

PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO

II — Infecção intraperitoneal após sensibilização prévia

Maura MOSCARDI (1) e Marcelo Fabiano de FRANCO (2)

RESUMO

Inoculamos, por via intraperitoneal, 20 camundongos machos, com 10×10^6 formas cerebriformes do *P. brasiliensis* (cepa 18). Dez destes animais foram previamente sensibilizados contra antígeno particulado do fungo, através de injeções intradérmicas, durante 4 semanas. Como controle, 10 camundongos foram apenas sensibilizados e 10 não foram sensibilizados ou infectados. Os animais foram sacrificados 1 e 3 semanas após a sensibilização e/ou infecção. Estudaram-se: 1) Resposta de hipersensibilidade retardada, medida pelo teste do coxim plantar, realizado 24 h antes do sacrifício; 2) Anticorpogênese específica, medida pelo teste de imunodifusão dupla em gel de ágar; 3) Histopatologia do peritônio parietal e visceral. **Observamos:** 1) A sensibilização específica produziu boa resposta de hipersensibilidade retardada e de anticorpogênese contra antígeno solúvel do *P. brasiliensis*; 2) A infecção em animais previamente sensibilizados atuou como dose "booster", com aumento dos índices de resposta imune celular e humoral; 3) O curso, a intensidade e a natureza da peritonite paracoccidióidica foram semelhantes nos animais infectados com ou sem sensibilização prévia; 4) Apesar dos índices elevados de resposta de hipersensibilidade retardada nos animais infectados após sensibilização prévia, a inflamação peritoneal foi inespecífica, sem formação de granuloma epitelióide. Os resultados sugerem novos estudos sobre a relação entre resistência e hipersensibilidade retardada no curso da doença e na formação do granuloma paracoccidióidico.

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior⁹, estudamos a histopatologia e a resposta imunológica humoral e celular da infecção produzida em camundongos pela inoculação intraperitoneal de suspensão da forma cerebriforme de *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). A infecção se caracterizou por peritonite inespecífica, neutrofílica-macrofágica em torno dos fungos inoculados, com progressiva resolução do processo a partir da 4.^a semana e cura após 2 meses da inoculação. Resposta de hipersensibilidade retardada foi detectada desde a 1.^a semana de infecção e persistiu

até o final do experimento (16.^a semana); o aparecimento de anticorpos séricos específicos foi mais tardio (2.^a semana), com pico na 4.^a e decréscimo na (16.^a semana). Em seguida, para melhor estudar o papel da resposta imunológica humoral e celular no desenvolvimento e controle da infecção, realizamos o presente trabalho onde se estudou a histopatologia e a resposta imunológica da paracoccidioidomicose intraperitoneal em camundongo após sensibilização prévia ao *P. brasiliensis*.

- (1) Residente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (Bolsista, Iniciação Científica — FAPESP)
(2) Professor Livre-Docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu — 18600 — São Paulo, Brasil

MATERIAL E MÉTODO

Delineamento experimental

Para o estudo comparativo histo-imunológico da infecção com e sem sensibilização prévia, um grupo de camundongos foi sensibilizado com antígeno de *P. brasiliensis* e posteriormente inoculado intraperitonealmente com suspensão de *P. brasiliensis*. Paralelamente, um grupo de animais foi infectado sem sensibilização prévia. Quando do sacrifício dos animais, a resposta de hipersensibilidade celular foi avaliada pelo teste do coxim plantar e a anticorpo-gênese específica foi quantificada pela técnica de imunodifusão dupla em gel de ágar. O estudo histopatológico foi realizado em fragmentos do peritônio parietal e visceral.

Grupos experimentais

Foram utilizados 40 camundongos machos de 4 semanas de idade, provenientes do Biotério Geral do Campus de Botucatu, distribuídos em 4 grupos experimentais: a) Dez animais infectados sem sensibilização prévia; b) Dez animais infectados após sensibilização prévia; c) Dez animais apenas sensibilizados; d) Dez animais controle, sem sensibilização ou infecção. Cinco camundongos de cada grupo foram sacrificados 1 e 3 semanas após a sensibilização e/ou infecção.

Sensibilização

Foi realizada segundo a técnica descrita por RIFKIND & col.¹². Brevemente, o antígeno foi preparado a partