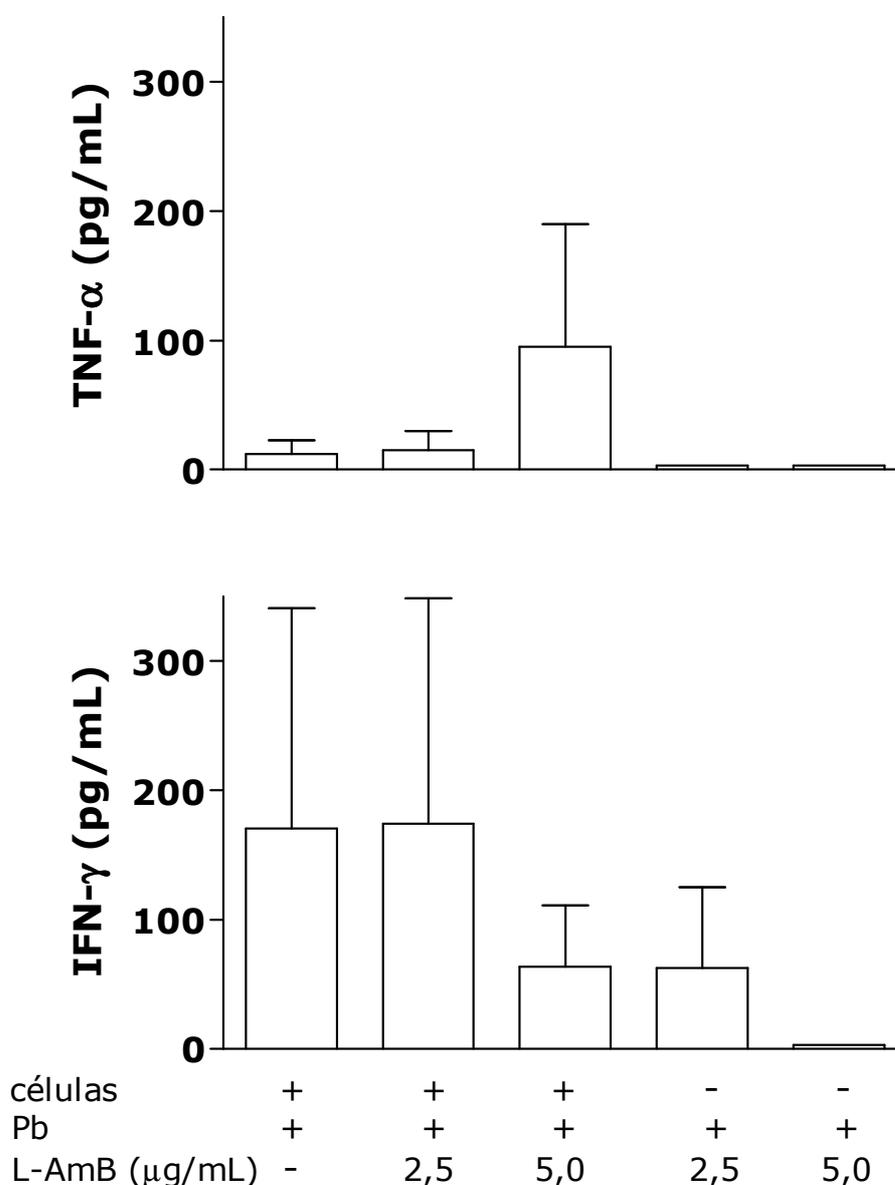
▪: diferença estatística significativa,  $p < 0,001$ .

nos grupos de células co-cultivadas com o fungo na presença ou não de 2,5 µg L-AmB/mL. Neutrófilos co-cultivados com fungo, a dose menor de droga e estimulados por PMA produzem significativamente mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que células co-cultivadas com 5 µg L-AmB/mL igualmente estimuladas ou não, apenas incubadas com a droga e estimuladas ou não ou neutrófilos sem adição de Pb18 ou L-AmB, estimuladas ou não ( $p < 0,01$ ).

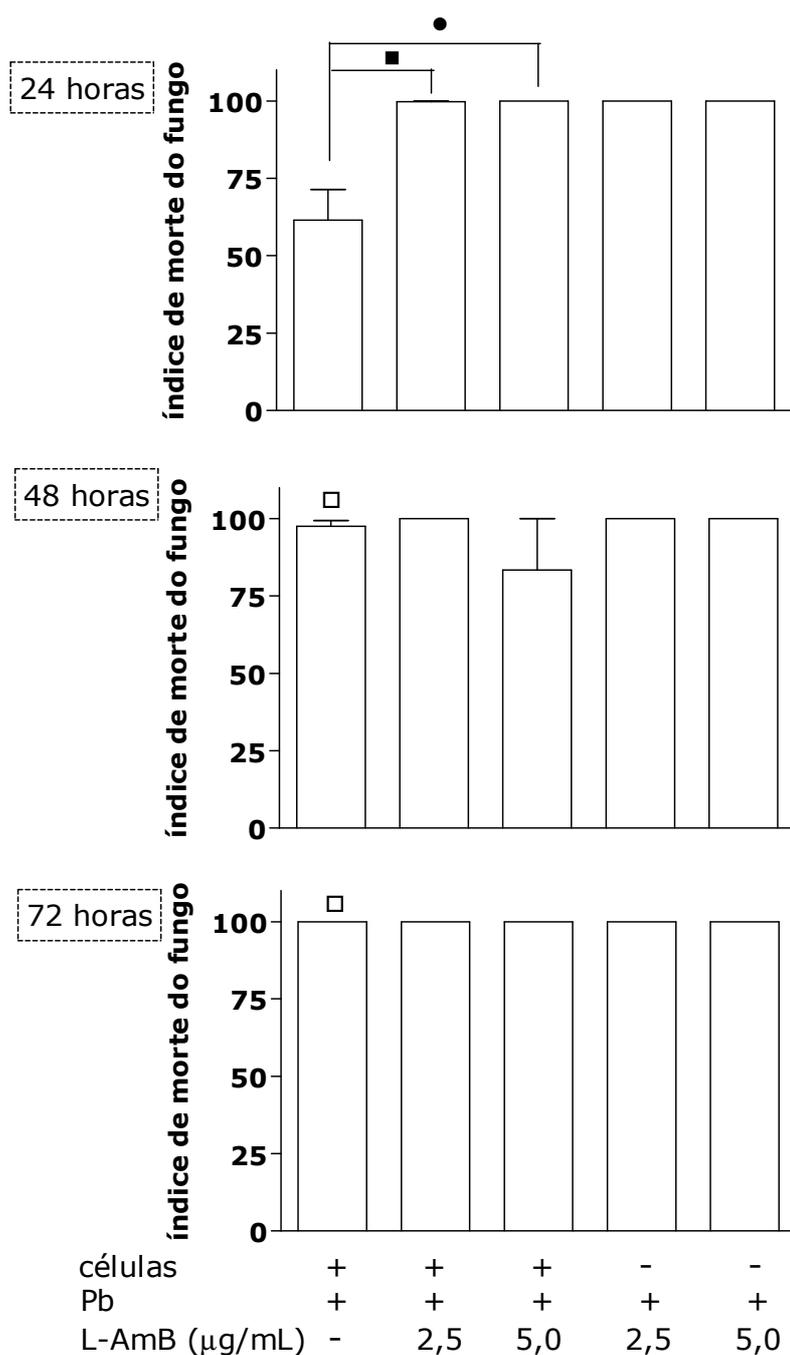
As citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , mas não IL-12, são detectadas nos sobrenadantes de co-cultivos apenas às 2 horas de incubação (**Figura 21**), mas não às 6 e 18 horas (dados não mostrados). Células incubadas com o fungo e 5µg L-AmB tendem a apresentar maior produção de TNF- $\alpha$  do que os demais co-cultivos, embora diferenças significativas não sejam encontradas. Já a síntese de IFN- $\gamma$  tende a ser superior nas células co-cultivadas com Pb18 na presença ou não da menor dose de L-AmB.

Os índices de morte do fungo após a interação entre macrófagos de camundongos B10.A, leveduras de Pb18 e L-AmB são mostrados na **Figura 22**. Observa-se que, às 24 horas, o índice de morte do fungo apresentado por estas células na ausência de L-AmB é significativamente inferior ao observado quando a droga é adicionada à cultura; nos demais grupos experimentais, os índices de morte são similares. Às 48 e 72 horas, os índices de morte de *P. brasiliensis* são semelhantes; diferenças significativas não são observadas. Nota-se também que os macrófagos matam o fungo de forma mais eficiente às 48 e 72 horas do que às 24 horas ( $p < 0,05$ ).

Os resultados referentes à quantificação de NO nos diferentes co-cultivos de macrófagos encontram-se na **Figura 23**. Células co-cultivadas apenas com o fungo sintetizam o reativo em níveis significativamente mais elevados do que células não expostas ao fungo na presença ou não de L-AmB ( $p < 0,05$ ). Macrófagos co-cultivados com leveduras e 5 µg L-AmB/mL produzem significativamente mais NO do que as células cultivadas com o fungo e a dose menor de L-AmB ( $p < 0,05$ ), células expostas apenas à droga ou macrófagos puros ( $p < 0,001$ ). Às 48 horas de incubação, o reativo não é detectado em células cultivadas sem o



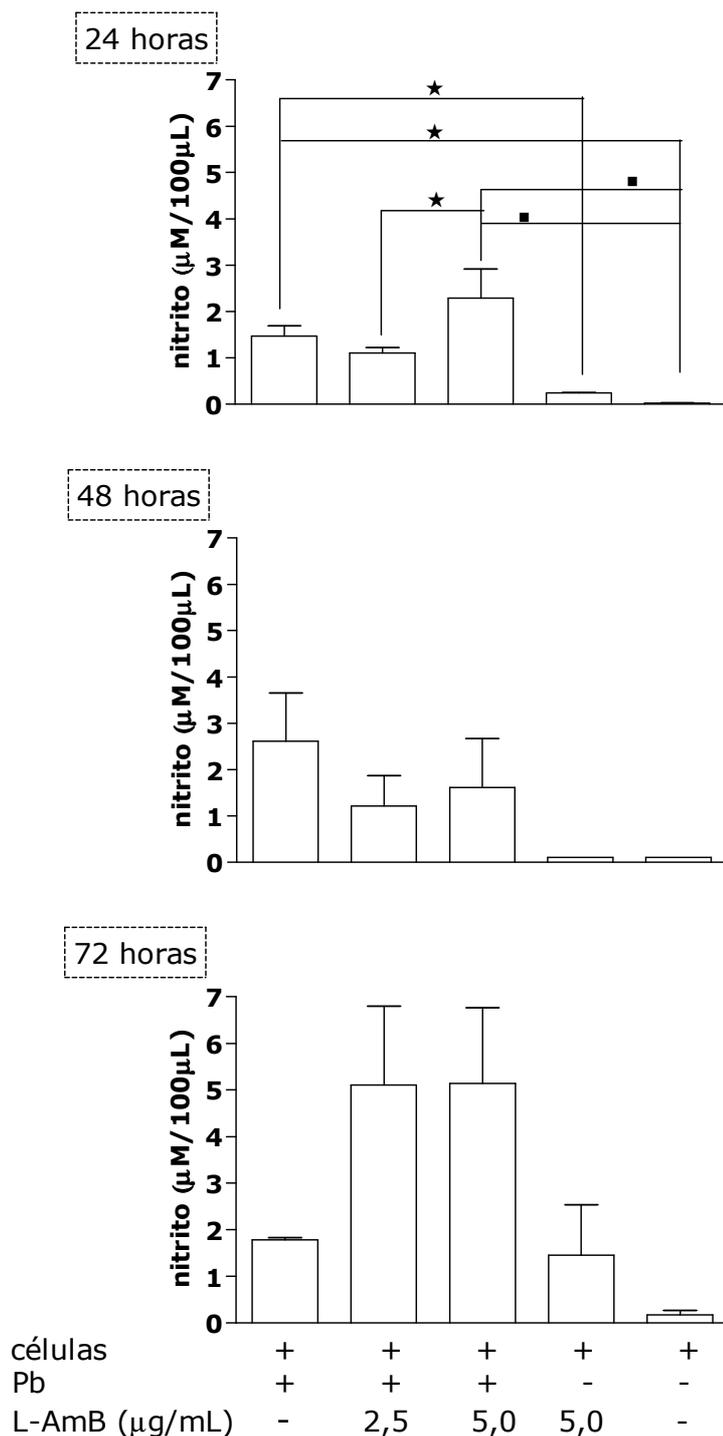
**Figura 21** - Concentração de citocinas em sobrenadantes de co-cultivos de neutrófilos com leveduras de Pb18 na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB, após 2 horas de incubação. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de quatro experimentos (N = 80 animais), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.



**Figura 22** - Índice de morte do fungo após diferentes tempos de co-cultivo de macrófagos com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de quatro experimentos (N = 80 animais), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

•, ▪: diferença estatística significativa,  $p < 0,01$  e  $0,001$ , respectivamente. ◻: diferença estatística significativa entre o índice de morte de [células + Pb] observado entre 24h e 48h ou 72h,  $p < 0,05$ .



**Figura 23** - Concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em sobrenadantes de cultura de macrófagos, em diferentes tempos de co-cultivo com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB.

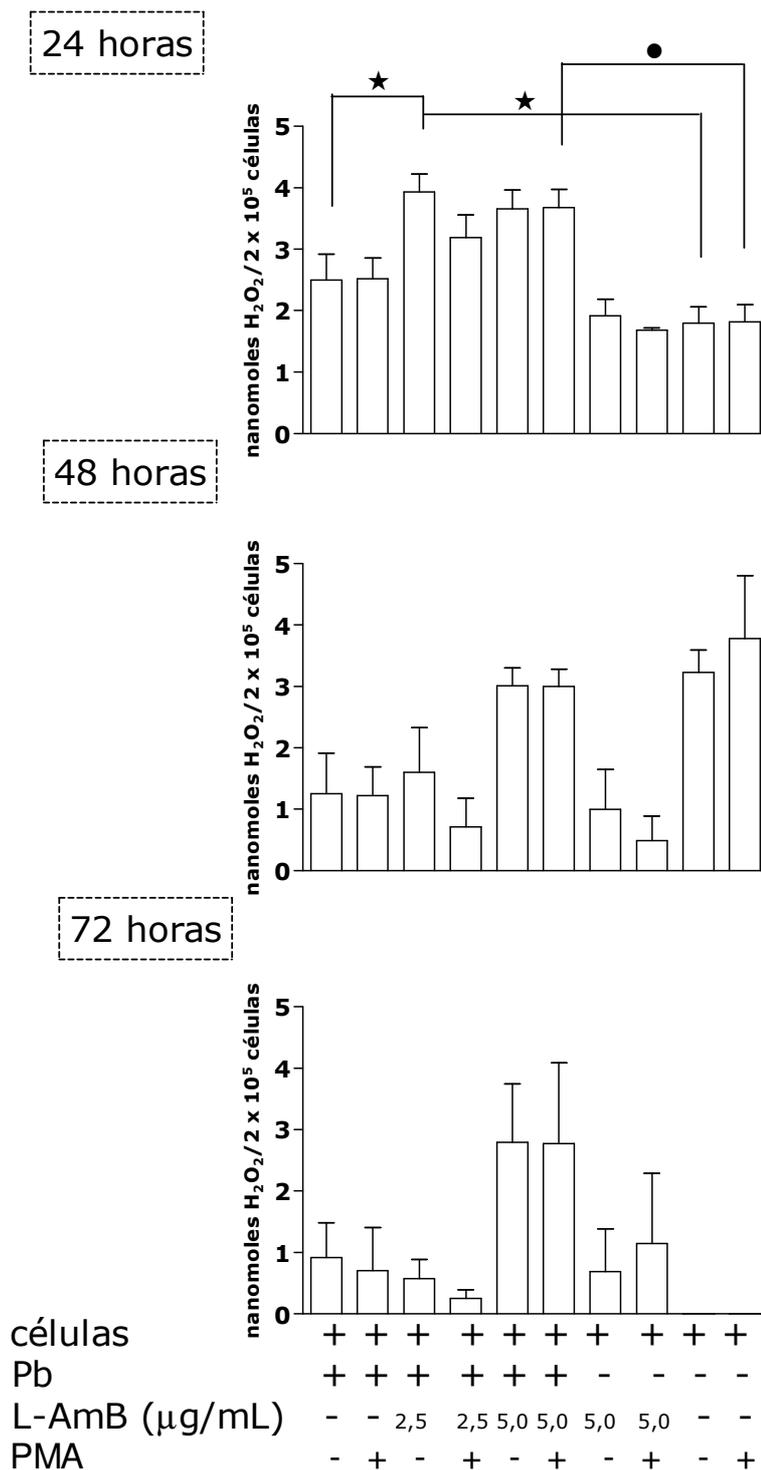
As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de quatro experimentos (N = 80 animais), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★ e ■: diferença estatística significativa,  $p < 0,05$  e  $0,001$ , respectivamente.

fungo; nos demais grupos experimentais, há síntese do reativo, mas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais não são detectadas. Por fim, às 72 horas de incubação, a produção do metabólito é relativamente alta nos dois grupos de macrófagos co-cultivados com o fungo e a droga e intermediária nas células expostas apenas ao patógeno ou à droga. Porém, novamente, diferenças significativas não são encontradas.

Já os resultados obtidos na determinação da concentração de  $H_2O_2$  encontram-se na **Figura 24**. Como mencionado na produção deste metabólito por neutrófilos, a adição de PMA nos co-cultivos não altera de maneira expressiva sua síntese. Macrófagos co-cultivados com leveduras e 2,5  $\mu g$  L-AmB/mL produzem significativamente mais  $H_2O_2$  do que as células cultivadas apenas com o fungo ( $p < 0,05$ ) ou macrófagos puros ( $p < 0,001$ ); nenhum destes grupos havia sido estimulado com PMA. A produção de  $H_2O_2$  por macrófagos co-cultivados com Pb18, a dose maior de L-AmB e expostos ao mitógeno é maior do que a observada em células puras estimuladas com PMA ( $p < 0,05$ ). Às 48 horas de incubação, macrófagos de todos os grupos experimentais sintetizam  $H_2O_2$ ; níveis mais elevados deste reativo tendem a ser produzidos por células controles ou co-cultivadas com o fungo e a maior dose de L-AmB. No entanto, neste tempo de incubação, diferenças estatísticas significativas não são encontradas. Já às 72 horas, o metabólito não é detectado apenas em células controles. Macrófagos co-cultivados com leveduras do fungo e 5  $\mu g$  L-AmB/mL tendem a apresentar uma grande produção de  $H_2O_2$ . Porém, novamente, não são detectadas diferenças estatísticas significativas na síntese do reativo entre os diferentes grupos de células.

Nos sobrenadantes obtidos após a realização dos diferentes co-cultivos de macrófagos, as citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12 não são detectadas (dados não mostrados).



**Figura 24** - Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos em diferentes tempos de co-cultivo com leveduras de Pb18, na presença ou não de duas diferentes doses de L-AmB. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de quatro experimentos (N = 80 animais), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer. ★, •: diferença estatística significativa, p < 0,05, e 0,001, respectivamente.

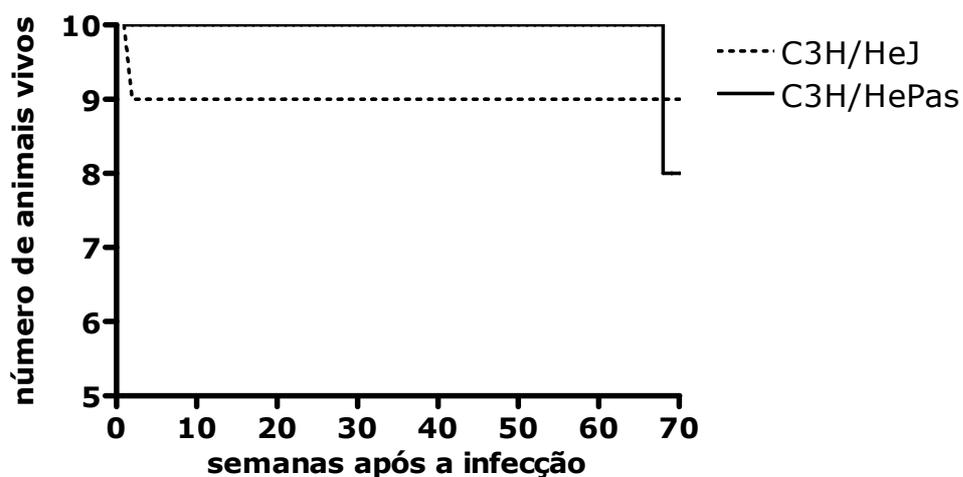
#### 4.4 Estudo do papel do receptor *Toll-like* 4 na paracoccidiodomicose murina

Com o objetivo de caracterizar a infecção paracoccidiodomicótica na presença ou não de TLR4, para posterior verificação da possível interação entre este receptor, *P. brasiliensis* e L-AmB, camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas, respectivamente deficientes e suficientes quanto a sua expressão, foram infectados com o isolado virulento Pb18 e analisados aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias de infecção. Os resultados obtidos nos diversos parâmetros estudados são colocados a seguir.

A sobrevida de camundongos de ambas as linhagens murinas após a infecção é mostrada na **Figura 25**. Aos 6 dias de infecção, um animal, da linhagem C3H/HeJ, foi encontrado morto. Aos 480 dias de infecção, dois camundongos, da linhagem C3H/HePas, foram encontrados mortos. Dados os números muito baixos de fungos viáveis encontrados nos dois grupos experimentais aos 300 dias de infecção, como será mostrado adiante, decidimo-nos a sacrificar os camundongos restantes aos 485 dias, para determinar a gravidade da infecção apresentada neste período tão tardio da doença. Desta forma, foi possível determinar que as mortes ocorridas foram naturais, devidas à idade avançada dos indivíduos, e não decorrentes da infecção paracoccidiodomicótica.

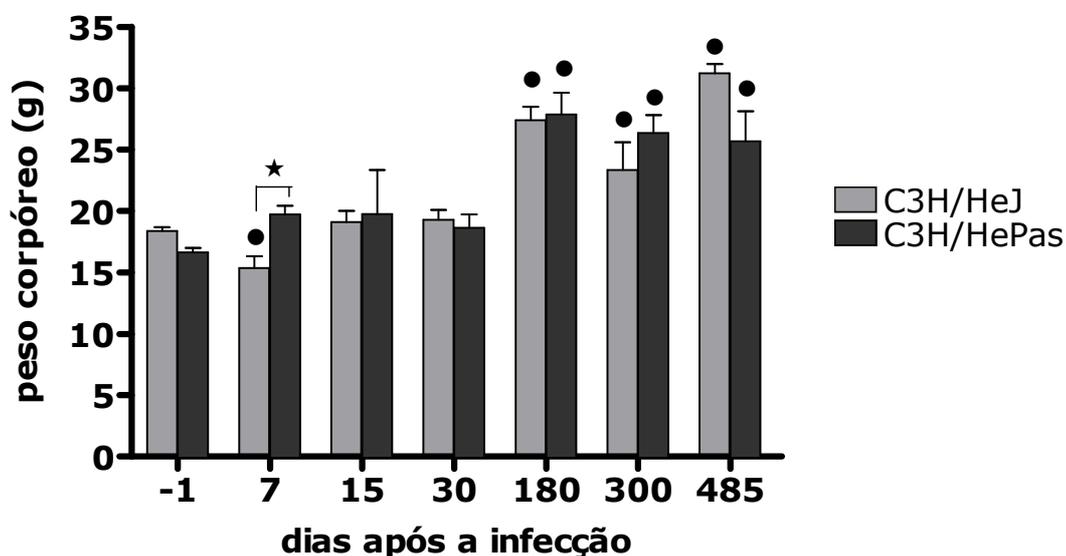
Os resultados referentes ao peso dos animais são mostrados na **Figura 26**. Antes da infecção, o peso dos animais de ambas as linhagens encontra-se dentro do considerado normal para a espécie. Camundongos C3H/HeJ apresentam, no 7º dia de infecção, peso significativamente menor do que seus controles C3H/HePas, mas retornam ao peso inicial no 15º e 30º dia. Nas fases crônicas da infecção, camundongos de ambas as linhagens apresentam aumento significativo de peso, mas não são encontradas diferenças estatísticas dignas de nota entre os dois grupos experimentais nos tempos analisados.

Às reações de HTT, nota-se que ambas as linhagens murinas respostas consideradas baixas aos 7 e 15 dias de infecção, que se elevam



**Figura 25** - Sobrevida de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18.

Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

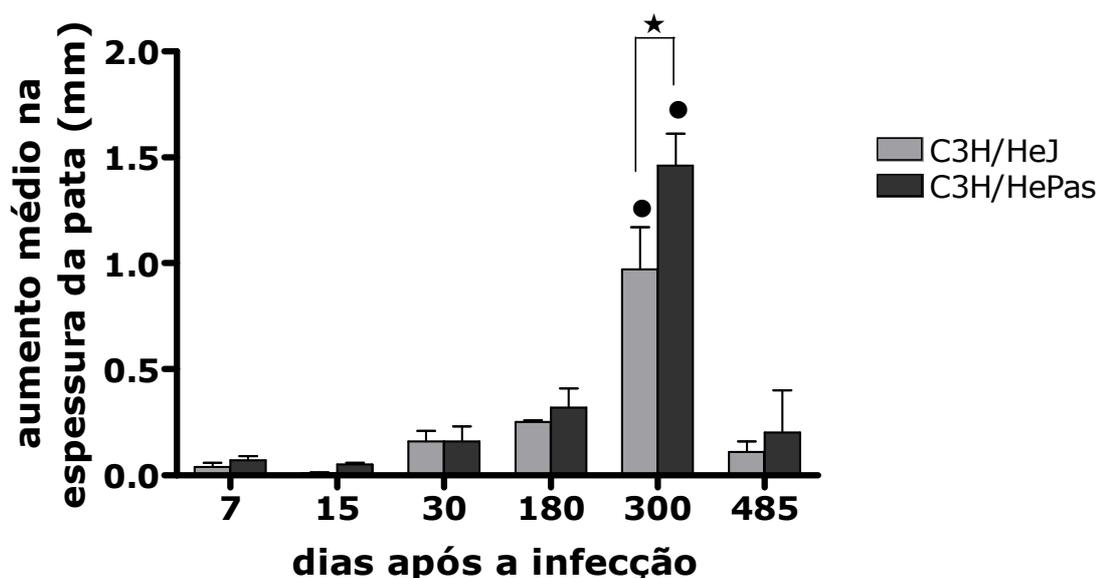


**Figura 26** - Peso corpóreo de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18. As barras indicam o erro médio padrão.

Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

- ★: diferença estatística significativa entre os grupos experimentais;
- : diferença estatística significativa em relação ao dia -1.

no 30º dia; diferenças significativas não são observadas. Já aos 180 dias de infecção, camundongos C3H/HePas apresentam respostas em reações de HTT ligeiramente mais elevadas do que C3H/HeJ, porém não existem diferenças estatísticas significativas entre as duas linhagens. Aos 300 dias, as respostas elevam-se significativamente em camundongos TLR4-deficientes ou não; as respostas observadas em indivíduos suficientes são ainda estatisticamente maiores do que as de deficientes. Aos 485 dias de infecção, camundongos C3H/HePas apresentam respostas ligeiramente mais elevadas do que animais C3H/HeJ, porém não são encontradas diferenças estatísticas significativas entre as duas linhagens. Estas respostas são significativamente menores do que as encontradas até o 300º dia de infecção (**Figura 27**).



**Figura 27** - Respostas em reações de HTT em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18, aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias de infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre as duas linhagens murinas; •: diferença significativa entre os resultados obtidos aos 300 dias e aos 7, 15, 30, 180 e 485 dias após a infecção.

Os resultados obtidos nas contagens totais e diferenciais de leucócitos realizadas em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas podem ser observados na **Tabela VI**. Todos os dados obtidos encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie murina.

Os números de leucócitos totais, neutrófilos maduros, neutrófilos imaturos, linfócitos, monócitos e basófilos, embora tenham variado nas duas linhagens, não se alteram de forma significativa, exceto aos 180 e 300 dias, quando camundongos C3H/HeJ apresentam eosinofilia. Nestes dois tempos após a infecção, os números de eosinófilos são significativamente maiores em animais TLR4-deficientes do que os encontrados antes da infecção e também dos observados nos controles suficientes.

Os resultados referentes à quantificação de fungos viáveis em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas são mostrados na **Figura 28**.

Aos 7 e 15 dias de infecção, camundongos deficientes ou não quanto à expressão de TLR4 apresentam números equivalentes de unidades formadoras de colônias de *P. brasiliensis* no baço, no epiploon, no fígado e no pulmão. No 30º dia, a carga fúngica encontrada nas duas linhagens murinas é similar, exceto no epiploon, onde se observa maior número de fungos viáveis em camundongos C3H/HePas do que em C3H/HeJ. Aos 180 dias de infecção, não são encontradas leveduras em indivíduos da linhagem C3H/HeJ em nenhum dos órgãos analisados. Neste mesmo tempo após a inoculação, camundongos C3H/HePas ainda apresentam carga fúngica no baço, no epiploon e no fígado (onde a carga fúngica é significativamente maior do que a apresentada por C3H/HeJ), mas não no pulmão. Ainda aos 180 dias, são observadas diferenças estatísticas significativas entre as quantificações de fungos viáveis nos quatro órgãos das duas linhagens e os resultados obtidos no primeiro mês de infecção. Aos 300 e 485 dias, em ambos os grupos experimentais, observa-se esterilização de todos os órgãos (dados não mostrados).

**Tabela VI** - Perfis leucocitários de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18.

	Le	PMNi	PMNm	Eos	Ly	M	Bas
<b>C3H/HeJ, -1d</b>	3475 ± 462	0 ± 0	380 ± 44	11 ± 8	3007 ± 413	39 ± 17	40 ± 13
<b>C3H/HePas, -1d</b>	5386 ± 470	0 ± 0	574 ± 55	0 ± 0	4988 ± 326	123 ± 38	94 ± 15
<b>C3H/HeJ, 7d</b>	4300 ± 529	76 ± 38	2072 ± 352	124 ± 77	1636 ± 243	54 ± 43	0 ± 0
<b>C3H/HePa, 7d</b>	4560 ± 682	164 ± 80	1215 ± 97	56 ± 39	1408 ± 393	247 ± 76	0 ± 0
<b>C3H/HeJ, 15d</b>	2700 ± 366	20 ± 12	3069 ± 681	0 ± 0	1247 ± 157	0 ± 0	0 ± 0
<b>C3H/HePas 15d,</b>	3300 ± 1325	193 ± 88	2061 ± 1256	117 ± 54	809 ± 149	0 ± 0	0 ± 0
<b>C3H/HeJ, 30d</b>	5067 ± 788	0 ± 0	3577 ± 832	1005 ± 690	1148 ± 316	88 ± 38	53 ± 53
<b>C3H/HePas, 30d</b>	2750 ± 940	0 ± 0	1587 ± 365	877 ± 300	527 ± 213	0 ± 0	0 ± 0
<b>C3H/HeJ, 180d</b>	3066 ± 917	464 ± 356	1228 ± 562	1215 ± 117 *#	1215 ± 118	145 ± 124	0 ± 0
<b>C3H/HePas, 180d</b>	2100 ± 409	343 ± 109	530 ± 93	0 ± 0	1185 ± 348	42 ± 26	0 ± 0
<b>C3H/HeJ, 300d</b>	4250 ± 50	214 ± 130	1102 ± 242	1084 ± 72 *#	1211 ± 468	365 ± 323	64 ± 22
<b>C3H/HePas, 300d</b>	2325 ± 46	108 ± 40	729 ± 276	503 ± 34	820 ± 7	295 ± 254	12 ± 12
<b>C3H/HeJ, 485d</b>	4700 ± 1346	10 ± 2	124 ± 13	0 ± 0	89 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
<b>C3H/HePas, 485d</b>	4633 ± 1453	7 ± 2	214 ± 15	0 ± 0	91 ± 1	0 ± 0	0 ± 0

Os resultados foram expressos como número de células por milímetro cúbico ± erro padrão médio. Dados representativos de dois experimentos ( $N = 20$  camundongos C3H/HeJ ou C3H/HePas), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

NOTA: Abreviaturas e símbolos:

Le: leucócitos totais

PMNi: neutrófilos imaturos

PMNm: neutrófilos maduros

Eos: eosinófilos

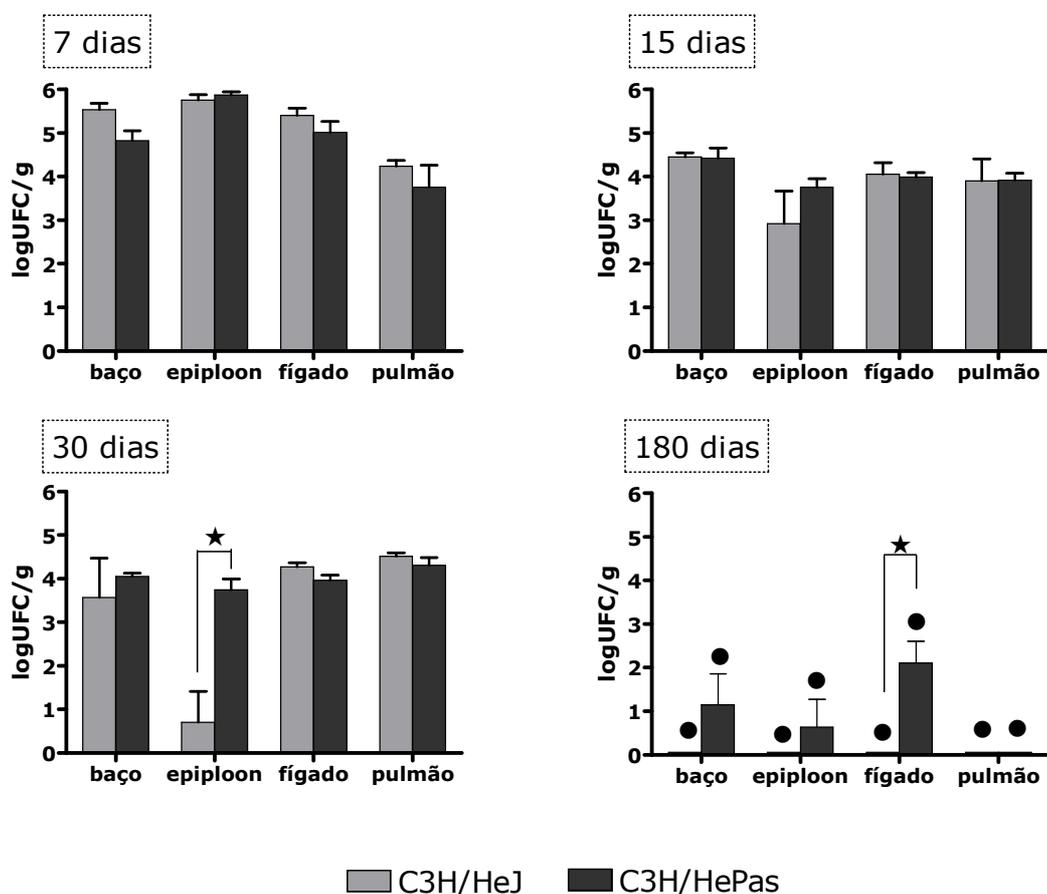
Ly: linfócitos

M: monócitos

Bas: basófilos

\*: diferença estatística significativa em relação a camundongos não infectados

#: diferença estatística significativa entre ambas as linhagens de camundongos



**Figura 28** - Quantificação de fungos viáveis em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18, aos 7, 15, 30 e 180 dias após a infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

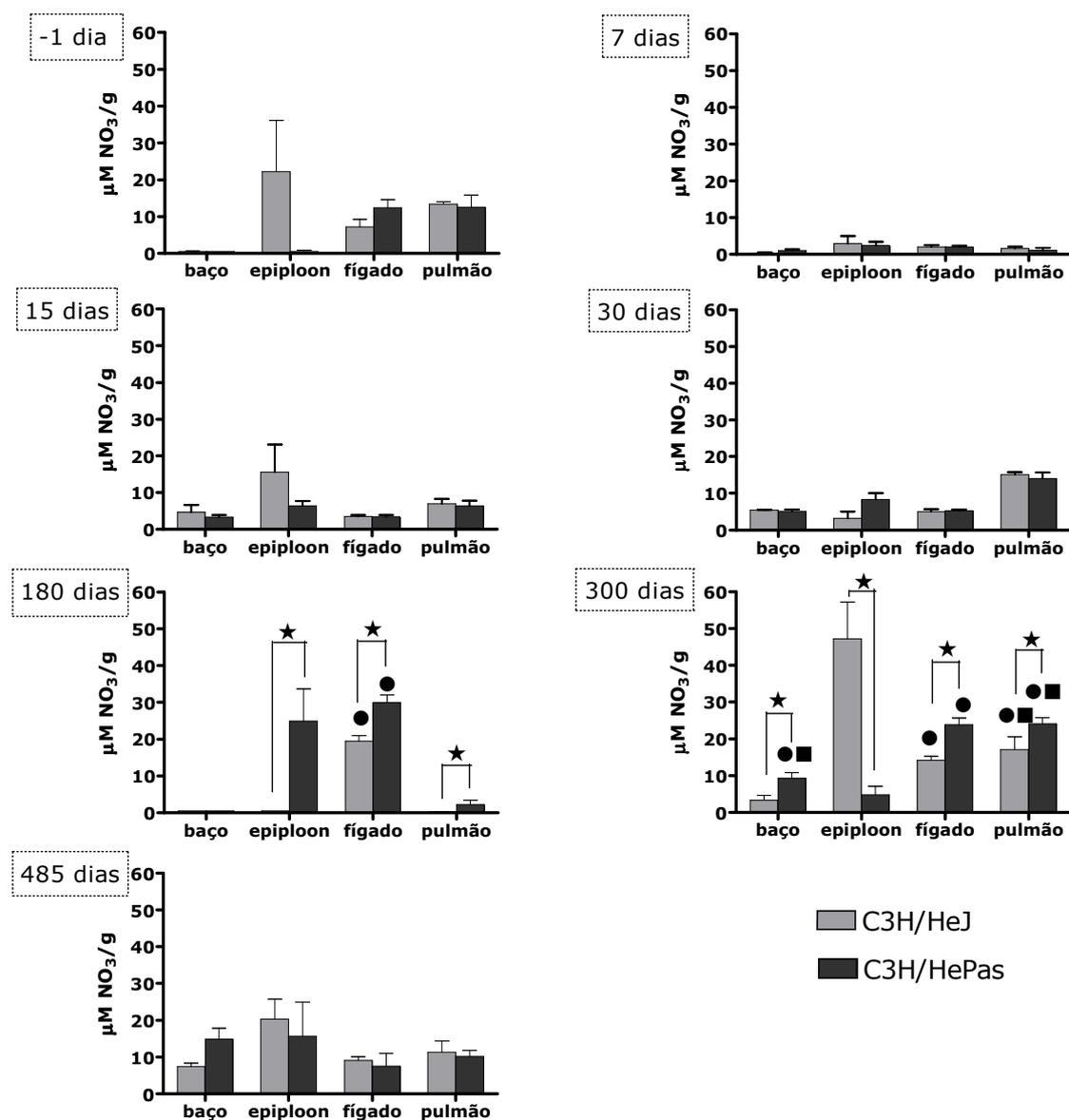
★: diferença estatística significativa entre as duas linhagens;  
•: diferença estatística significativa entre os resultados obtidos aos 180 dias e aos 7, 15 e 30 dias após a infecção.

Na **Figura 29**, são mostrados os resultados referentes à dosagem de NO, mensurado sob a forma de nitrito, antes da infecção e aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias após a inoculação de *P. brasiliensis*.

Previamente à infecção, o reativo não é detectado nos sobrenadantes obtidos de baço. No epiploon, há grande concentração de NO em camundongos C3H/HeJ, mas, em C3H/HePas, o reativo não é detectado. No fígado e pulmão de ambas as linhagens, são observados níveis basais do reativo. Aos 7, 15 e 30 dias após a infecção, as concentrações de NO são similares nas duas linhagens.

Aos 180 dias, no baço, o reativo não é detectado em nenhuma das linhagens. No epiploon e no pulmão, a concentração de NO é significativamente maior em C3H/HePas do que em C3H/HeJ, onde a molécula não foi encontrada. Os níveis hepáticos de NO são maiores em camundongos TLR4-suficientes do que em deficientes; em ambos os grupos experimentais, as concentrações do reativo neste órgão são maiores aos 180 dias do que às obtidas no primeiro mês de infecção. Aos 300 dias, as concentrações de NO em baço, fígado e pulmão são maiores em camundongos C3H/HePas do que em C3H/HeJ. No epiploon, ocorre fenômeno inverso; os níveis do reativo são maiores em animais TLR4-deficientes do que em seus controles suficientes. Em ambas as linhagens, os níveis hepáticos de NO são significativamente mais elevados aos 300 dias do que no primeiro mês de infecção. No baço de camundongos C3H/HePas e no pulmão de indivíduos dos dois grupos experimentais, as concentrações do reativo também são significativamente mais elevadas aos 300 do que aos 180 dias. Aos 485 dias, os níveis do reativo são similares nas duas linhagens murinas.

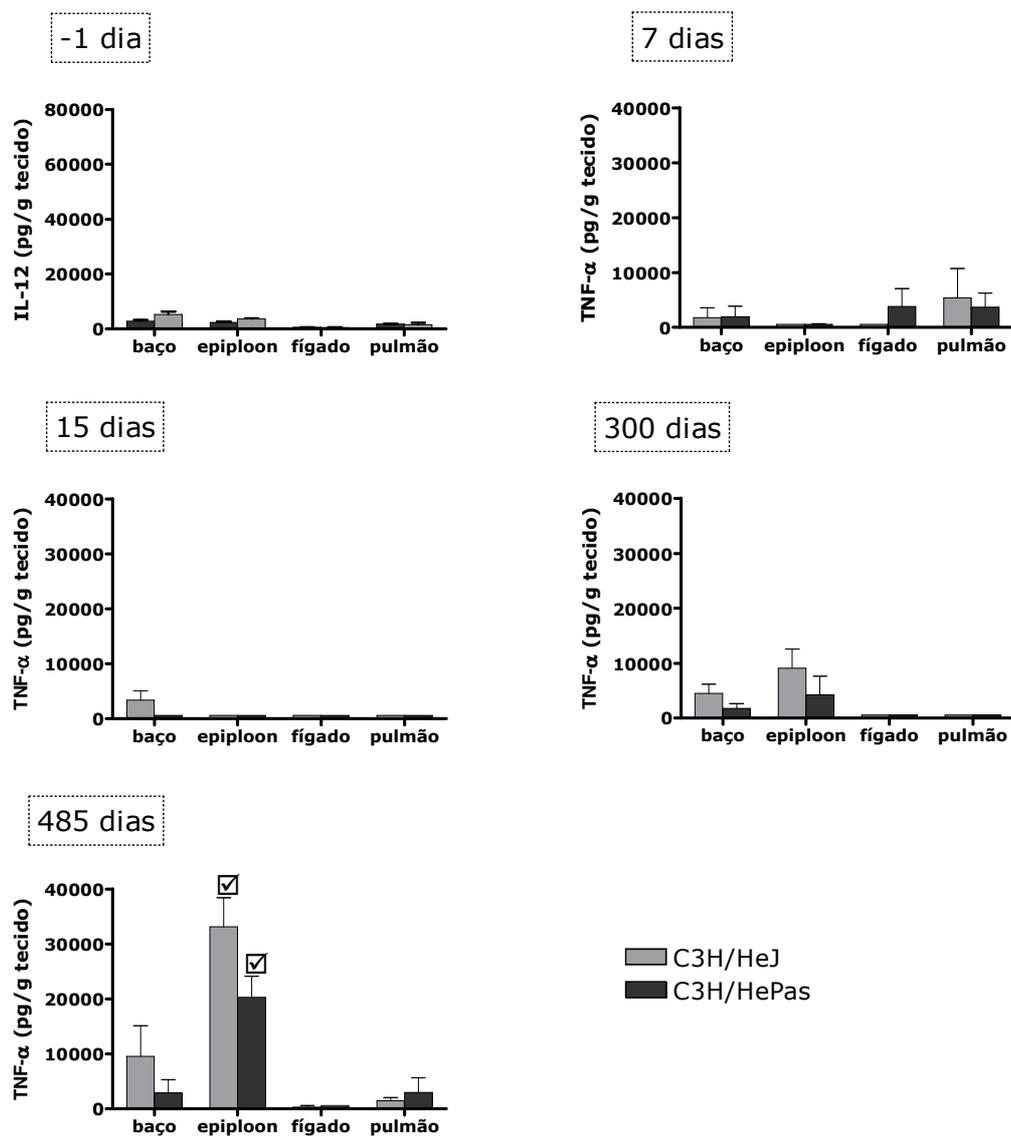
Os resultados obtidos na determinação da concentração de TNF- $\alpha$  são mostrados na **Figura 30**. Antes da infecção e aos 7 e 15 dias após a inoculação, os níveis de TNF- $\alpha$ , nos quatro órgãos estudados, são basais e similares nos dois grupos experimentais. A citocina não é detectada em nenhum dos sobrenadantes obtidos aos 30 e 180 dias pós-infecção (dados



**Figura 29** - Determinação da concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas da inoculação com Pb18 e aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias de infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre as duas linhagens no mesmo tempo após a infecção. •: diferença estatística significativa em relação aos níveis apresentados pela mesma linhagem antes e aos 7, 15 e 30 dias após a infecção. ▪: diferença estatística significativa em relação aos níveis apresentados pela mesma linhagem entre os dias 180 e 300 após a infecção.



**Figura 30** - Determinação da concentração de TNF- $\alpha$  em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18.

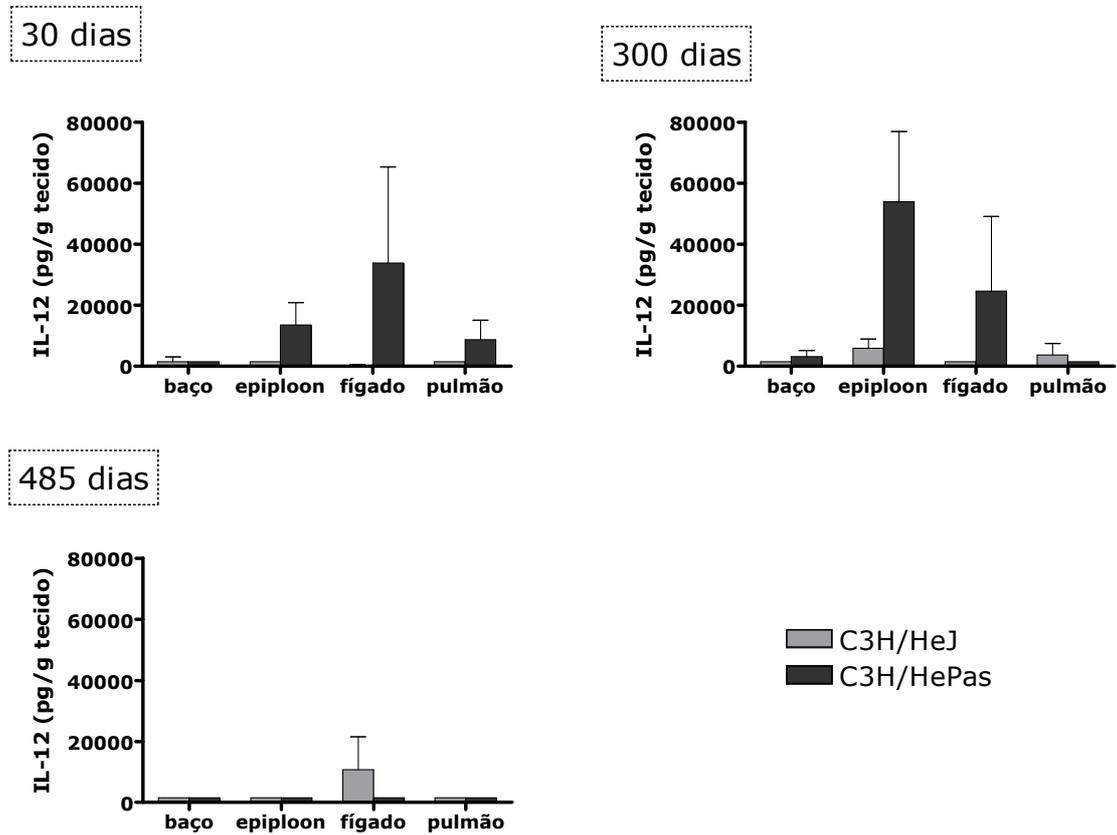
As barras indicam o erro padrão médio. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

✓: diferença estatística significativa entre os resultados obtidos aos 485 dias e os demais tempos analisados.

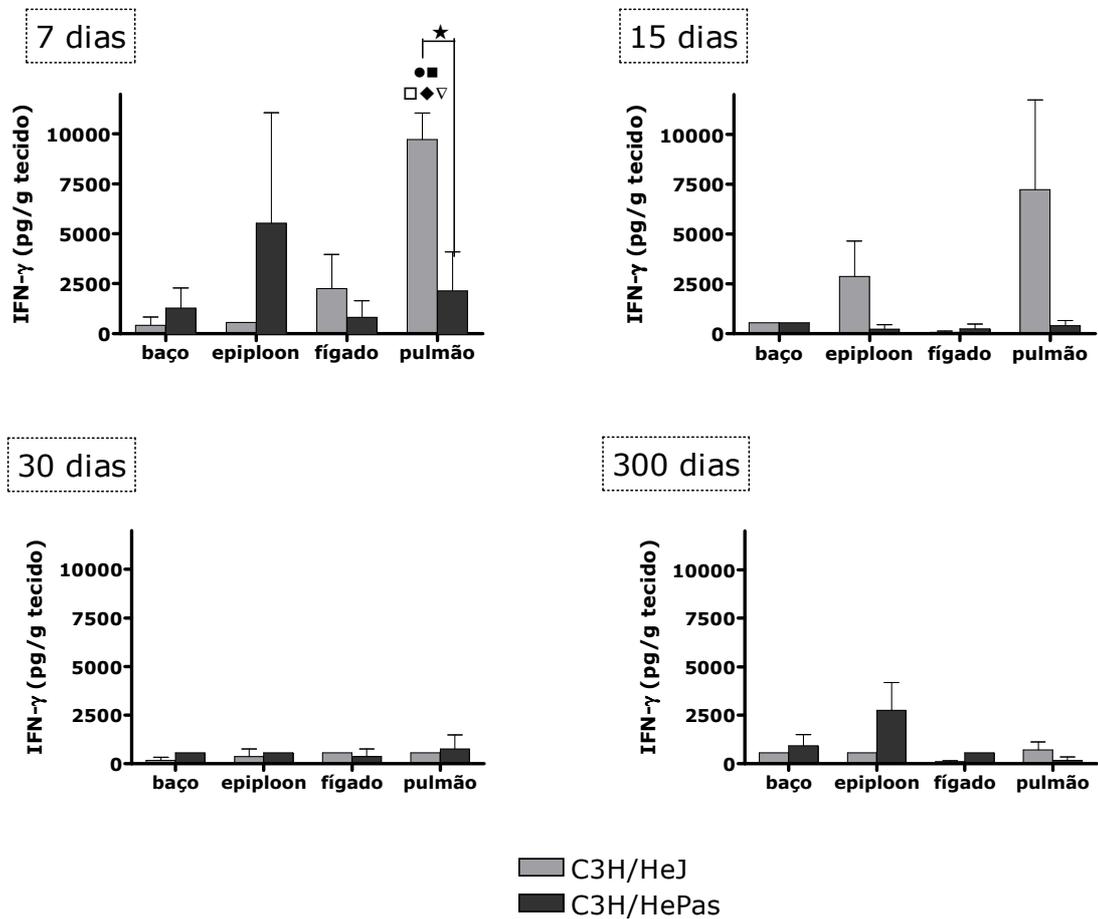
não mostrados). Aos 300 dias de infecção, as concentrações da citocina, no baço e no epiploon, são relativamente mais altas; no fígado e no pulmão, porém, o TNF- $\alpha$  não é detectado. Aos 485 dias, as concentrações da citocina se elevam, nas duas linhagens, no baço e no epiploon. Neste último, os níveis de TNF- $\alpha$  são significativamente mais altos do que os encontrados nos demais tempos analisados. No fígado, a citocina não é detectada e, no pulmão, sua concentração é basal.

Na determinação da concentração da citocina IL-12 é mostrada na **Figura 31**. Antes da infecção e nos 7<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias após a inoculação, não se detecta a presença de IL-12 nos sobrenadantes de órgãos (dados não mostrados). Aos 30 dias, a citocina não é encontrada em sobrenadantes de baço em nenhuma das linhagens murinas. Níveis relativamente altos de IL-12 são observados nos órgãos de animais C3H/HePas mas, em camundongos C3H/HeJ, a citocina não é detectada. Aos 180 dias, não se observa a presença de IL-12 nos sobrenadantes obtidos em ambos os grupos experimentais. Aos 300 dias, concentrações elevadas da citocina são observadas no epiploon e no fígado de camundongos C3H/HePas; no baço destes animais, o nível de IL-12 é baixo e, no pulmão, a citocina não é encontrada. Neste mesmo ponto, em indivíduos C3H/HeJ, baixas concentrações da citocina são observadas no epiploon e no pulmão e, nos demais órgãos, a citocina não é detectada. Por fim, aos 485 dias, a IL-12 é encontrada apenas no fígado de camundongos C3H/HeJ, em títulos reduzidos. Diferenças estatísticas significativas não são observadas.

Os resultados referentes às determinações de IFN- $\gamma$  são mostrados na **Figura 32**. Antes da infecção e aos 180 e 485 dias após a inoculação, a citocina não é detectada (dados não mostrados). Aos 7 dias, no baço e no fígado de ambas as linhagens, as concentrações de IFN- $\gamma$  são baixas. No epiploon de camundongos C3H/HePas, estes títulos são altos. Ainda no 7<sup>o</sup> dia de infecção, a concentração de IFN- $\gamma$  é significativamente mais alta em indivíduos C3H/HeJ do que em camundongos C3H/HePas; tal título é também maior do que os encontrados em todos os outros pontos analisados. Aos 15 dias, os níveis da citocina são relativamente



**Figura 31** - Determinação da concentração de IL-12 em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18. As barras indicam o erro padrão médio. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.



**Figura 32** - Determinação da concentração de IFN- $\gamma$  em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18.

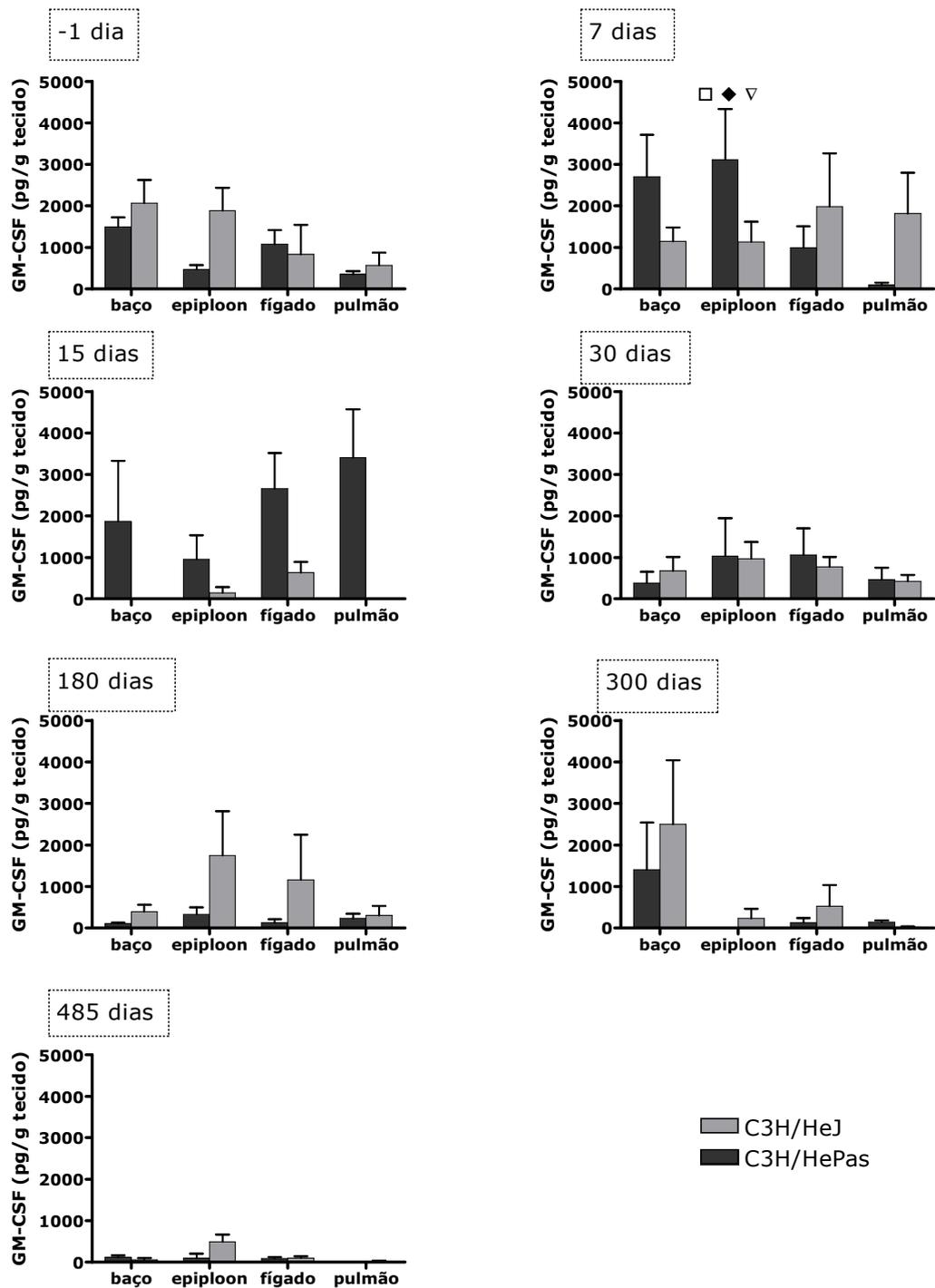
As barras indicam o erro padrão médio. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre as médias de cada uma das linhagens no mesmo tempo após a infecção; ●, ■, □, ◆, ▼: diferença estatística significativa entre as médias apresentadas pela mesma linhagem entre os dias 7 e, respectivamente, 15, 30, 180, 300 e 485 após a infecção.

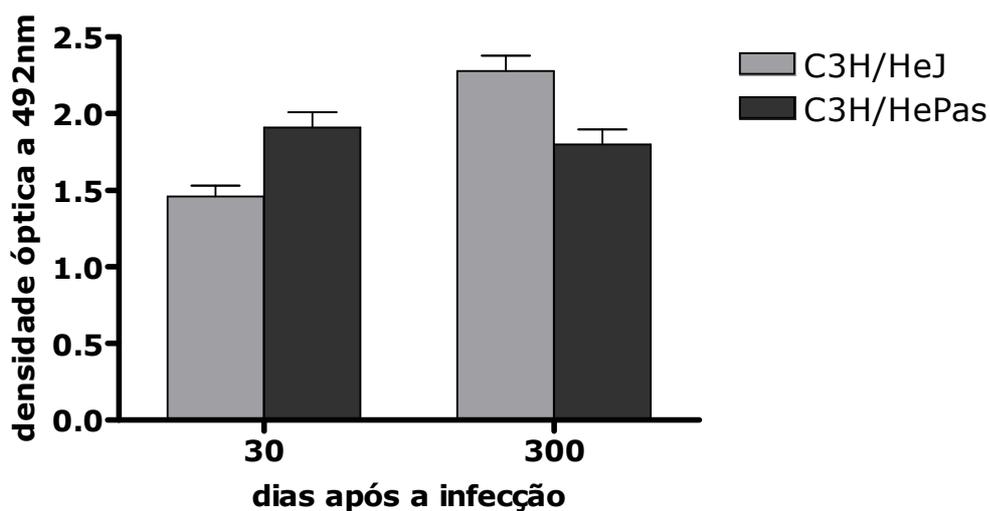
altos no epiploon e no pulmão de camundongos C3H/HeJ; nos demais órgãos destes animais e em C3H/HePas, o IFN- $\gamma$  é encontrado em concentrações baixas. Aos 30 dias de infecção, os títulos da citocina são baixos em ambas as linhagens. Aos 180 dias, a presença de IFN- $\gamma$  não é detectada em nenhum dos grupos experimentais. Aos 300 dias, camundongos C3H/HePas apresentam baixos níveis da citocina em todos os órgãos avaliados, à exceção do epiploon, enquanto em indivíduos C3H/HePas a citocina é encontrada em pequenas concentrações. Aos 485 dias, por fim, a citocina não é detectada em nenhuma das linhagens murinas.

Na quantificação de GM-CSF, cujos resultados são mostrados na **Figura 33**, nota-se que, antes da infecção, as concentrações da citocina no baço, no fígado e no pulmão, são similares entre as duas linhagens murinas; no epiploon, estes níveis são mais elevados nos camundongos C3H/HePas. Aos 7 dias de infecção, as concentrações de GM-CSF são maiores no baço e no epiploon de animais C3H/HeJ e no fígado e no pulmão de C3H/HePas. Aos 15 dias, nos quatro órgãos analisados, os níveis de GM-CSF são maiores em camundongos C3H/HePas; as concentrações obtidas no epiploon destes animais são significativamente maiores do que as encontradas aos 180, 300 e 485 dias de infecção. No 30º dia, os títulos de GM-CSF observados são similares nas duas linhagens murinas. Aos 180 dias, as concentrações da citocina são mais elevadas no epiploon e no fígado de camundongos C3H/HeJ; nos demais órgãos, os resultados obtidos são semelhantes nos dois grupos experimentais. Nos dois últimos tempos analisados, o GM-CSF é encontrado em níveis baixos, à exceção das altas concentrações observadas no baço de ambas as linhagens no 300º dia após a infecção.

Na **Figura 34**, são mostrados os resultados obtidos à pesquisa de IgG total anti-gp43 de *P. brasiliensis* em soros de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas aos 30º e 300º dias após a infecção com Pb18 e em soros normais, de animais destas mesmas linhagens não inoculados com o fungo. Indivíduos de ambos os grupos experimentais apresentam, nos



**Figura 33** - Determinação da concentração de GM-CSF em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18. As barras indicam o erro padrão médio. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer. □, ◆, ▼: diferença estatística significativa entre as médias apresentadas pela mesma linhagem entre os dias 15 e, respectivamente, 180, 300 e 485 após a infecção.



**Figura 34** - Titulação de IgG total anti-gp43 de *P. brasiliensis* em soros de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18, aos 30 e 300 dias após a infecção.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer. Controles positivos e negativos apresentaram, respectivamente, densidades ópticas médias de 0.534 e -0.023.

dois pontos analisados, concentrações similares e relativamente altas de tais anticorpos.

Nestes mesmos soros, os títulos de anticorpos anti-gp43 de isótipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM são similares nas duas linhagens murinas (dados não mostrados).

Os resultados obtidos às análises anátomo-patológicas realizadas aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias após a infecção podem ser visualizados na **Tabela VII**.

Aos 7 dias após a infecção, as lesões encontradas em camundongos C3H/HePas são mais graves do que as observadas em C3H/HeJ. Nas duas linhagens, as lesões tornam-se piores aos 15 e aos 30 dias de infecção. Aos 180 dias de infecção, ambos os grupos experimentais apresentam lesões de gravidade similar. Já aos 300 dias, em animais TLR4-suficientes, são observadas lesões anátomo-patológicas ligeiramente mais graves do que em camundongos deficientes. Ainda assim, nas duas linhagens, à exceção da aderência entre as vísceras e o peritônio observada em C3H/HePas aos 300 dias de infecção, as lesões são classificadas como discretas ou moderadas. Aos 485 dias de infecção, as lesões encontradas em ambos os grupos experimentais são de gravidade similar e, à exceção da aderência entre as vísceras e o peritônio observada, as lesões são novamente consideradas discretas ou moderadas, em perfil similar ao relatado aos 300 dias de infecção.

À análise histopatológica descritiva de fragmentos de tecido corados com HE, nota-se, em ambas as linhagens, a existência de um padrão similar de lesões em todos os órgãos estudados ao longo dos primeiros 30 dias de infecção. Aos 7 dias, no baço, são encontradas lesões na cápsula esplênica, de natureza necrótica ou não (**Prancha X**); no fígado, observa-se um infiltrado inflamatório na cápsula conjuntiva. No epiploon e nos pulmões, embora fungos de morfologia preservada sejam detectados, lesões dignas de nota não são encontradas. Aos 15 dias de infecção, observam-se lesões na cápsula esplênica e hepática, bem como no epiploon (**Prancha XI**). Já aos 30 dias, as lesões esplênicas são maiores

**Tabela VII** - Exame anátomo-patológico realizado aos 7, 15, 30, 180, 300 e 485 dias após a infecção em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18.

	Ad	NE	HEp	CP	EM	HM	Pn
<b>C3H/HeJ, 7d</b>	+++	-	++	-		++	-
<b>C3H/HePas, 7d</b>	++++	-	+	++++	++	+++	-
<b>C3H/HeJ, 15d</b>	+++	+++	++	+++	+++	++	-
<b>C3H/HePas, 15d</b>	+++	++	++	+++	+++	+++	-
<b>C3H/HeJ, 30d</b>	++++	-	-	++++	+++	+++	±
<b>C3H/HePas, 30d</b>	+++	-	-	+++	++	++	±
<b>C3H/HeJ, 180d</b>	++	+	+	-	+	-	-
<b>C3H/HePas, 180d</b>	+	+	+	-	+	+	-
<b>C3H/HeJ, 300d</b>	++++	++	++	-	++	+	-
<b>C3H/HePas, 300d</b>	++	-	±	-	-	++	+
<b>C3H/HeJ, 485d</b>	++++	-	+	-	+	+	-
<b>C3H/HePas, 485d</b>	++++	-	+	-	+	+	-

Dados representativos de dois experimentos ( $N = 20$  camundongos C3H/HeJ ou C3H/HePas).

NOTA: Abreviaturas e símbolos:

Ad: aderência das vísceras ao peritônio e entre sistema imunológico

NE: necrose esplênica

HEp: hiperplasia do epiploon

CP: comprometimento do peritônio (presença de focos fúngicos na serosa)

EM: esplenomegalia

HM: hepatomegalia

Pn: pneumonia

(-): nada digno de nota

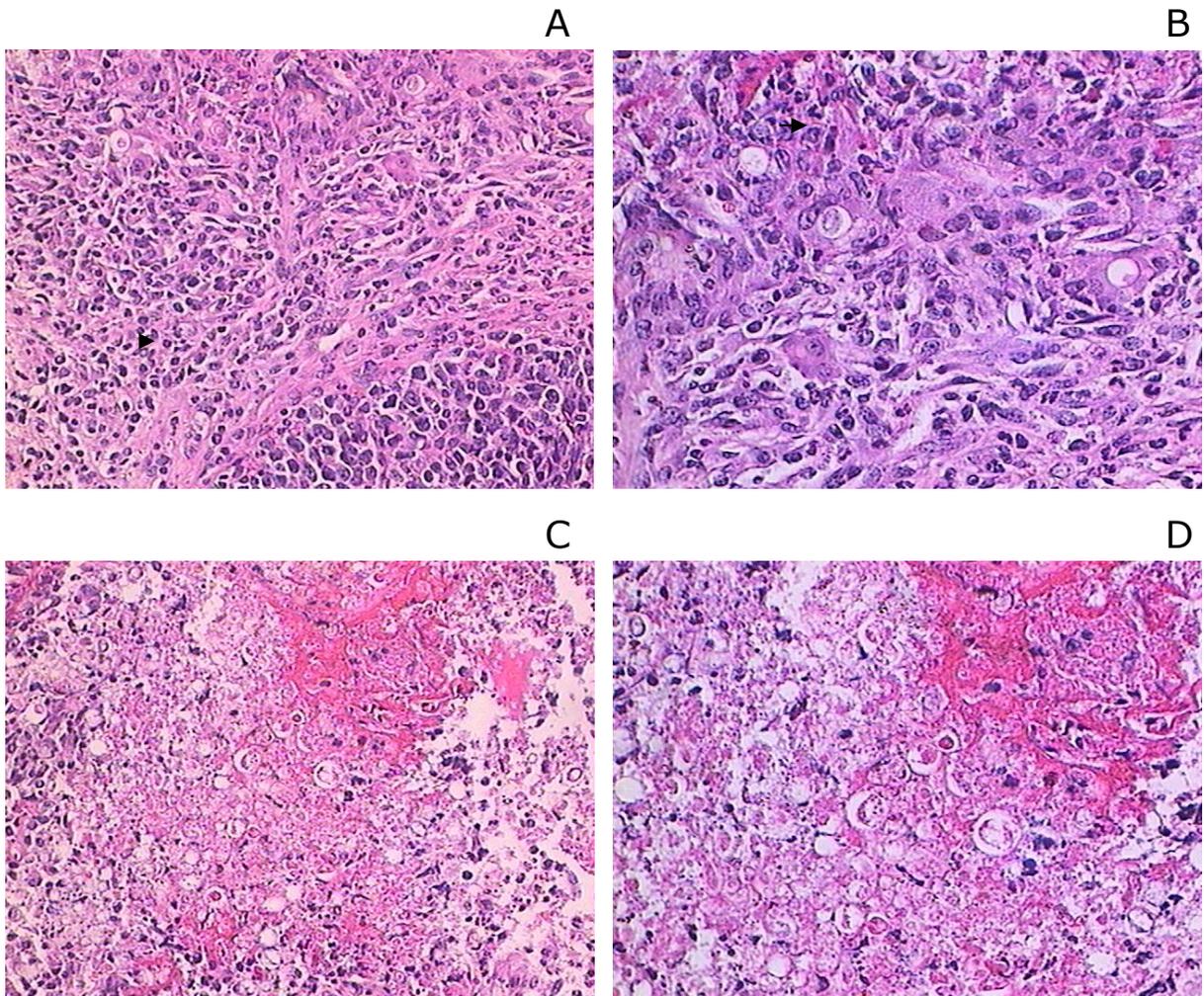
(±): muito discreto

(+): discreto

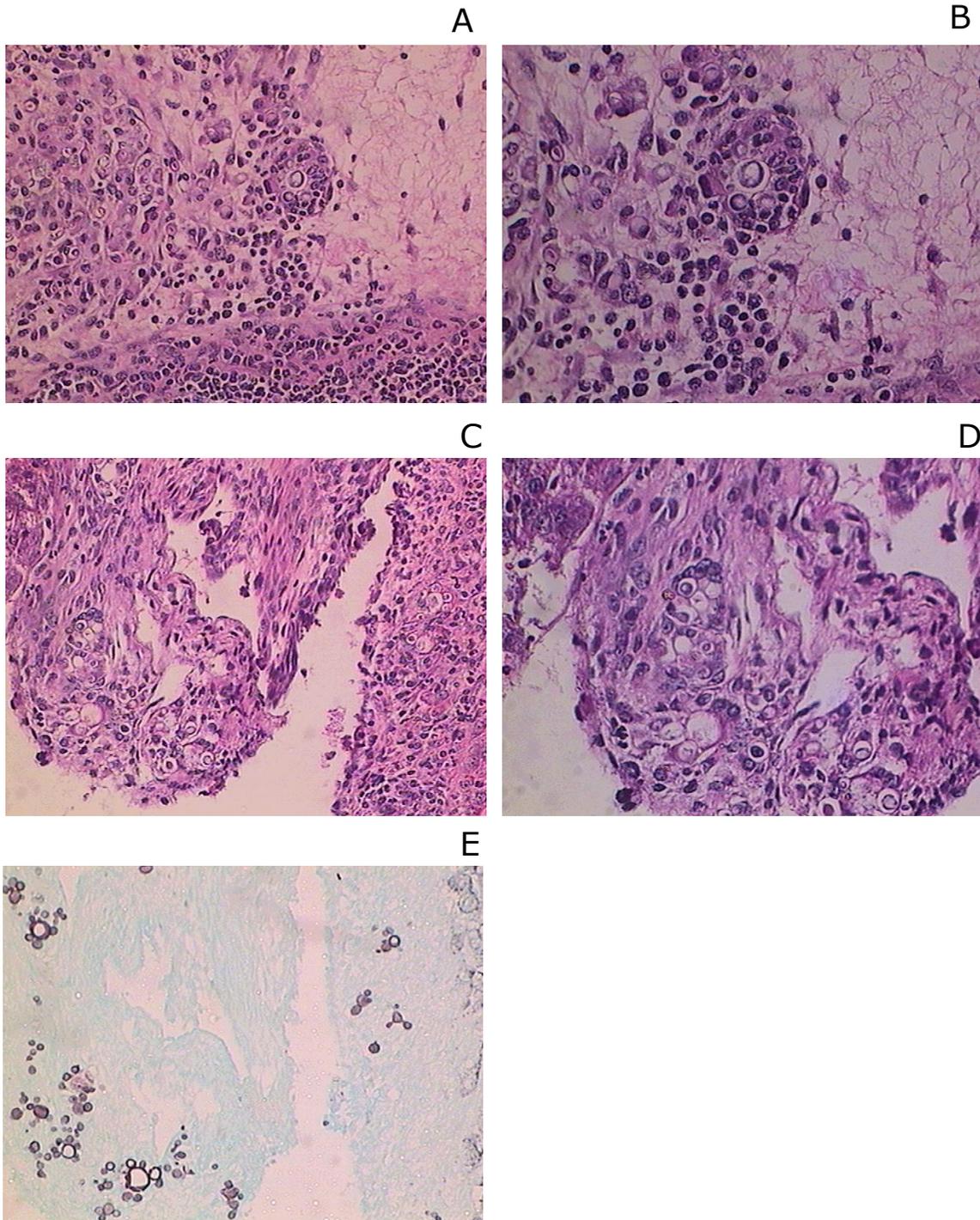
(++): moderado

(+++): grave

(++++): muito grave



**Prancha X** - Análise histopatológica realizada em baço de camundongos C3H/HeJ inoculados com Pb18, aos 7 dias após a infecção. A e B: lesão na cápsula esplênica, com acúmulo de matriz extracelular (MEC) (ponta de seta) e presença de macrófagos, células epitelióides, células gigantes (seta) e neutrófilos circundando leveduras de *P. brasiliensis*; HE, 245x e 614x, respectivamente. C e D: lesão necrótica na cápsula esplênica, com *debris* celulares, extravasamento de material extracelular, leveduras de *P. brasiliensis* e acúmulo de MEC; HE, 245x e 614x.



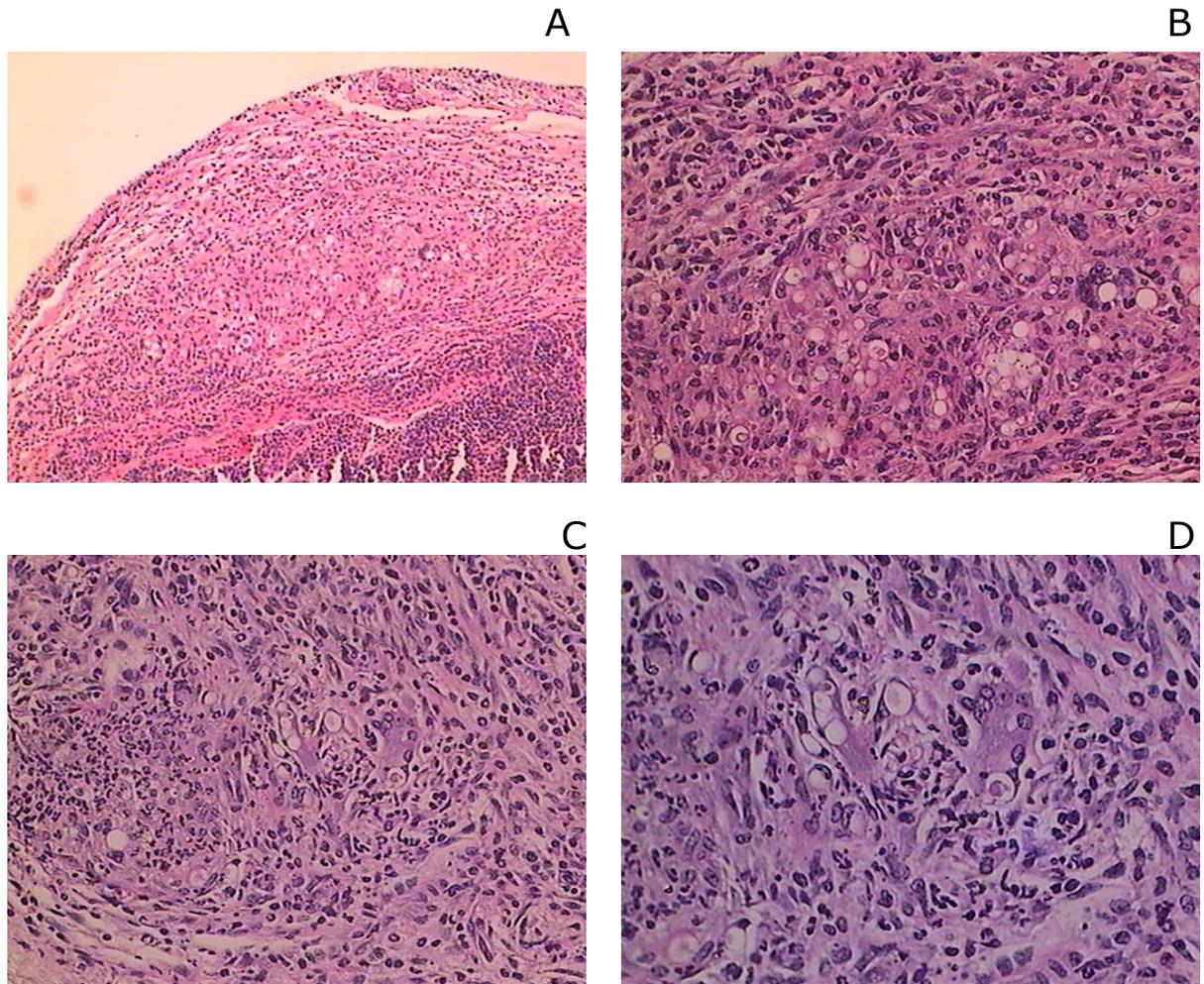
**Prancha XI** - Análise histopatológica realizada em baço de camundongos C3H/HeJ inoculados com Pb18, aos 15 dias após a infecção. A e B: lesão na cápsula esplênica e no epiploon, com *P. brasiliensis* de morfologia preservada, macrófagos e neutrófilos; HE, 245x e 614x, respectivamente. C e D: lesão na cápsula hepática, com células gigantes, neutrófilos, macrófagos e acúmulo de MEC; HE, 245x e 614x. E: no mesmo corte histológico apresentado em C, evidenciam-se leveduras de *P. brasiliensis* de morfologia preservada; prata-metamina, 245x.

do que as observadas em períodos anteriores e possuem padrão zonal, com leveduras, neutrófilos, macrófagos e células gigantes localizados na região central e circundados por células epitelióides. No fígado, além da lesão capsular, há também um infiltrado inflamatório no parênquima (**Prancha XII**). Nos dois últimos tempos de infecção, não são visualizadas alterações pulmonares dignas de nota, apesar do achado de fungos preservados em cortes corados pela prata.

Na fase crônica da infecção, aos 180, 300 e 485 dias após a infecção, não são encontradas alterações histopatológicas relevantes nos cortes corados com HE (dados não mostrados).

Na **Tabela VIII**, encontram-se os resultados obtidos na análise semiquantitativa de fungos realizada em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata.

Nos quatro órgãos e três tempos pós-infecção estudados, são observadas leveduras de *P. brasiliensis* de morfologia preservada, o que levou à classificação de (++++) segundo o parâmetro pré-determinado. Exemplos de fungos com morfologia preservada podem ser visualizados na **Prancha XI E**. Na fase crônica da infecção, aos 180, 300 e 485 dias, à coloração pela prata, não são observadas leveduras de *P. brasiliensis*.



**Prancha XII** - Análise histopatológica realizada em baço de camundongos C3H/HeJ inoculados com Pb18, aos 30 dias após a infecção. A e B: lesão na cápsula esplênica, com *P. brasiliensis*, macrófagos, neutrófilos e células gigantes na porção central, circundados por células epitelióides; HE, 245x e 614x, respectivamente. C e D: lesão na cápsula hepática e infiltrado inflamatório no parênquima do órgão, com células gigantes, células epitelióides, neutrófilos, macrófagos e acúmulo de MEC; HE, 245x e 614x.

**Tabela VIII** - Análise semiquantitativa de *P. brasiliensis* de diferentes aspectos morfológicos em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata, em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18.

	Baço	Epiploon	Fígado	Pulmão
<b>C3H/HeJ, 7d</b>	++++	++++	++++	++++
<b>C3H/HePas, 7d</b>	++++	++++	++++	++++
<b>C3H/HeJ, 15d</b>	++++	++++	++++	++++
<b>C3H/HePas, 15d</b>	++++	++++	++++	++++
<b>C3H/HeJ, 30d</b>	++++	++++	++++	++++
<b>C3H/HePas, 30d</b>	++++	++++	++++	++++
<b>C3H/HeJ, 180d</b>	-	-	-	-
<b>C3H/HePas, 180d</b>	-	-	-	-
<b>C3H/HeJ, 300d</b>	-	-	-	-
<b>C3H/HePas, 300d</b>	-	-	-	-
<b>C3H/HeJ, 485d</b>	-	-	-	-
<b>C3H/HePas, 485d</b>	-	-	-	-

Dados representativos de dois experimentos ( $N = 20$  camundongos C3H/HeJ ou C3H/HePas).

NOTA:

(-): ausência completa de *P. brasiliensis*

(+): presença de poeira fúngica

(++): presença de pequena quantidade de *P. brasiliensis* com morfologia alterada e ausência de fungo com morfologia preservada

(+++): predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada, com presença de fungo com morfologia preservada

(++++): presença de *P. brasiliensis* com morfologia preservada

#### **4.5 Efeitos da terapia antifúngica realizada com anfotericina B lipossomal em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18**

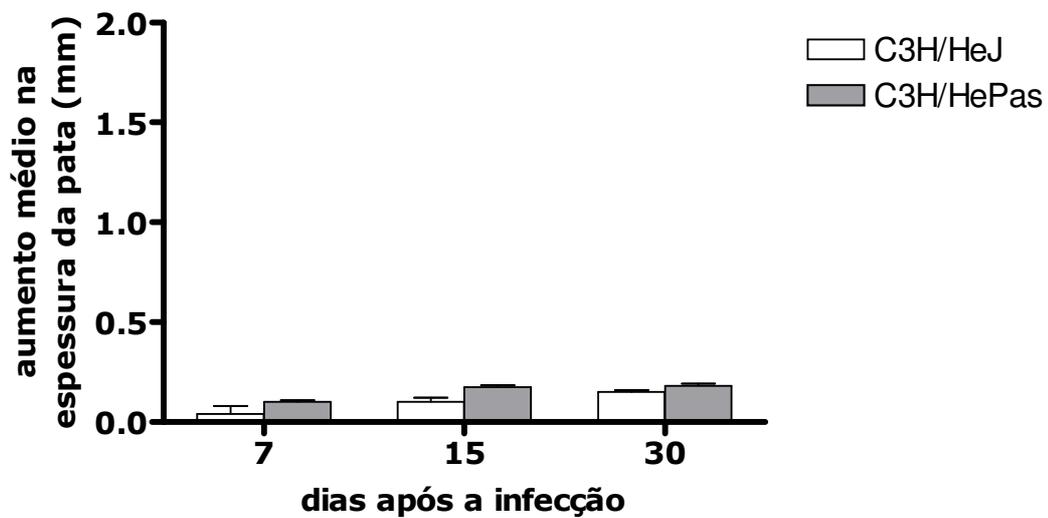
Em experimentos preliminares, a dose ideal de L-AmB, de 5 mg/kg/dia (determinada em camundongos B10.A e utilizada nos ensaios referentes aos efeitos da terapia antifúngica em animais suscetíveis), quando administrada a camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas, diminui a carga fúngica de maneira expressiva e uniforme, impossibilitando a observação da suposta interação da droga com o receptor (dados não mostrados). Por isso, os experimentos relatados a seguir foram realizados com metade desta dose ideal, equivalente a 2,5 mg L-AmB/kg/dia.

O peso corpóreo dos animais não é significativamente alterado pela inoculação de *P. brasiliensis* ou pela administração de L-AmB (dados não mostrados).

As respostas em reações de HTT contra antígeno homólogo são mostradas na **Figura 35**. Nos três tempos após a infecção, as respostas apresentadas por animais C3H/HePas submetidos à terapia tendem a ser maiores do que as verificadas em camundongos C3H/HeJ; no entanto, não são detectadas diferenças estatísticas significativas entre as duas linhagens murinas.

Os resultados obtidos nas contagens totais e diferenciais de leucócitos podem ser observados na **Tabela IX**.

Observa-se, nas duas linhagens, diminuição significativa do número de leucócitos totais após a inoculação de *P. brasiliensis* e a administração de L-AmB. Neutrófilos imaturos não são encontrados antes da infecção. Nos dois grupos experimentais, após a inoculação do fungo, o número destas células sofre uma elevação, que é significativa nos dois últimos pontos analisados. Os números de neutrófilos maduros, em ambas as linhagens murinas, são similares até o 15º dia; aos 30 dias, tais números se elevam nos dois grupos experimentais, sendo significativamente maiores do que os observados antes da infecção ou na primeira quinzena



**Figura 35** - Respostas em reações de HTT em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

**Tabela IX** - Perfis leucocitários de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia.

	Le	PMNi	PMNm	Eos	Ly	M	Bas
<b>C3H/HeJ, -1d</b>	3422±532	0±0	370±50	0±0	3007±413	39±17	40±13
<b>C3H/HePas, -1d</b>	5386±470	0±0	574±55	0±0	4602±466	123±38	94±15
<b>C3H/HeJ, 7d</b>	2880±165 ◇	100±100	400±54	286±114* ◇	1800±100 ◇	5±5	0±0
<b>C3H/HePas, 7d</b>	4233±225 ◇	177±131	567±80	0±0	4050±510 *	25±12	0±0
<b>C3H/HeJ, 15d</b>	2490±698 ●	1235±666 ●❖	423±55	291±154 *●	403±170 ●	0±0	0±0
<b>C3H/HePas, 15d</b>	2367±353 ●	1212±177 ●❖	403±170	0±0	800±80 *●❖	0±0	0±0
<b>C3H/HeJ, 30d</b>	2204±105 ■	0±0 □	1453±208 ■○□	0±0 ○■	983±106 ■○	0±0	0±0
<b>C3H/HePas, 30d</b>	4245±108 ■	0±0 □	1347±52 ■○□	0±0	347±52 *■○	0±0	0±0

Os resultados foram expressos como número de células por milímetro cúbico ± erro médio padrão.

NOTA: Abreviaturas e símbolos:

Le: leucócitos totais

PMNi: neutrófilos imaturos

PMNm: neutrófilos maduros

Eos: eosinófilos

Ly: linfócitos

M: monócitos

Bas: basófilos

\*: diferença estatística significativa entre as duas linhagens

◇: diferença estatística significativa entre os resultados obtidos antes da infecção e aos 7 dias

●: diferença estatística significativa entre os resultados obtidos antes da infecção e aos 15 dias

■: diferença estatística significativa entre os resultados obtidos antes da infecção e aos 30 dias

❖: diferença estatística significativa entre os resultados aos 7 e 15 dias de infecção

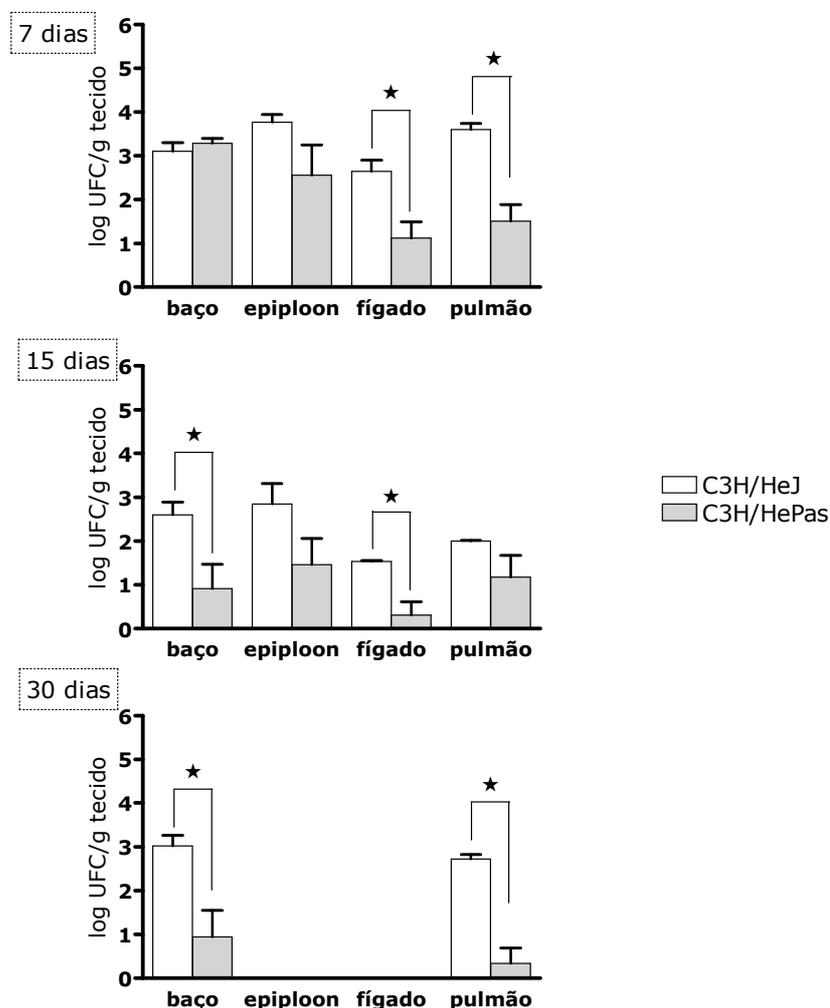
○: diferença estatística significativa entre os resultados aos 7 e 30 dias de infecção

□: diferença estatística significativa entre os resultados aos 15 e 30 dias de infecção

após a inoculação. Eosinófilos são apenas observados em camundongos C3H/HeJ, aos 7 e 15 dias; nestes dois pontos, o número de células observado é significativamente maior do que o encontrado nesta mesma linhagem antes da infecção ou aos 30 dias e também ao detectado em camundongos C3H/HePas. Em relação ao número de linfócitos circulantes, observa-se que, aos 7 dias, camundongos C3H/HeJ, mas não C3H/HePas, apresentam menos células do que antes da infecção; nos indivíduos TLR4-deficientes, o número de linfócitos é também menor do que o encontrado em seus controles suficientes. Aos 15 dias, ambas as linhagens apresentam menos linfócitos circulantes do que nos períodos anteriormente analisados; novamente, camundongos C3H/HePas possuem maior número de células do que C3H/HeJ. Aos 30 dias, o número de linfócitos aumenta em C3H/HeJ, mas ainda é menor do que o encontrado antes da infecção ou aos 7 dias. Camundongos C3H/HePas, por outro lado, possuem menos linfócitos circulantes aos 30 dias do que antes da inoculação do fungo. As contagens de basófilos e monócitos, embora tenham variado ao longo do período analisado, não são significativamente alteradas pela infecção ou administração da droga.

Os resultados referentes à quantificação de fungos viáveis são mostrados na **Figura 36**. Nota-se que, em todos os tempos analisados após a infecção, o número de leveduras de *P. brasiliensis* tende a ser maior em camundongos C3H/HeJ do que o observado em C3H/HePas. Diferenças estatísticas significativas entre as duas linhagens são observadas, no 7º dia após a infecção, no fígado e no pulmão, no 15º dia, no baço e no fígado e, no 30º dia, no baço e no pulmão. Aos 30 dias, verifica-se a esterilização do epiploon e do fígado em ambas as linhagens.

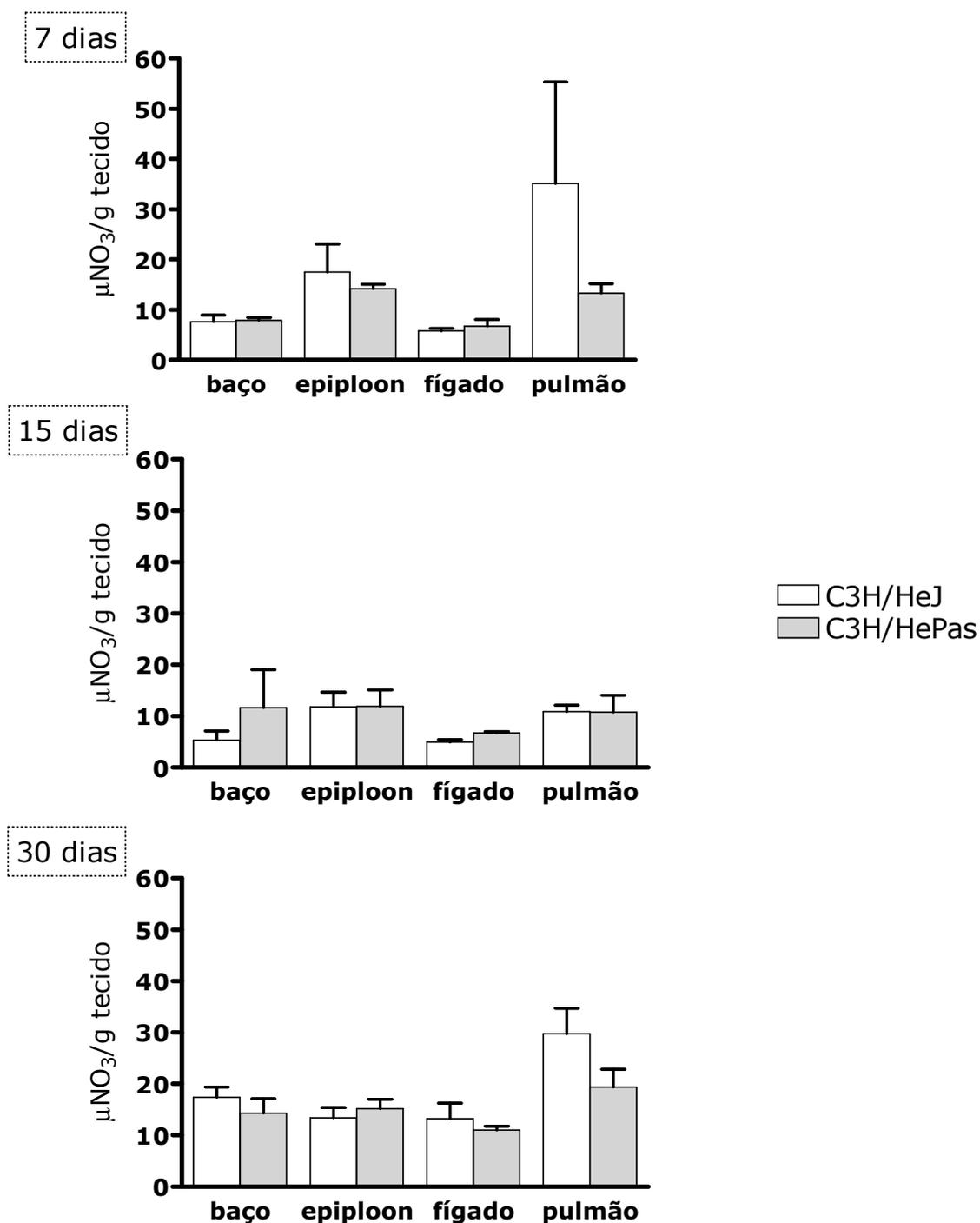
Na **Figura 37**, são mostrados os resultados obtidos na determinação de NO em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas aos 7, 15 e 30 dias de infecção. A síntese do reativo é similar nas duas linhagens em todos os pontos analisados; diferenças estatísticas significativas não são observadas.



**Figura 36** - Quantificação de fungos viáveis em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa.



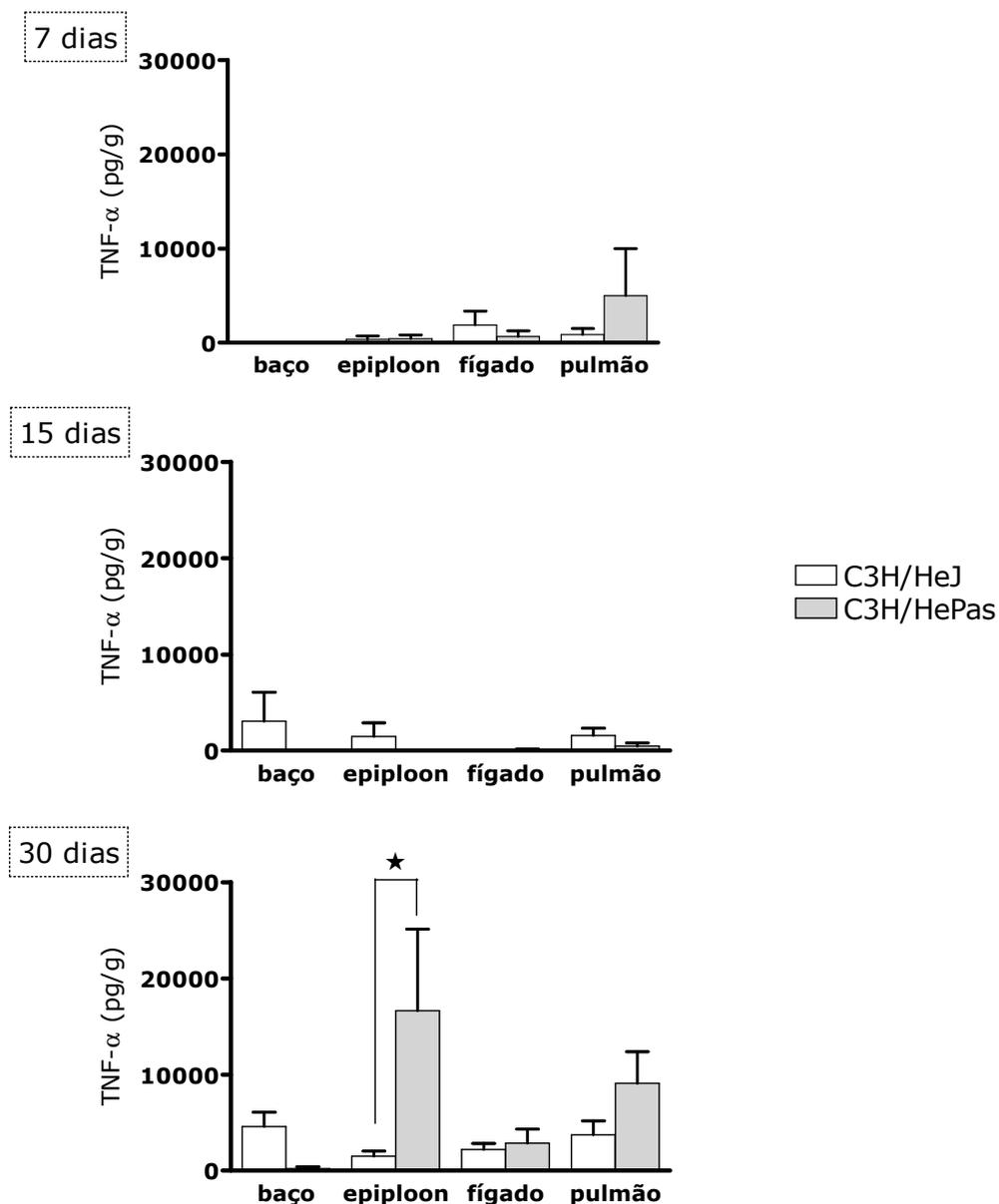
**Figura 37** - Determinação da concentração de NO, mensurado sob a forma de nitrito, em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

Na determinação das concentrações de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de órgãos de camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, mostrada na **Figura 38**, nota-se que, na 1ª quinzena de infecção, a citocina é encontrada em níveis baixos e similares nas duas linhagens murinas. Aos 30 dias, estes níveis tendem a aumentar em ambos os grupos experimentais. Neste ponto, camundongos C3H/HePas apresentam concentrações de TNF- $\alpha$  significativamente maiores do que indivíduos C3H/HeJ.

Os resultados referentes às dosagens de IL-12 são colocados na **Figura 39**. Aos 7 dias de infecção, as concentrações de IL-12 são baixas em ambas as linhagens murinas; no baço de animais C3H/HeJ, a citocina não é detectada. Aos 15 dias, a citocina apenas é encontrada, e em níveis muito baixos, no pulmão de camundongos C3H/HeJ. Aos 30 dias, as concentrações de IL-12 são mais altas, principalmente em camundongos C3H/HePas; nestes animais, os níveis de citocina encontrados no epiploon são significativamente maiores do que os observados em C3H/HeJ.

Na quantificação de GM-CSF, mostrada na **Figura 40**, nota-se que, aos 7 dias de infecção, estas concentrações são similares entre as duas linhagens no baço; nos demais órgãos, camundongos C3H/HePas tendem a apresentar níveis mais elevados da citocina. Aos 15 dias, tais níveis são similares nas duas linhagens em baço, epiploon e fígado; no pulmão, camundongos C3H/HeJ tendem a apresentar teores mais elevados de GM-CSF. Aos 30 dias, as concentrações de GM-CSF tendem a ser maiores no baço de camundongos C3H/HeJ, são similares no epiploon e no fígado e tendem a ser mais elevadas no pulmão de C3H/HePas. Diferenças estatísticas não são observadas.

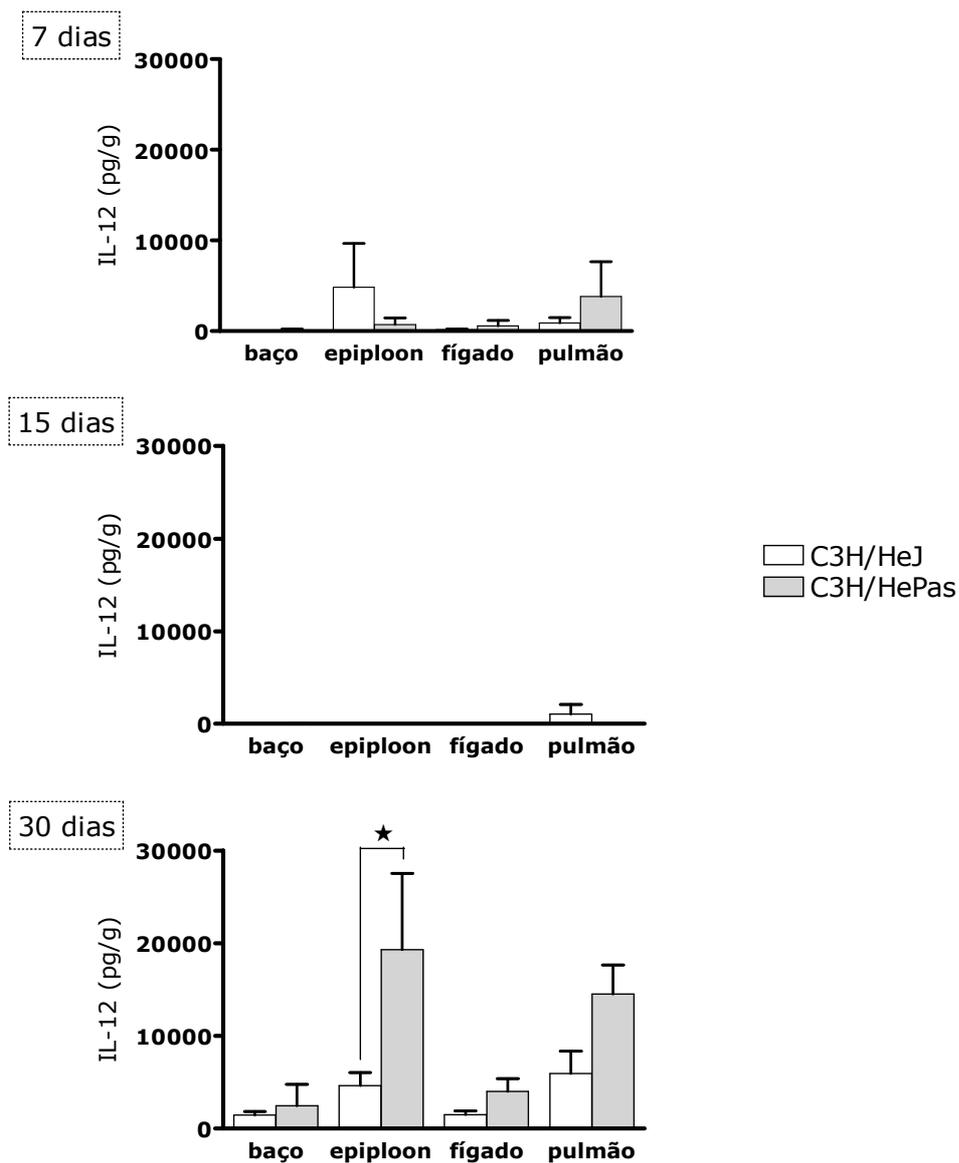
Os resultados obtidos às análises anátomo-patológicas são colocados na **Tabela X**. Observa-se tendência à diminuição no grau de comprometimento dos órgãos entre o 7º e o 30º dia de infecção. Não são encontradas lesões em área condizente à inoculação da droga, comprometimento do peritônio ou pneumonia em nenhum dos pontos analisados.



**Figura 38** - Determinação da concentração de TNF- $\alpha$  em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

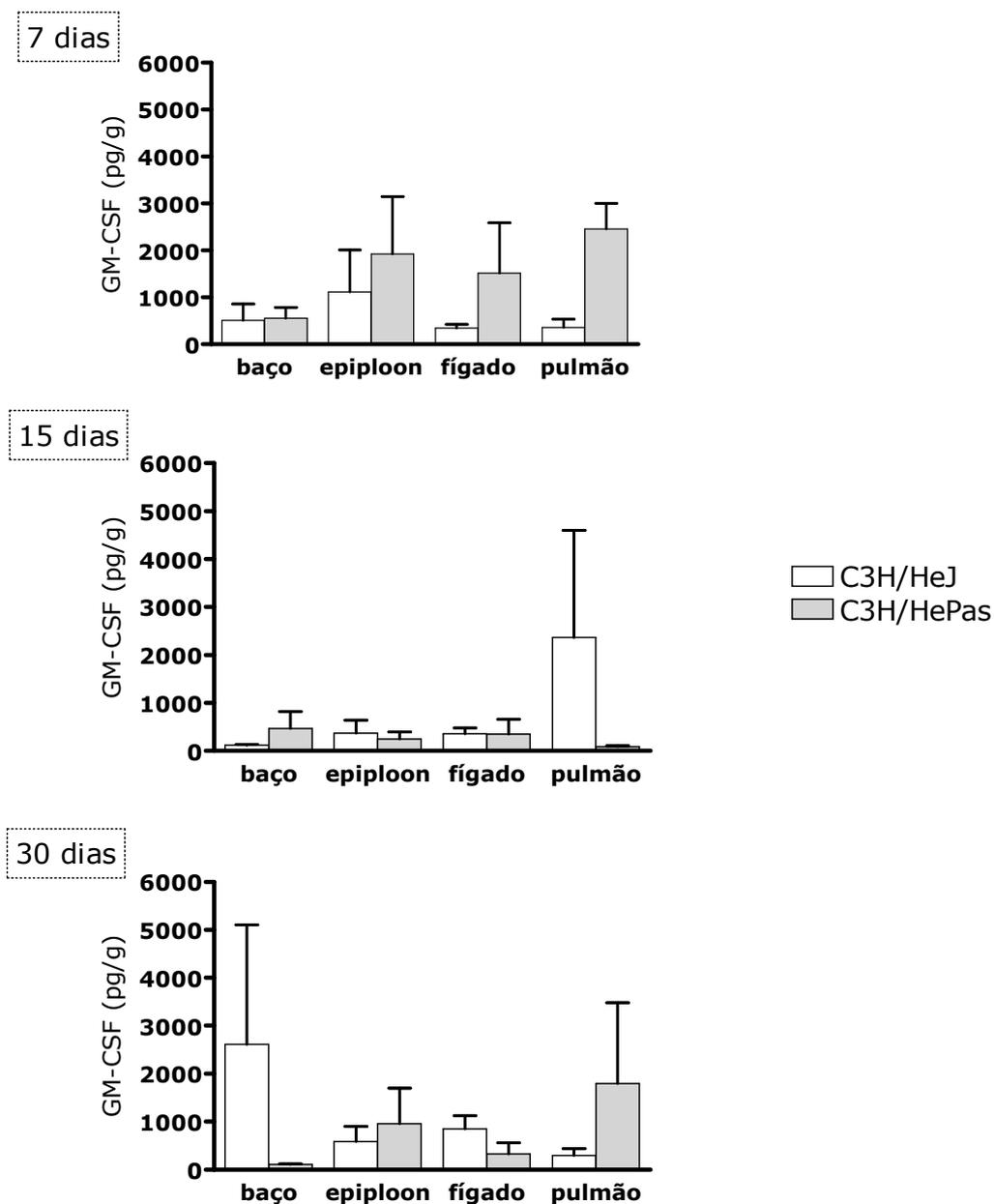
★: diferença estatística significativa entre as duas linhagens.



**Figura 39** - Determinação da concentração de IL-12 em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia.

As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

★: diferença estatística significativa entre as duas linhagens.



**Figura 40** - Determinação da concentração de GM-CSF em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia. As barras indicam o erro médio padrão. Dados representativos de um experimento (N = 10 [C3H/HeJ] e 10 [C3H/HePas]), submetidos a análises de variância seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

**Tabela X** - Exame anátomo-patológico realizado camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas inoculados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia.

	Ad	NE	HEp	CP	LAI	EM	HM	Pn
<b>C3H/HeJ, 7d</b>	+	+	+	-	-	+	-	-
<b>C3H/HePas, 7d</b>	+	+	+	-	-	+	+	-
<b>C3H/HeJ, 15d</b>	-	-	++	-	-	-	+	-
<b>C3H/HePas, 15d</b>	-	-	±	-	-	-	+	-
<b>C3H/HeJ, 30d</b>	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>C3H/HePas, 30d</b>	-	-	±	-	-	-	-	-

Dados representativos de um experimento ( $N = 10$  camundongos C3H/HeJ ou C3H/HePas).

NOTA: Abreviaturas e símbolos:

Ad: aderência das vísceras ao peritônio e entre sistema imunológico

NE: necrose esplênica

HEp: hiperplasia do epíloon

CP: comprometimento do peritônio (presença de focos fúngicos na serosa)

LAI: lesão peritoneal em área condizente com a inoculação de AmB

EM: esplenomegalia

HM: hepatomegalia

Pn: pneumonia

(-) nada digno de nota

(±) muito discreto

(+) discreto

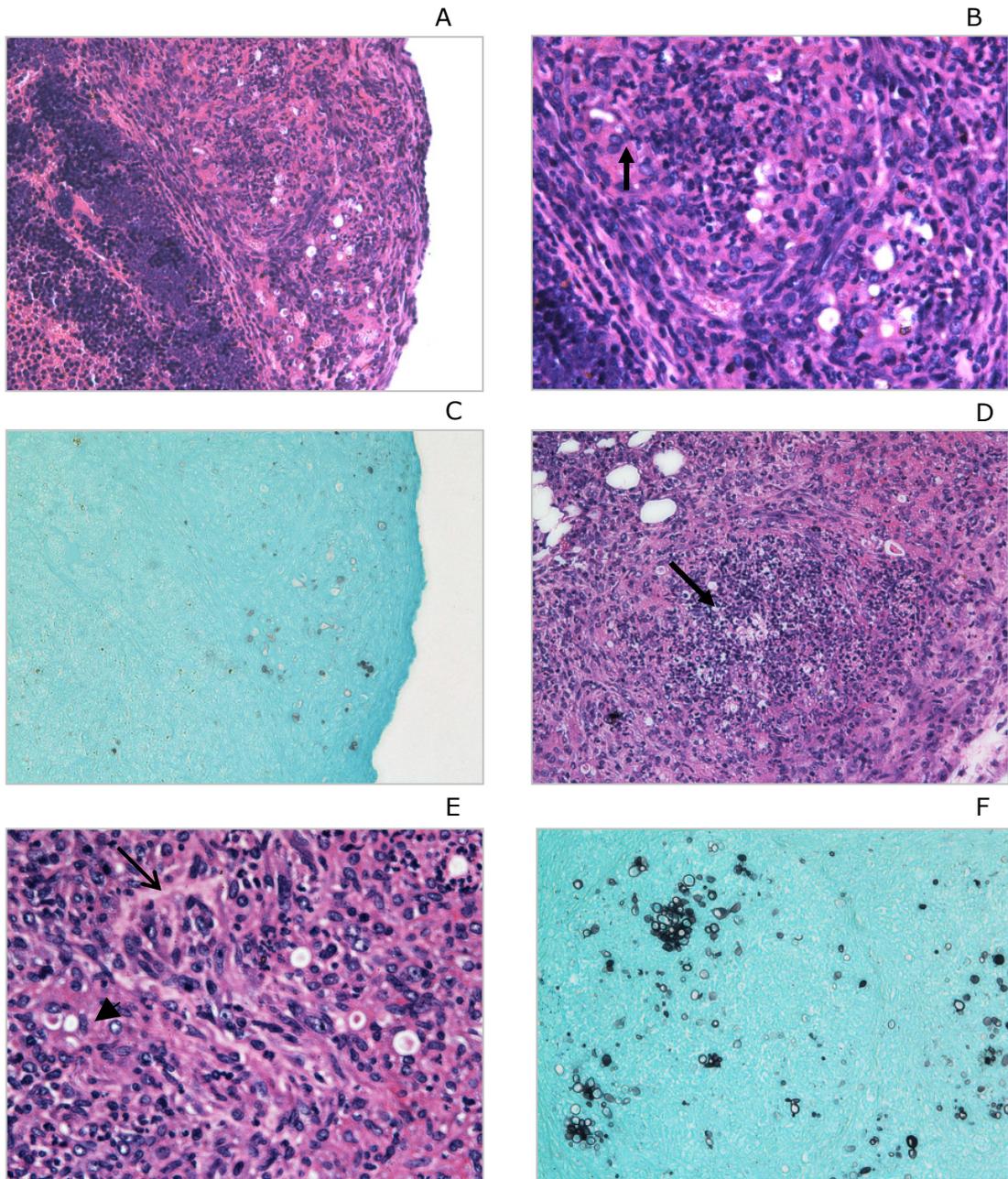
(++) moderado

(+++) grave

(++++) muito grave

À análise histopatológica descritiva de fragmentos de tecido, observam-se, em camundongos C3H/HeJ, aos 7 dias após a infecção, no baço, lesões confinadas à cápsula de tecido conjuntivo do órgão, contendo linfócitos, macrófagos, células gigantes e poucas leveduras de *P. brasiliensis* (**Prancha XIII A, B e C**). No epiploon, as lesões são semi-encapsuladas, contendo células mononucleares (linfócitos, macrófagos e células epitelióides) e células gigantes, com acúmulo de MEC (**Prancha XIII D, E e F**). No fígado, observam-se pequenos infiltrados inflamatórios, tanto na cápsula quanto no parênquima do órgão, com pequeno número de leveduras do fungo (**Prancha XIV A e B**). Por fim, nos pulmões, são observadas lesões parenquimatosas, com poucos *P. brasiliensis* (**Prancha XIV C e D**). Neste mesmo tempo após a infecção, em camundongos C3H/HePas, há pequenas lesões na cápsula esplênica, com infiltrado mononuclear e neutrofílico envolto por MEC e poucas células fúngicas (**Prancha XV A e B**). No epiploon, as lesões tendem a ser mais extensas, contendo infiltrados neutrofílicos nas áreas de necrose, envoltos por fibras da MEC e lesões semifechadas contendo macrófagos, células epitelióides e células gigantes e acúmulo de MEC (**Prancha XV C, D e F**). No fígado, observam-se poucas lesões na cápsula hepática, além de pequenos infiltrados inflamatórios no parênquima do órgão (**Prancha XVI**). Não há lesões ou alterações dignas de nota nos pulmões (dados não mostrados).

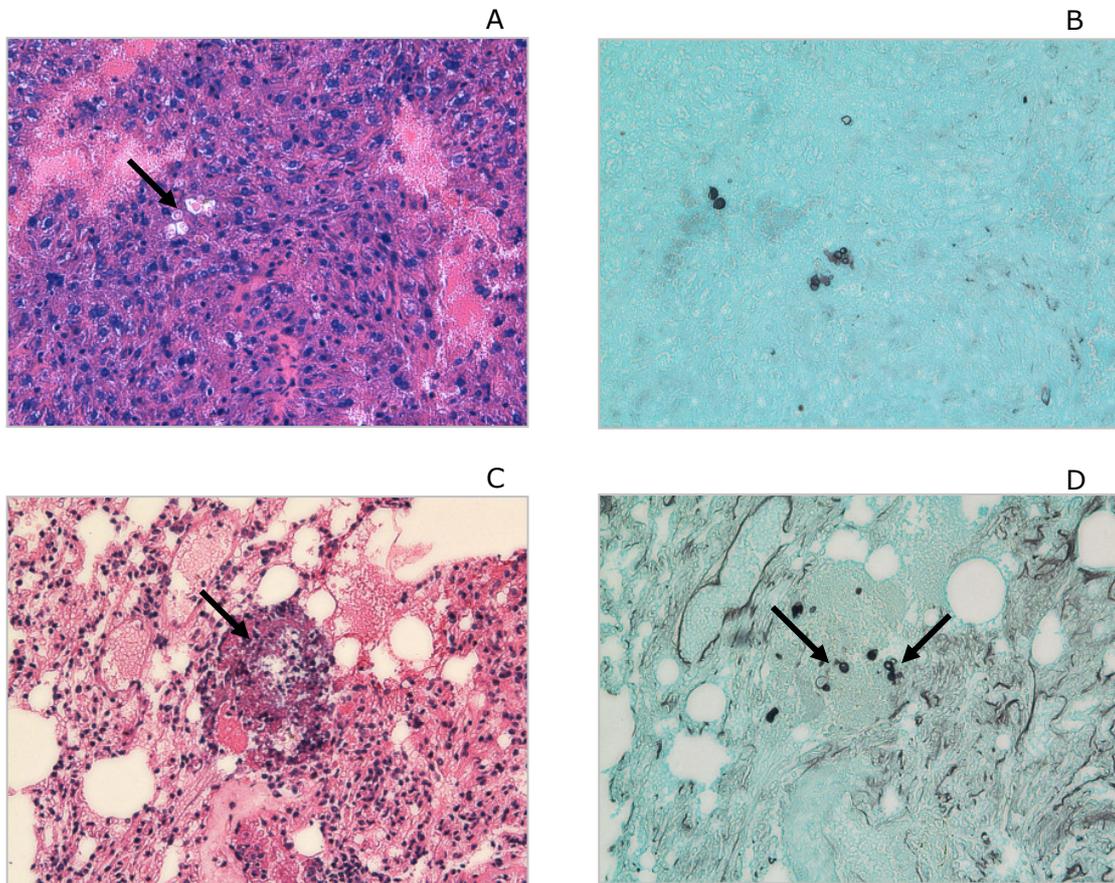
Aos 15 dias de infecção, em baço, epiploon e fígado de camundongos C3H/HeJ, o perfil lesional é bastante similar ao observado aos 7 dias (**Prancha XVII**). Não há lesões ou alterações dignas de nota no tecido pulmonar (dados não mostrados). Em camundongos C3H/HePas, as lesões esplênicas são similares às observadas aos 7 dias, mas de menor gravidade (**Prancha XVIII A**). No epiploon, as alterações são semelhantes às visualizadas no 7º dia de infecção (**Prancha XVIII C, D, E e F**) e, no fígado, há lesões parenquimatosas, com número restrito de leveduras de *P. brasiliensis* (**Prancha XVIII B**). No pulmão, novamente, não há alterações significativas (dados não mostrados).



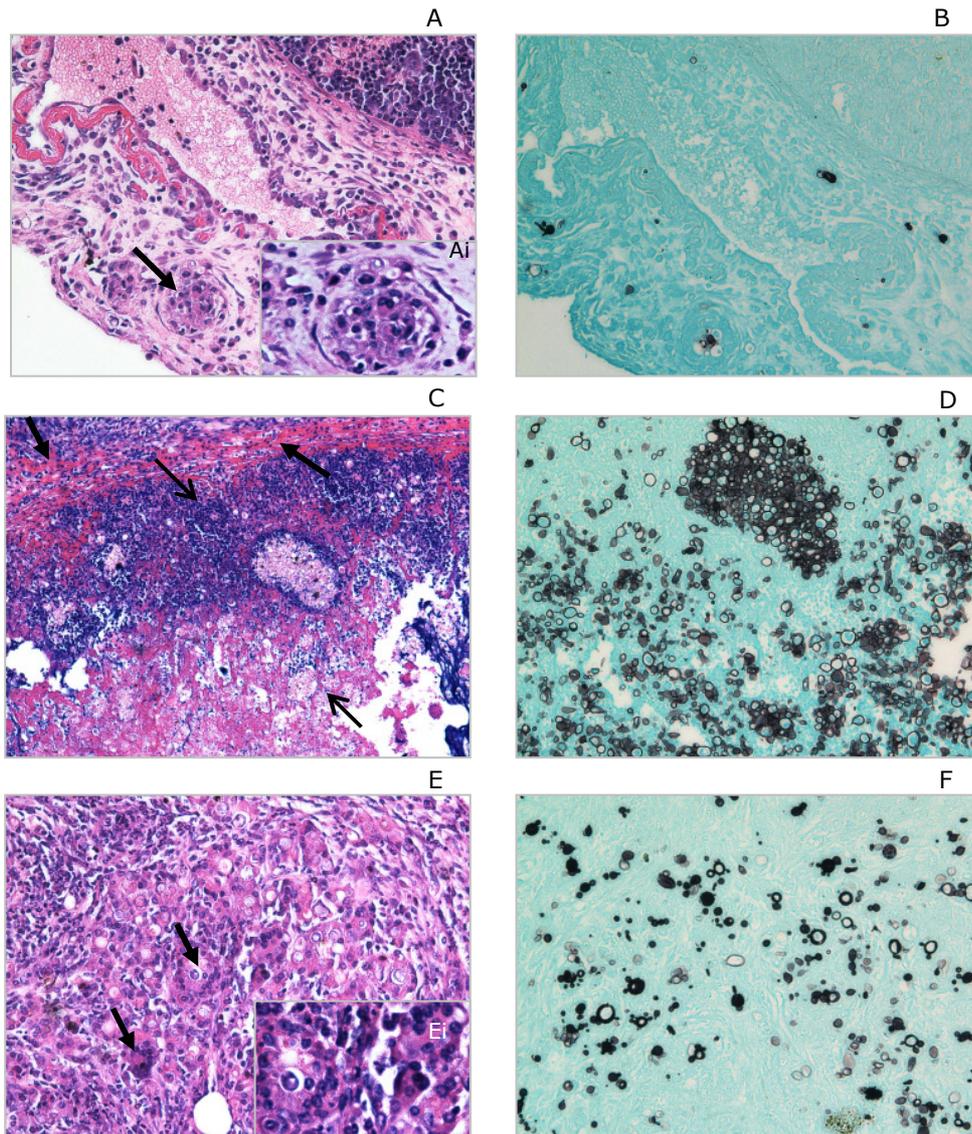
**Prancha XIII** - Análise histopatológica realizada em baço e epiploon de camundongos C3H/HeJ infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 7 dias após a infecção. A e B: lesão na cápsula esplênica, contendo linfócitos, macrófagos, células gigantes (seta) e poucas leveduras de *P. brasiliensis*; HE, 200x e 400x.

D e E: lesão frouxa em epiploon com área contendo infiltrado neutrofílico ao redor de células fúngicas (seta) e presença de macrófagos, células epitelióides e células gigantes (ponta de seta) envolvendo leveduras de *P. brasiliensis*, e acúmulo de matriz extracelular (seta aberta); HE, 200x e 400x.

C e F: leveduras de *P. brasiliensis* de morfologia preservada no baço e no epiploon; prata-metamina, 200x.



**Prancha XIV** - Análise histopatológica realizada em fígado e pulmão de camundongos C3H/HeJ infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 7 dias após a infecção. A: pequeno foco inflamatório no parênquima hepático contendo leveduras de *P. brasiliensis* (seta); HE, 200x. B: poucas células fúngicas de morfologia preservada no fígado; prata-metamina, 200x. C: infiltrado inflamatório no pulmão (seta) contendo leveduras de *P. brasiliensis*, com material extracelular ao redor; HE, 200x. D: no mesmo corte histológico mostrado em C, presença de células fúngicas de morfologia preservada (setas); prata-metamina, 200x.



**Prancha XV** - Análise histopatológica realizada em baço e epíplon de camundongos C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-Amb/kg/dia, 7 dias após a infecção.

A: lesão na cápsula esplênica, com infiltrado inflamatório mononuclear, leveduras de *P. brasiliensis* (seta) e ao redor, plasmócitos e material extracelular (Ai); HE, 200x e 400x.

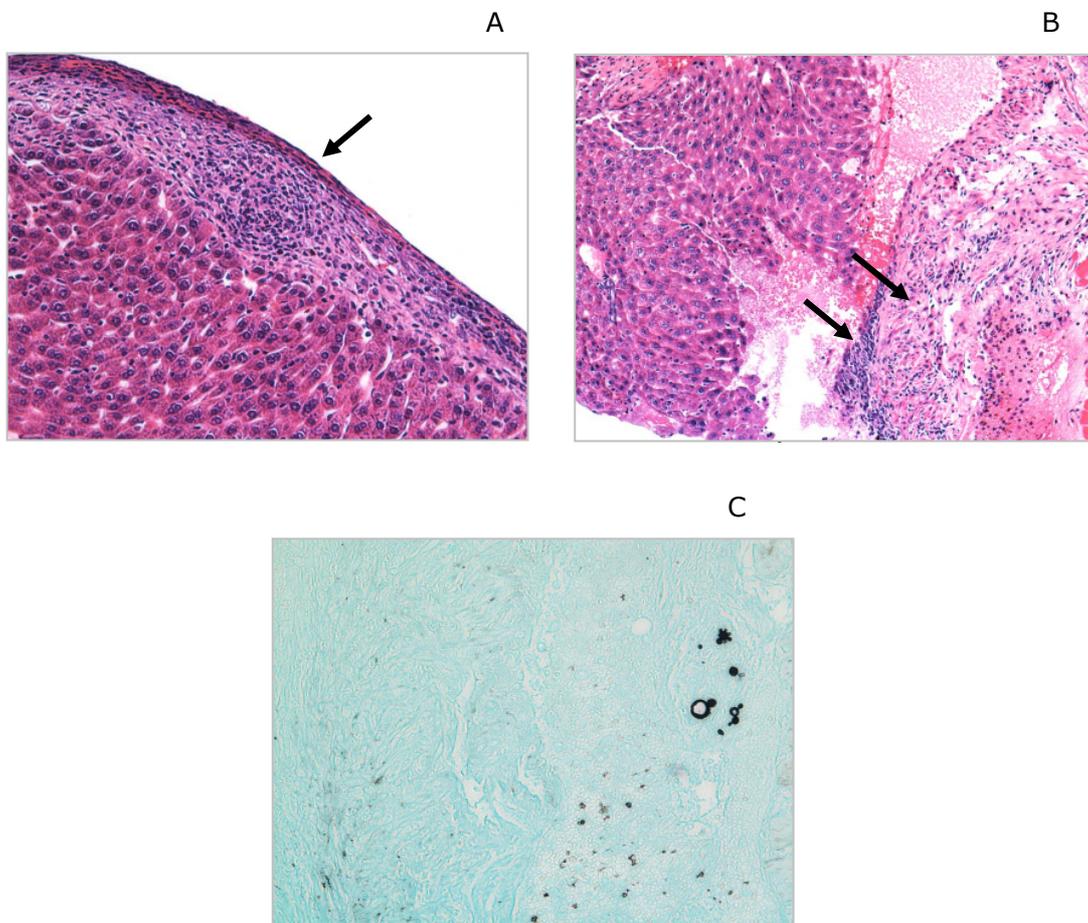
B: células fúngicas de morfologia preservada no baço; prata-metamina, 200x.

C: lesão com necrose (setas abertas) em epíplon circunscrita por fibras da matriz extracelular (setas); HE, 100x.

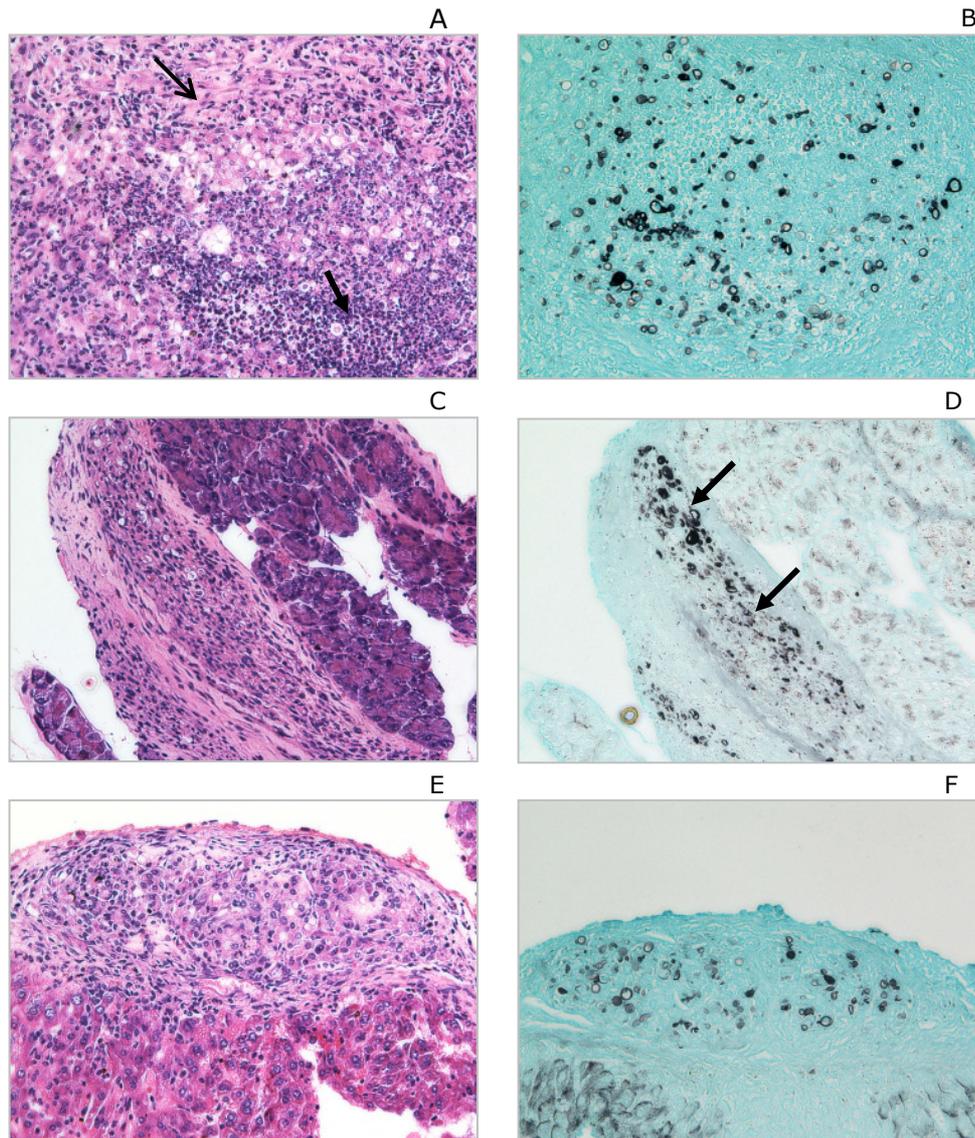
D: inúmeras células leveduriformes com morfologia preservada e alterada; prata-metamina, 200x.

E: lesão frouxa no epíplon contendo muitas células gigantes (setas e Ei) ao redor de leveduras de *P. brasiliensis*; HE, 200x e 400x.

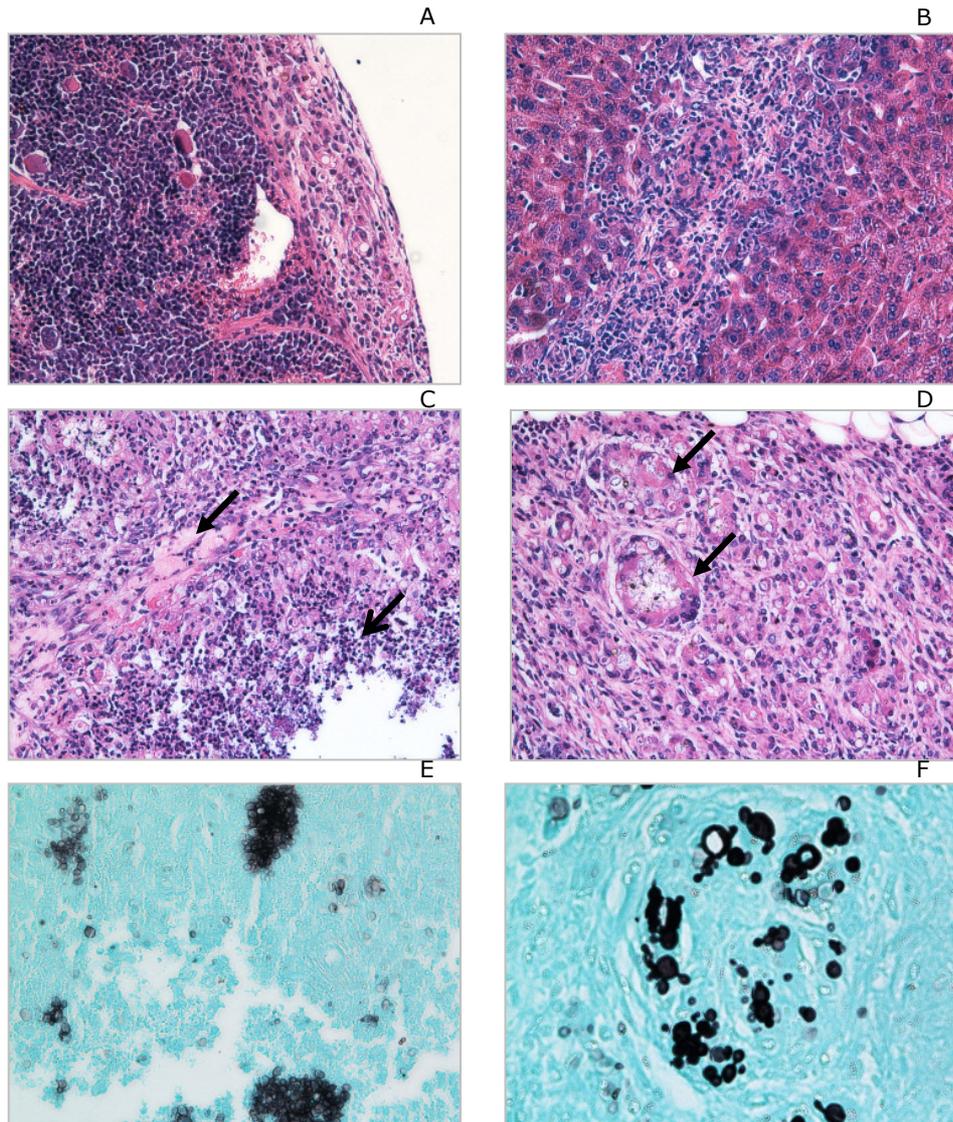
F: no mesmo corte histológico (E), leveduras de *P. brasiliensis* com múltiplos brotamentos; prata-metamina, 200x.



**Prancha XVI** - Análise histopatológica realizada em fígado de camundongos C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 7 dias após a infecção.  
A: lesão na cápsula de tecido conjuntivo (seta) e ausência de lesão no parênquima hepático; HE, 200x.  
B: reação inflamatória em região periférica do fígado (setas), com presença de matriz extracelular; HE, 200x.  
C: pequeno número de leveduras de *P. brasiliensis* de morfologia preservada e alterada no fígado; prata-metamina, 200x.



**Prancha XVII** - Análise histopatológica realizada em baço, epíplon e fígado de camundongos C3H/HeJ infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 15 dias após a infecção. A: lesão na cápsula de tecido conjuntivo do baço, com áreas contendo infiltrado inflamatório neutrofílico e leveduras de *P. brasiliensis* (seta); presença de fibras colágenas da matriz extracelular na periferia da lesão (seta aberta); HE 200x. B: *P. brasiliensis* com morfologia característica e de aspecto alterado; prata-metamina, 200x. C: pequena lesão no epíplon aderido ao tecido pancreático; HE, 200x. D: no mesmo campo observado em C, debris e leveduras de *P. brasiliensis* com morfologia alterada (setas); prata-metamina, 200x. E: lesão em zona periférica do fígado; HE, 200x; F: leveduras de *P. brasiliensis* de morfologia preservada e alterada; prata-metamina, 200x.



**Prancha XVIII** - Análise histopatológica realizada em baço, epíplon e fígado de camundongos C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 15 dias após a infecção.

A: pequena lesão na cápsula de tecido conjuntivo no baço, HE, 200x.

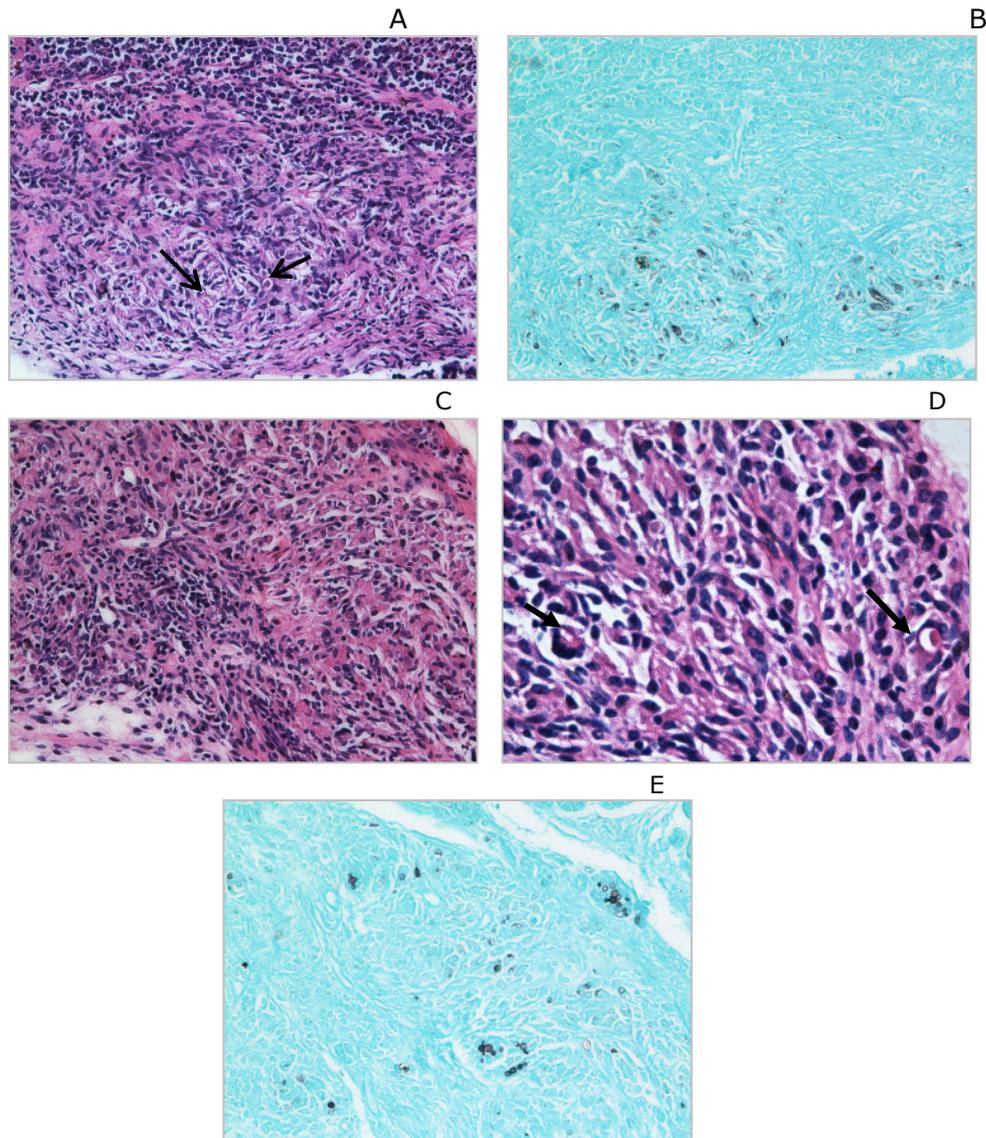
B: lesão no parênquima hepático contendo número restrito de leveduras de *P. brasiliensis*; HE, 200x.

C e D: epíplon com lesão necrótica (seta aberta) circunscrita por fibras da matriz extracelular (setas) e também com lesão semifechada, com células gigantes (setas), macrófagos, linfócitos e matriz extracelular; HE, 200x.

E e F: células fúngicas de morfologia alterada em área de necrose e de morfologia preservada com múltiplos brotamentos em lesão semifechada; prata-metamina, 200x e 400x.

Aos 30 dias de infecção, em camundongos C3H/HeJ, as lesões em baço e epiploon são bastante similares às anteriormente relatadas (**Prancha XIX**); no fígado e pulmão, não há alterações significativas. Neste mesmo tempo após a infecção, em indivíduos C3H/HePas, não são observadas lesões em nenhum dos órgãos avaliados.

Na **Tabela XI** encontram-se os resultados obtidos na análise semiquantitativa de fungos realizada em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata. Em camundongos C3H/HeJ observam-se, aos 7 dias de infecção, leveduras de *P. brasiliensis* de morfologia preservada nos quatro órgãos analisados. Neste mesmo tempo, em C3H/HePas, são encontrados fungos de morfologia preservada no baço e no fígado; no epiploon, há predomínio de *P. brasiliensis* de morfologia alterada e, no pulmão, as leveduras não são visualizadas. Aos 15 dias de infecção, no baço, epiploon e fígado de ambas as linhagens murinas, há predomínio de *P. brasiliensis* de morfologia alterada e, no pulmão, ausência completa do patógeno. Por fim, aos 30 dias, observa-se predomínio de fungos de morfologia alterada no baço e epiploon de C3H/HeJ e ausência de *P. brasiliensis* nos demais órgãos. Em indivíduos C3H/HePas, aos 30 dias de infecção, não são observadas leveduras em nenhum dos órgãos analisados.



**Prancha XIX** - Análise histopatológica realizada em baço e epíplon de camundongos C3H/HeJ infectados com Pb18 e submetidos ao tratamento com 2,5 mg L-AmB/kg/dia, 30 dias após a infecção.

A: lesão na cápsula de tecido conjuntivo do baço, com intenso infiltrado inflamatório contendo células mononucleares e polimorfonucleares e pequeno número de leveduras de *P. brasiliensis* (seta aberta); HE 200x.

B: debris e células fúngicas de *P. brasiliensis* com morfologia alterada no baço; prata-metamina, 200x.

C e D: pequena lesão frouxa no epíplon contendo intenso infiltrado de células mononucleares, células gigantes e escasso número de focos fúngicos (setas); HE, 200x e 400x.

E: no mesmo campo observado em C e D, leveduras de *P. brasiliensis* com morfologia característica e alterada; prata-metamina, 200x.

**Tabela XI** - Análise semiquantitativa de *P. brasiliensis* de diferentes aspectos morfológicos em cortes histológicos corados pelo método da impregnação pela prata, em camundongos C3H/HeJ e C3H/HePas infectados com Pb18 e submetidos à terapia com 2,5 mg L-AmB/kg/dia.

	Baço	Epiploon	Fígado	Pulmão
<b>C3H/HeJ, 7d</b>	++++	++++	++++	++++
<b>C3H/HePas, 7d</b>	++++	+++	++++	-
<b>C3H/HeJ, 15d</b>	+++	+++	+++	-
<b>C3H/HePas, 15d</b>	+++	+++	+++	-
<b>C3H/HeJ, 30d</b>	+++	+++	-	-
<b>C3H/HePas, 30d</b>	-	-	-	-

Dados representativos de um experimento ( $N = 10$  camundongos C3H/HeJ ou C3H/HePas).

NOTA:

(-): ausência completa de *P. brasiliensis*

(+): presença de poeira fúngica

(++): presença de pequena quantidade de *P. brasiliensis* com morfologia alterada e ausência de fungo com morfologia preservada

(+++): predomínio de *P. brasiliensis* com morfologia alterada, com presença de fungo com morfologia preservada

(++++): presença de *P. brasiliensis* com morfologia preservada.

## 5 DISCUSSÃO

Na primeira parte do presente estudo, foi analisada a possibilidade de reversão do padrão de suscetibilidade, apresentado por camundongos da linhagem B10.A infectados com o isolado virulento Pb18, para o de resistência por meio da administração de terapia antifúngica com c-AmB ou L-AmB.

Às reações de HTT contra antígenos homólogos do fungo, camundongos submetidos à terapia com ambas as formulações da droga apresentam respostas baixas, em um perfil similar ao descrito por (Fazioli et al., 1994), que analisaram sua cinética no modelo murino isogênico da PCM. Estes pesquisadores relatam que, em camundongos suscetíveis ao fungo, estas respostas são baixas na primeira semana de infecção, elevam-se na segunda semana e, posteriormente, diminuem até o estabelecimento de anergia. Por outro lado, em camundongos resistentes, as respostas aumentam gradativamente durante o processo infeccioso e são mantidas em patamares elevados nas fases crônicas da doença. O fenômeno aqui observado, portanto, pode constituir uma indicação da reversão do padrão imunológico, já que camundongos suscetíveis tratados com anfotericina B apresentam respostas em reações de HTT semelhantes às observadas em indivíduos resistentes ao fungo. Na PCM humana, a hiporresponsividade dos linfócitos T, subjacente à anergia em reações de HTT e relacionada ao descontrole da disseminação do patógeno, pode ser revertida por meio da administração de terapia antifúngica (Cacere et al., 2008).

Na quantificação de fungos viáveis, observa-se que, embora a administração de ambas as formulações de anfotericina reduzam a carga fúngica, a droga lipossomal apresenta maior eficiência do que a convencional. A L-AmB também parece ser mais eficaz durante a primeira quinzena de infecção, o que enfatiza a importância do diagnóstico precoce e da pronta instituição da terapia em seres humanos acometidos pela doença. De acordo com (Singer-Vermes et al., 1993), no modelo

murino da PCM, números equivalentes de UFC no baço, epíplon e fígado são encontrados em camundongos resistentes e suscetíveis ao fungo até os 90 dias de infecção. Apenas a partir do 120º dia a carga fúngica isolada de animais suscetíveis passa a ser maior do que a verificada em indivíduos resistentes. No pulmão, a disseminação do fungo é mais lenta e, 30 dias após a inoculação, a carga fúngica neste órgão é maior em animais resistentes; nas fases tardias da infecção, o número de fungos isolado nos pulmões é maior nos indivíduos suscetíveis do que nos resistentes. Portanto, nota-se que, neste modelo experimental, a administração de anfotericina B (ainda o *golden standard* do tratamento da PCM), especialmente em sua forma lipossomal, altera a progressão e a gravidade da doença de forma significativa, sendo inclusive mais eficaz do que o sistema imunológico de indivíduos resistentes ao *P. brasiliensis*.

Tal eficácia no controle da disseminação fúngica é também demonstrada na análise dos perfis leucocitários encontrados em camundongos suscetíveis infectados com o fungo e submetidos ou não ao tratamento com L-AmB. Aos 7 dias de infecção, apenas animais não tratados apresentam neutrofilia, igualmente observada por Bruneri (1995) em camundongos suscetíveis, mas não em resistentes. Portanto, pode-se supor que a administração de L-AmB, por diminuir significativamente a carga fúngica dos animais, torna desnecessária a liberação excessiva de neutrófilos da medula óssea. Os resultados das contagens de neutrófilos maduros e imaturos também mostram que, embora estas células sejam bastante importantes na resposta anti-*P. brasiliensis* (uma vez que maiores números de neutrófilos maduros são encontrados em camundongos não tratados), o gasto destas células não é expressivo a ponto de causar um desvio à esquerda, ou seja, a liberação de células imaturas da medula óssea. Além disso, camundongos não submetidos ao tratamento apresentam eosinofilia aos 30 dias de infecção; Bruneri (1995) relata que animais suscetíveis, embora não apresentem diferenças marcantes em relação aos resistentes nas contagens de eosinófilos circulantes, possuem números significativamente maiores destas células

na medula óssea. A eosinofilia é um fenômeno relacionado ao perfil Th2 de resposta imunológica, para o qual tendem os camundongos suscetíveis à PCM. Assim, a eosinofilia observada em animais não tratados está relacionada à progressão do processo infeccioso, confirmada na quantificação de fungos viáveis anteriormente discutida.

Os números de leucócitos totais, linfócitos e monócitos, nos três tempos após a infecção, diminuem de forma significativa em ambos os grupos experimentais; fenômeno similar é relatado por Bruneri (1995), que constata uma diminuição no número de células mononucleares no sangue periférico de camundongos resistentes e suscetíveis durante a infecção pelo Pb18. Em alguns dos pontos analisados, porém, esta diminuição é maior em animais submetidos ao tratamento do que nos apenas infectados. Embora a L-AmB esteja relacionada a efeitos imunossupressores em alguns modelos experimentais (Boggs et al., 1991; Schindler et al., 1993; Kretschmar et al., 2001), não foram encontrados, na literatura, relatos acerca de efeitos citotóxicos diretos desta droga sobre células mononucleares. Segundo (Schindler et al., 1993), ambas as formulações de anfotericina B reduzem a capacidade de proliferação de linfócitos T e B, principalmente quando administradas em doses maiores do que as de relevância clínica. Neste fenômeno, porém, a citotoxicidade direta parece ser pouco importante, já que, em estudos de viabilidade, a droga convencional é significativamente mais tóxica do que a lipossomal e, ainda assim, diminui a quantidade de células viáveis em menos de 10%. Além disso, em nossos experimentos, quando neutrófilos e macrófagos de camundongos B10.A são co-cultivados com leveduras de *P. brasiliensis*, sua viabilidade não é significativamente alterada.

O tratamento com ambas as formulações de anfotericina B tende a diminuir as concentrações de NO nos órgãos analisados, principalmente na primeira quinzena de infecção. Em modelo *ex vivo*, macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis co-cultivados com *P. brasiliensis* produzem maiores concentrações de nitrito aos 7 e 15 dias de infecção do que as células de indivíduos resistentes (Nascimento et al., 2002).

Portanto, embora no presente estudo os níveis de NO tenham sido mensurados em sobrenadantes de órgãos, e não de co-cultivos, pode-se deduzir que a menor secreção deste reativo intermediário em indivíduos submetidos à terapia traduz fenômeno similar ao observado em animais resistentes. Em estudo realizado em camundongos NO *knock-out*, Bernardino (2005) constatou que tais animais, embora apresentem maior carga fúngica aos 70 dias de infecção, o último tempo analisado, também possuem granulomas mais organizados. Camundongos *wild-type*, por sua vez, têm menor número de fungos isolados de órgãos, mas apresentam granulomas desorganizados. O tratamento de camundongos infectados com Pb18 com um inibidor específico da síntese de NO previne a diminuição de respostas imunoproliferativas mediada por este reativo, além de aumentar a liberação espontânea de TNF- $\alpha$ ; tais dados sugerem que, embora o NO seja importante no processo de morte do fungo, a ativação de sua produção na infecção paracoccidiodomicótica contribui para a relativa imunossupressão observada durante o curso da doença (Bocca et al., 1998).

Assim como os níveis de NO encontrados nos sobrenadantes de órgãos são modificados pela administração da terapia, as concentrações de citocinas também são alteradas. O TNF- $\alpha$  é encontrado em maiores concentrações em camundongos submetidos ao tratamento com L-AmB do que nos controles apenas infectados; é interessante notar que estes mesmos indivíduos apresentam menor secreção de NO. Em relação aos níveis de GM-CSF, observa-se que, embora o tratamento com c-AmB não os alterem de forma significativa, as concentrações desta citocina são maiores nos indivíduos tratados com L-AmB. Tais níveis elevados, porém, não se refletem nos perfis leucocitários observados em animais submetidos ao tratamento, embora esta citocina estimule a produção de granulócitos e monócitos. A administração de c-AmB aumenta os níveis de IFN- $\gamma$  no baço e no fígado na 1ª semana de infecção, enquanto a de L-AmB diminui as concentrações desta citocina no 15º e no 30º dia de infecção. Como mencionado anteriormente, a resistência na PCM murina é

acompanhada pela constante produção de IFN- $\gamma$ , desde a fase inicial da infecção. No modelo *ex vivo* de PCM, as células de linfonodos de camundongos suscetíveis, quando estimuladas com antígeno *cell-free* de *P. brasiliensis*, não produzem IFN- $\gamma$  aos 7 dias de infecção e, aos 15 dias, secretam esta citocina em concentrações muito baixas. As células de animais resistentes, porém, já produzem IFN- $\gamma$  aos 7 dias e, aos 15, a citocina é secretada em concentrações elevadas (Kashino et al., 2000). Embora os resultados aqui apresentados tenham sido obtidos em sobrenadantes de órgãos e não em experimentos *ex vivo*, o que pode prejudicar sua comparação, não parece haver passagem do perfil de suscetibilidade para o de resistência quanto à secreção de IFN- $\gamma$ . É interessante notar que a administração da droga em sua formulação convencional tende a aumentar as concentrações da citocina, mesmo em indivíduos não infectados, enquanto a L-AmB parece diminuí-las. Este fenômeno pode ser atribuído a duas causas. Em primeiro lugar, a menor carga fúngica pode reduzir a ativação do sistema imunológico como um todo, o que se refletiria na menor concentração de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ . Além disso, como já discutido, a L-AmB apresenta menos efeitos pró-inflamatórios do que a c-AmB, já que estas drogas estimulam, respectivamente, TLR-2 e TLR4 (Bellocchio et al., 2005). Em relação à IL-12, camundongos apenas infectados tendem apresentar maiores concentrações da citocina do que os indivíduos submetidos ao tratamento com L-AmB; no entanto, esta molécula não é detectada em muitos dos pontos analisados. Camundongos resistentes e suscetíveis ao *P. brasiliensis* produzem IL-12 em níveis similares, porém baixos, até a quarta semana de infecção (Pina et al., 2006). Além disso, camundongos IL-12p40 *knock-out* não são capazes de controlar a proliferação e a disseminação do *P. brasiliensis* em um modelo de infecção hematógena (Livonesi, 2008). A administração da IL-12 recombinante a indivíduos suscetíveis, porém, diminui a disseminação da doença, conferindo à molécula um papel protetor no combate ao fungo (Arruda et al., 2002). Uma vez que esta citocina é encontrada com maior frequência

em animais não tratados, podemos supor que a terapia com L-AmB seja eficaz a ponto de dispensar sua síntese, diminuindo a ativação do sistema imune devido à redução da carga fúngica proporcionada pela droga.

Em animais submetidos ao tratamento com ambas as formulações da droga, observa-se diminuição dos títulos de IgG total anti-*P. brasiliensis* aos 15 dias de infecção. Porém, tal redução apenas é significativa em camundongos tratados com c-AmB. Na PCM murina, o estabelecimento da imunidade humoral se dá entre o 15º e o 30º dia de infecção (Singer-Vermes et al., 1993). O aumento menos expressivo dos níveis de IgG observado nos camundongos submetidos à terapia pode refletir o controle da multiplicação fúngica por ação do tratamento.

As baixas concentrações de IgM observadas em camundongos B10.A infectados e submetidos ou não à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia aos 30 dias são condizentes com o tempo decorrido desde a infecção, já que este isótipo é mais associado a fases agudas da doença. No modelo murino da PCM, a produção de IgM não difere entre as linhagens resistente e suscetível (Kashino et al., 2000); similarmente, os títulos deste isótipo não são afetados pela administração da droga. As concentrações de IgG1 também são similares entre animais tratados ou não; sabe-se que, no modelo supracitado, aos 30 dias de infecção, os níveis deste isótipo não são influenciados pelo patrimônio genético dos indivíduos (Kashino et al., 2000). A administração de L-AmB não modifica as concentrações séricas de IgG2a, isótipo predominantemente encontrado em perfis de ativação Th1 e cuja mudança de classe é mediada por IFN- $\gamma$ . Porém, as concentrações de IgG2b, classe sintetizada de forma majoritária em *milieus* Th2 e cuja produção é mediada por TGF- $\beta$  e IL-4, são significativamente mais altas em animais não tratados. Sabe-se que o TGF- $\beta$  é produzido, aos 30 dias de infecção, em maiores concentrações por células peritoneais de camundongos suscetíveis (Moraes, 1998). Como já discutido, na PCM murina, embora não haja polarização completa de respostas Th, a predominância de citocinas Th1 está ligada à resistência ao fungo, enquanto a de Th2 é associada à suscetibilidade à infecção

(Kashino et al., 2000). Portanto, as menores concentrações de IgG2b observadas quando da administração de L-AmB corroboram observações anteriores aqui colocadas, indicando a possibilidade de reversão do padrão imunológico para um perfil de resistência por ação da terapia antifúngica. Os níveis séricos de IgG3 são baixos e não influenciados pela administração da droga. Novamente, estes dados encontram-se em concordância com o relatado por Kashino et al. (2000), que não observam diferenças significativas na concentração do isótipo entre animais resistentes e suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis*. Por fim, as concentrações de IgA são significativamente menores em camundongos tratados do que naqueles apenas infectados. Sabe-se que a mudança de classe para este isótipo é mediada por IL-5 e TGF- $\beta$ , citocinas de perfil Th2, e que a IgA é produzida em maiores níveis por indivíduos suscetíveis à PCM murina. Logo, assim como discutido em relação à menor produção de IgG2b em indivíduos submetidos à terapia, a diminuição sérica de IgA pode sinalizar a mudança do perfil de suscetibilidade para o de resistência ao fungo. Os dados obtidos sugerem que os menores níveis de anticorpos observados em indivíduos que recebem L-AmB podem refletir o controle da infecção fúngica proporcionado pela droga. Em pacientes paracoccidioidomicóticos, a redução destas mesmas concentrações é um dos mais importantes indicadores de sucesso terapêutico e bom prognóstico (Gianinni et al., 1990; Bueno et al., 1997; Camargo, 2008). Os elevados títulos de anticorpos IgM, IgG1, IgG3 e IgA anti-gp43 verificados nos soros normais, obtidos de indivíduos não infectados pelo *P. brasiliensis*, são surpreendentes. Podemos aventar a hipótese de que, dada a ubiquidade de fungos no meio ambiente, algum outro microorganismo, capaz de promover a ativação do sistema imunológico e a produção de imunoglobulinas, possua um epítipo de conformação similar à gp43, levando a uma reação cruzada e, conseqüentemente, um resultado falso-positivo. Há de se considerar, também, que ensaios de ELISA possuem, em geral, alta sensibilidade, assim, maior probabilidade de ocorrência de resultados falso-positivos. À época da caracterização da

gp43 como antígeno de potencial imunodiagnóstico, reações cruzadas entre anticorpos anti-*Histoplasma capsulatum* ou *Loboia lobo* foram detectadas quando o soro de pacientes acometidos por tais enfermidades foi testado em ensaios de ELISA anti-gp43, sendo estas reações atribuídas a epítomos contendo resíduos galactosil (Puccia e Travassos, 1991).

Nos experimentos empregando c-AmB ou L-AmB, não são observadas alterações *ante-mortem* dignas de nota. Às análises anátomo-patológicas verifica-se que, independentemente da formulação de anfotericina B administrada, as lesões apresentadas por camundongos submetidos à terapia são de gravidade menor do que as observadas nos animais apenas infectados. Porém, verificou-se a presença de lesões inflamatórias intensas, em sítios compatíveis à área de inoculação da droga, nos indivíduos submetidos ao tratamento com c-AmB. A forma convencional da anfotericina B é, reconhecidamente, bastante tóxica. Na clínica médica, esta droga apenas é administrada em ambiente hospitalar, por via intravenosa, diluída em grandes volumes de solução salina e em gotejamento lento (Mendes et al., 1994). Dada a ocorrência deste grave efeito colateral, que impediu a realização de experimentos em tempos mais longos após a infecção e poderia interferir com os resultados obtidos, a forma convencional da droga deixou de ser utilizada e foi substituída pela formulação lipossomal, que apresenta toxicidade menor. Camundongos submetidos ao tratamento com L-AmB, não apresentam, em nenhum dos pontos analisados, lesões na área de inoculação da droga, o que comprova sua menor toxicidade.

Às análises histopatológicas, nota-se, novamente, que a administração da droga, seja em sua forma convencional ou lipossomal, diminui o número e a gravidade das lesões. Ambos os tratamentos também diminuem a quantidade de *P. brasiliensis* nos órgãos, bem como alteram a morfologia do patógeno. Às análises semiquantitativas, observa-se redução da carga fúngica, confirmando os resultados obtidos por meio da técnica de quantificação de fungos viáveis. No entanto, embora, em algumas ocasiões, não tenham sido observadas leveduras de

*P. brasiliensis* em cortes corados pela prata-metamina, fungos viáveis foram reisolados aos ensaios de UFC. Tal discrepância é decorrente de particularidades das metodologias empregadas: nos ensaios de quantificação de fungos viáveis, o órgão é recolhido e macerado inteiro, de forma que praticamente todos os fungos presentes no tecido podem ser recuperados. Já na coloração pela prata, apenas um pequeno fragmento de órgão é coletado e seccionado, o que reduz a possibilidade de encontrar o patógeno.

Logo, os resultados obtidos na primeira fase deste estudo mostram que a L-AmB é mais eficaz do que a c-AmB no modelo murino experimental da PCM, principalmente por provocar maior redução da carga fúngica. A diminuição no número de fungos viáveis parece ser a causa, e não a consequência, da reversão do padrão de suscetibilidade para o de resistência, muito embora esta não seja completa e verifique-se, principalmente, em parâmetros micológicos, não imunológicos. Fenômeno similar foi observado em camundongos suscetíveis à PCM submetidos ao tratamento com sulfametoxazol-trimetoprima, que apresentaram respostas em reações de HTT, carga fúngica e perfil histopatológico condizentes aos verificados em camundongos resistentes quando a terapia era instituída até o 15º dia de infecção (Scavone e Burger, 2004).

Para melhor esclarecer os mecanismos subjacentes à reversão do padrão de suscetibilidade, em uma segunda fase deste trabalho, neutrófilos e macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem B10.A foram co-cultivados com leveduras de *P. brasiliensis* na presença ou não de L-AmB. Os maiores níveis de morte do fungo são observados, principalmente, quando este é incubado com a droga, independentemente da presença ou não de fagócitos. Assim, parece não haver efeito sinérgico entre os fagócitos e a droga no combate ao patógeno, diferentemente do que é verificado em outros modelos experimentais, sejam estes de doenças bacterianas (como Labro, 2000) ou fúngicas (Mehta et al., 1997, Roilides et al., 1999, Roilides et al., 2002, Kurita et al., 2003, Meier et al.,

2003, Sau et al., 2003, Bellocchio et al., 2005, Simitsopoulou et al., 2008 e Dotis et al., 2008). Por outro lado, neutrófilos e macrófagos não incubados com L-AmB ainda são capazes de matar uma quantidade expressiva de *P. brasiliensis*; tal fato é ainda mais surpreendente quando consideramos que os co-cultivos foram realizados na proporção de 25 fagócitos/levedura, a menor testada durante a padronização destes ensaios, e que estas células não foram estimuladas com citocinas, como realizado por diversos pesquisadores (Kurita et al., 1999, Moscardi-Bacchi et al., 1994, Casadevall e Pirofski, 2001, Rodrigues et al., 2007, Moreira et al., 2008). Logo, o bom desempenho de neutrófilos e macrófagos de camundongos B10.A comprovam sua imunocompetência, apesar do seu perfil de suscetibilidade à PCM murina. Macrófagos alveolares de camundongos suscetíveis infectados pela via intratraqueal com leveduras de *P. brasiliensis* são fagócitos mais eficientes do que estas mesmas células, obtidas de camundongos resistentes (Pina et al., 2008). É interessante notar que, nos experimentos aqui relatados, a capacidade fungicida dos neutrófilos tende a diminuir com o passar do tempo, enquanto a dos macrófagos aumenta. Esta constatação está de acordo com as características fisiológicas destas populações celulares: os neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra microorganismos, na imunidade inata, como importantes fagócitos, enquanto os macrófagos ainda atuam na apresentação de antígenos e na imunidade adaptativa, como células efetoras após estimulação mediada por citocinas.

É também interessante notar que a correlação positiva encontrada entre os números de fungos viáveis isolados de órgãos e a presença de NO nos sobrenadantes obtidos a partir destes tecidos em animais infectados com Pb18 e submetidos à terapia com 5 mg L-AmB/kg/dia não é verificada nos co-cultivos, muito embora às 18 horas de incubação a produção mais alta do reativo apresentada por neutrófilos co-cultivados apenas com o fungo tenha acompanhado o menor índice de morte do patógeno observado nesta série de experimentos. Portanto, tais dados

podem sugerir que, nas condições experimentais aqui empregadas, os neutrófilos de camundongos suscetíveis não utilizam NO para matar o *P. brasiliensis*. Os macrófagos parecem ter sua capacidade fungicida ainda menos influenciada pela síntese de NO do que neutrófilos, uma vez que, embora a adição das duas doses de L-AmB aos co-cultivos com o fungo aumente a concentração do reativo, a mortalidade do *P. brasiliensis* não é alterada. Tal fenômeno é de interpretação especialmente difícil ao considerar-se a existência de diversos relatos acerca da associação entre a morte do fungo e a síntese deste metabólito, como os de (Nascimento et al., 2002), (Bernardino, 2005) e (Livonesi et al., 2009; prelo), já discutidos. De maneira similar ao observado em relação ao NO, a adição de L-AmB aos co-cultivos também não altera de forma significativa a síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em modelo de inoculação de *P. brasiliensis* em bolsa subcutânea, (Meloni-Bruneri et al., 1996) demonstraram que neutrófilos de camundongos resistentes apresentam maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e maior atividade fungicida do que células de suscetíveis. Portanto, o perfil de síntese deste reativo por neutrófilos parece ser influenciado pelo padrão genético do hospedeiro, e não por fatores ambientais, como a exposição a antifúngicos. Da mesma forma, a adição de PMA aos co-cultivos não altera de maneira expressiva a síntese deste metabólito, o que indica que estas células foram previamente ativadas. Fenômeno similar foi observado por Moraes (1998), que verificou que tais células são capazes de sintetizar TGF- $\beta$  na ausência de estímulo *in vitro*. A ausência de uma correlação positiva entre as concentrações de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os índices de morte do fungo é surpreendente, pois não é relatada por outros pesquisadores. Segundo Moreira et al. (2008), a maior eficiência fagocítica de macrófagos incubados com IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  está relacionada à alta produção destes reativos, não verificada em células não ativadas; o tratamento das culturas celulares com catalase ou N(G)-monometil-L-arginina, inibidores da síntese de, respectivamente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO, reverte o efeito fungicida das células ativadas, indicando a atuação destas vias na morte do *P. brasiliensis*. Sabe-se também que este patógeno possui um eficiente

mecanismo de defesa, que permite sua sobrevivência ao estresse mediado por  $H_2O_2$ . Assim como não são observadas alterações expressivas nos perfis de síntese de NO e  $H_2O_2$  nos co-cultivos, também não são encontradas diferenças significativas nas concentrações de citocinas nos sobrenadantes de cultura, muito embora se saiba que a simples adição de formulações lipossomais de anfotericina B altera a expressão de citocinas e quimiocinas por monócitos humanos (Simitsopoulou et al., 2005).

Na terceira fase deste trabalho, para determinar se o melhor desempenho da forma lipossomal da anfotericina B se deve à sua interação com TLR4, foram utilizados camundongos das linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas (respectivamente, deficientes ou não quanto à expressão deste receptor). Antes, porém, uma série inédita de experimentos foi realizada com o objetivo de caracterizar a infecção paracoccidiodomicótica na ausência ou não de TLR4.

Em seu fundamental estudo que estabelece o modelo murino isogênico da PCM, (Calich et al., 1985) analisaram a sobrevivência de diversas linhagens de camundongos após a inoculação de leveduras de *P. brasiliensis*. Animais das linhagens A/SN e B10.A foram considerados, respectivamente, resistentes e suscetíveis à infecção, enquanto as linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas apresentaram resistência e suscetibilidade intermediárias. De fato, o conjunto de dados obtidos em nossos experimentos permite afirmar que, embora diferenças sutis sejam encontradas ao longo do processo infeccioso, a doença progride de forma bastante semelhante na ausência ou presença de TLR4. Além disso, há também indicações de que as linhagens C3H/HeJ e C3H/HePas são mais resistentes do que B10.A. Ressalte-se que os animais foram analisados por 485 dias e, até onde temos conhecimento, a infecção paracoccidiodomicótica murina nunca havia sido estudada por um período tão longo. Desta forma, a interação entre o fungo e o receptor parece não desempenhar um papel fundamental na imunidade anti-*P. brasiliensis*. Fenômeno similar foi descrito por (González et al., 2008), que mostraram que a resposta ao *P. brasiliensis* independe de TLR4, TLR2, dectina 1 e

MyD88. O papel de receptores *Toll-like* em micoses sistêmicas, porém, é controverso (Calich et al., 2008). Embora (Netea et al., 2002) relatem que a não expressão de TLR4 aumenta a suscetibilidade à candidíase disseminada, por exemplo, os experimentos conduzidos por (Murciano et al., 2006) mostram o estabelecimento de respostas Th1, relacionadas ao perfil de resistência, em camundongos TLR4-deficientes infectados por *Candida*. Na criptococose, relata-se que as moléculas MyD88 e TLR2, mas não TLR4, são necessárias à indução da proteção (Yauch et al., 2004 e Biondo et al., 2005); uma publicação mais recente, porém, sugere que TLR2 e TLR4 não contribuem, ou atuam de forma apenas marginal, no desenvolvimento da resposta imunológica ao patógeno (Nakamura et al., 2006). Da mesma forma, embora os resultados aqui apresentados, bem como os obtidos por (González et al., 2007), indiquem a ausência de um papel relevante de TLR4 no estabelecimento da imunidade protetora anti-*P. brasiliensis*, (Loures, 2007) sugere, que o fungo utiliza o receptor para infectar macrófagos e, assim, garantir sua multiplicação.

Na fase final deste trabalho, após a caracterização da infecção paracoccidiodomicótica na ausência ou não de TLR4, foi estudada a suposta interação entre este receptor, a L-AmB e o *P. brasiliensis*. Nos primeiros experimentos, a dose ideal de L-AmB, de 5 mg/kg/dia (determinada em camundongos B10.A e utilizada nos ensaios referentes aos efeitos da terapia antifúngica em animais suscetíveis), diminuiu a carga fúngica de maneira expressiva e uniforme em ambas as linhagens, impossibilitando a observação da suposta interação da droga com o receptor (dados não mostrados). Por isso, os experimentos foram repetidos com metade desta dose ideal, equivalente a 2,5 mg L-AmB/kg/dia. Mais uma vez, a eficácia da droga no combate ao *P. brasiliensis* e na manutenção do bom estado geral dos indivíduos tratados é patente. A administração de L-AmB impede a significativa perda de peso verificada em camundongos C3H/HeJ não tratados aos 7 dias de infecção, diminui a carga fúngica de forma expressiva e reduz o número e a gravidade das lesões observadas às análises anátomo-

patológicas e histopatológicas. Porém, há poucas diferenças entre a progressão da infecção em animais das duas linhagens submetidas ao tratamento. Dentre elas, destaca-se o maior número de fungos viáveis encontrados em camundongos C3H/HeJ do que em C3H/HePas, que é acompanhado por maior número e gravidade das lesões anátomo-patológicas e histopatológicas, o que indicaria a existência de um papel imunomodulador da droga na presença de TLR4. No entanto, se tal papel existe, não altera de forma clara o padrão de resposta imunológica, ao menos segundo os parâmetros aqui analisados, uma vez que as concentrações de NO e das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12 e GM-CSF não são alteradas de forma expressiva pela interação da droga com o receptor.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- a)** Na PCM experimental, a administração de anfotericina B é capaz de reverter, ao menos em parte, o padrão de suscetibilidade para o de resistência. Tal reversão, porém, é principalmente observada em parâmetros micológicos, como o número de leveduras do fungo nos órgãos e a arquitetura das lesões anátomo-patológicas e histopatológicas. As eventuais alterações em parâmetros imunológicos parecem ser mediadas pela diminuição da carga fúngica e consequente modulação das respostas imunológicas. A forma lipossomal da anfotericina B apresenta desempenho superior ao da droga convencional.
- b)** Embora a inclusão de L-AmB em culturas de neutrófilos e macrófagos peritoneais aumente os índices de morte do fungo, através de um mecanismo desconhecido, não há alterações significativas nos demais parâmetros analisados que permitam afirmar que a droga, nestas circunstâncias, exerça efeitos imunomoduladores.
- c)** O curso da infecção paracoccidioidomicótica não é significativamente alterado pela ausência ou presença de TLR4.
- d)** A maior eficácia da L-AmB não parece estar relacionada à sua interação com TLR4.

## REFERÊNCIAS

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.

Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FRF, Fazioli RA, Vaz CAC, Calich VLG. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol*. 2002;103(2):185-95.

Arruda C, Valente-Ferreira RC, Pina A, Kashino SS, Fazioli RA, Vaz CAC, Franco MF, Keller AC, Calich VLG. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on host genetic pattern. *Infect Immun*. 2004;72(2):3932-40.

Bellocchio S, Gaziano R, Bozza S, Rossi G, Montagnoli C, Perruccio K et al.. Liposomal amphotericin B activates resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signaling from TLR-2 to TLR4. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(2):214-22.

Bernardino S. Paracoccidioidomicose pulmonar em camundongos geneticamente deficientes da enzima óxido nítrico sintase-induzida (iNOS). [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2005.

Beyart R, Fiers W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: Mire-Sluis A, Thorpe R (eds). *Cytokines*. San Diego: Academic Press; 1998. p. 336-59.

Biondo C, Midiri A, Messina L, Tomasello F, Garuffi G, Catania MR, Bombaci M, Beninati C, Teti G, Mancuso G. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol*. 2005;35(3):870-78.

Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, Figueiredo F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune responses. *J Immunol*. 1998;161:3056-63.

Boggs JM, Chang NH, Goundalkar A. Liposomal amphotericin B inhibits in vitro T-lymphocyte response to antigen. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(5):879-85.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. c2003 - [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. 2006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>; <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>.

Brummer E, Castañeda E, Restrepo. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(2):89-117.

Bruneri LM. Produção e mobilização de células sanguíneas, estado de ativação e capacidade fungicida de neutrófilos em paracoccidioidomicose murina experimental [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1995.

Bueno JP, Mendes-Giannini MJ, Del Negro GM, Assis CM, Takiguti CK, Shikanai-Yasuda MA. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *J Med Vet Mycol.* 1997;35(3):213-7.

Cacere CR, Mendes-Giannini MJ, Fontes CJ, Kono A, Duarte AJ, Benard G. Altered expression of the costimulatory molecules CD80, CD86, CD152, PD-1 and ICOS on T-cells from paracoccidioidomycosis patients: lack of correlation with T-cell hyporesponsiveness. *Clin Immunol.* 2008;129(2):341-49.

Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, Dias da Silva WD. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. *Clin Immunol Immunopathol.* 1979;12(1):21-30.

Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Exp Pathol.* 1985;66(5):585-94.

Calich VLG, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures F. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;53(1):1-7.

Camargo ZP, Gesztesí JL, Saraiva EC, Taborda CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2377-81.

Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):289-302.

Campbell IL, Samimi A, Chiang CS. Expression of the inducible nitric oxide synthase. Correlation with neuropathology and clinical features in mice with lymphocytic choriomeningitis. *J Immunol.* 1994;153(8):3622-3629.

Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Burger E, Calich VLG. Protective role of gamma interferon in

experimental murine paracoccidiodomycosis. *Infect Immun.* 1998;66(2):800-6.

Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Russo M, Calich VLG. Pulmonary paracoccidiodomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, brochoalveolar cells activation, cellular immune response, and specific isotypes patterns. *Infect Immun.* 1995;63(5):1777-83.

Casadevall A, Pirofski L. Adjunctive immune therapy for fungal infections. *Clin Infect Dis.* 2001;33(7):1048-56.

Chiarella AP, Arruda C, Pina A, Costa TA, Ferreira RC, Calich VL. The relative importance of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells in immunity to pulmonary paracoccidiodomycosis. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1078-88.

Chizzonite R, Gubler U, Magram J, Stern AS. Interleukin-12. In: Mire-Sluis A, Thorpe R (eds). *Cytokines.* San Diego: Academic Press; 1998. p 183-203.

Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Cytokines and their cellular receptors. In: *CURRENT Protocols in Immunology.* New York: Greene, Wiley-Interscience, 1991.

Dantas AS, Andrade RV, de Carvalho MJ, Felipe MS, Campos EG. Oxidative stress response in *Paracoccidiodes brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. *Mycol Res.* 2008;112(Pt 6):747-56.

De Mayer E, De Mayer-Guignard J. Interferon-gamma. In: Mire-Sluis A, Thorpe R (eds). *Cytokines.* San Diego: Academic Press; 1998. p. 392-400

Devereux S, Linch DC. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. In: Mire-Sluis A, Thorpe R (eds). *Cytokines.* San Diego: Academic Press; 1998. p. 261-275

Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S. Macrophage deactivation factor and transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol.* 1990;145(3):940-4.

Dotis J, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Konstantinou T, Panteliadis C, Walsh TJ, Roilides E. Amphotericin B formulations variably enhance antifungal activity of neutrophils and monocytes against *Fusarium solani*: comparison with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(4):810-7.

Fantoni DT, Cortopassi SRG. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: De Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse

JLB, Neves SP, editors. Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: Winner-Graph; 1996. p. 157-65.

Fava Netto C, Vegas VS, Sciannaméa IM, Guarnieri EDB. Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *P. brasiliensis* para o preparo do antígeno. Rev Inst Med Trop. 1969;11:117-81.

Fava Netto C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. Arq Cir Clin Exp S Paulo. 1955;18:197-254.

Fazioli RA, Singer-Vermes LM, Kashino SS, Burger E, Franco MF, Moscardi-Bacchi M, Calich VLG. Delayed-type hypersensitivity response in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. Mycopathol. 1994;126(3):137-46.

Franco M, Montenegro MR. Paracoccidioidomicose. In: Brasileiro Filho G. Patologia, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 1239-50.

Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM, Masuda A, Amato Neto V, Ferreira AW. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. Am J Trop Med Hyg. 1990;43(2):200-6.

González A, Sahaza JH, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Med Mycol. 2003;41(5):391-9.

González A, Yáñez A, Gozalbo D, Gil ML. MyD88 is dispensable for resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in a murine model of blood-borne disseminated infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;54(3):365-74.

Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. Am J Clin Pathol. 1955;25(8):975-9.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Toll-like receptor (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol. 1999;162(7):3749-52.

Johnson PC, Wheat LJ, Cloud GA, Goldman M, Lancaster D, Bamberger DM, Powderly WG, Hafner R, Kauffman CA, Dismukes WE. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B compared with conventional amphotericin B for induction therapy of histoplasmosis in patients with AIDS. Ann Intern Med. 2002;137(2):105-9.

Jouault T, Iбата-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. *J Infect Dis.* 2003;188(1):165-72.

Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favatti CZ, Meloni-Bruneri LH, Vaz CAC, Burger E et al.. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- $\gamma$  production. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(1):89-97.

Kretschmar M, Geginat G, Bertsch T, Walter S, Hof H, Nichterlein T. Influence of liposomal amphotericin B on CD8 T-cell function. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2383-5.

Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyagi M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 1999;37(4):261-7.

Kurita N, Brummer E, Oarada M, Myiaji M. Synergistic antifungal effect of fluconazole and human polymorphonuclear leukocytes on *Paracoccidioides brasiliensis*: effect of interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Med Mycol.* 2003;41(2):131-6.

Labro MT. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin Microbiol Revs.* 2000;13(4):615-50.

Livonesi MC, Souto JT, Campanelli AP, Maffei CML, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. *Med Mycol.* 2008;46(7):637-46.

Livonesi MC, Rossi MA, Souto JT, Campanelli AP, Sousa RLM, Maffei CML, Ferreira BR, Martinez R, Silva JS. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection.* In press.

Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, Gesztesí JL, De-Souza W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27(9):2309-13.

Louie A, Baltch AL, Franke MA, Smith RP, Gordon MA. Comparative capacity of four antifungal agents to stimulate murine macrophages to produce tumour necrosis factor alpha: an effect that is attenuated by pentoxifylline, liposomal vesicles, and dexamethasone. *J Antimicrob Chemother.* 1994;34(6):975-87.

Loures FV. Caracterização da função dos lipídeos do *Paracoccidioides brasiliensis* e do receptor TLR-4 na interação fungo-hospedeiro. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Mambula SS, Sau K, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. J Biol Chem. 2002;277(42):39320-6.

Marr KA, Arunmozhi-Balajee S, Hawn TR, Ozinsky A, Pham U, Akira S, Aderem A, Conrad-Liles W. Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. Infect Immun. 2003;71(9):5280-6.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2001;1(1):135-45.

Mehta RT, Mehta K, Lopez-Berestein G, Juliano RL. Effect of liposomal amphotericin B on murine macrophages and lymphocytes. Infect Immun. 1985;47(2):429-33.

Mehta RT, Poddar S, Kalidas M, Gomez-Flores R, Dulski K. Role of macrophages in the candidacidal activity of liposomal amphotericin B. J Infect Dis. 1997;175(1):214-7.

Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. Cell Microbiol. 2003;5(8):561-70.

Meloni-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DSP, Calich VLG, Lenzi HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. J Leukoc Biol. 1996;59(4):526-33.

Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 373-91.

Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233-58.

Moraes SMD. Produção de TGF- $\beta$  no modelo murino da paracoccidioidomicose experimental. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1998.

Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peraçoli MT, Calvi SA, Victoriano de Campos Soares AM. Killing of *Paracoccidoides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO effector mechanisms. *Mycopathologia*. 2008;166(1):17-23.

Moscardi-Bacchi M, Brummer E, Stevens DA. Support of *Paracoccidoides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol*. 1994;40(3):159-64.

Murciano C, Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Gil ML. Toll-like receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* in a model of hematogenously disseminated infection. *Med Mycol*. 2006;44(2):149-157.

Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Akamine M, Fujita J, Kawamura I, Mitsuyama M, Adachi Y, Ohno N, Takeda K, Akira S, Miyazato A, Kaku M, Kawakami K. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47(1):148-54.

Nascimento FRF, Calich VLG, Rodriguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated for susceptibility. *J Immunol*. 2002;168(9):4593-60.

Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 2002;165(10):1483-9.

Netea MG, Warris A, Van Der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, Andresen T, Verweij PE, Kullberg BJ. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of Toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis*. 2003;188(2):320-6.

Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. 1981;46(2):211-26.

Pina A, Saldiva PHN, Restrepo LEC, Calich VLG. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol*. 2006;79(6):1202-13.

Pina A, Bernardino S, Calich VL. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J Leukoc Biol.* 2008;83(5):1088-99.

Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.* 1991;29(8):1610-5.

Putchler H, Waldrop Fs, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. Methacarn (methanol-Carny) fixation. Practical and theoretical considerations. *Histochemie.* 1970;21(2):97-116.

Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol.* 2007;45:27-33.

Roilides E, Lyman CA, Filioti J, Akpogheeta O, Sein T, Lammaignere CG et al. Amphotericin B formulations exert additive antifungal activity in combination with pulmonary alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1974-6.

Roilides E, Tsaparidou S, Kadiltoglou I, Sein T, Walsh TJ. Interleukin-12 enhances antifungal activity of human mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*: implications for a gamma interferon-independent pathway. *Infect Immun.* 1999;67(6):3047-50.

Roilides E, Walsh T. Recombinant cytokines in augmentation of immunomodulation of host defenses against *Candida* spp. *Med Mycol.* 2004;42(1):1-13.

Romani L, Puccetti P. Controlling pathogenic inflammation to fungi. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5(6):1007-17.

Russo M, Teixeira HC, Marcondes MCG, Barbuto JAM. Superoxide independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Braz J Med Biol Res.* 1989;22(10):1271-3.

Sau K, Mambula SS, Latz E, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM. The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37561-8.

Scavone R, Burger E. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity energy in susceptible inbred

mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Med Microbiol Immunol*. 2004;193(1):53-9.

Schindler JJ, Warren RP, Allen SD, Jackson MK. Immunological effects of amphotericin B and liposomal amphotericin B on splenocytes from immune-normal and immune-compromised mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(12):2716-21.

Simitsopoulou M, Roilides E, Dotis J, Dalakiouridou M, Dudkova F, Andreadou E et al.. Differential expression of cytokines and chemokines in human monocytes induced by lipid formulations of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1397-1403.

Simitsopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Gil-Lamaignere C, Walsh TJ. Interaction of amphotericin B lipid formulations and triazoles with human polymorphonuclear leukocytes for antifungal activity against *Zygomycetes*. *Mycoses*. 2008;51(2):147-54.

Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Moscardi-Bacchi M, Mendes-Giannini MJS, Calich VL. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol*. 1989;27(2):71-82.

Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich VLG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol*. 1993;94(1):73-9.

Singer-Vermes LM, Ciavaglia MC, Kashino SS, Burger E, Calich VLG. The source of the growth promoting factor affects the plating efficiency of *P. brasiliensis*. *J Med Vet Mycol*. 1992;30(3):261-4.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol*. 2003;21:335-76.

Takeda K e Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1-14.

Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peraçoli MT, Soares AM. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine*. 41(1):48-53.

Teixeira HC. Ativação de macrófagos peritoneais e de linfócitos B esplênicos em camundongos resistentes e suscetíveis durante a infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. [tese]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1991.

Viviani MA, De Marie S, Graybill JR, Yamaguchi E, Anaissie E, Caillot D. New approaches to antifungal chemotherapy. *Med Mycol.* 1998;36 Suppl 1:194-206.

Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, Perfect JR, Horwith G, Lee L, Silber JL, Dinubile MJ, Reboli A, Bow E, Lister J, Anaissie EJ. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis.* 1998;26(6):1383-98.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 109-20.

Yauch LE, Mansour MK, Shoham S, Rottman JB, Levitz SM. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4 and MyD88 in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun.* 2004;72(9):5373-82.

Zar JH. *Biostatistical analysis*. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall; 1984. 718p.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1522-6.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)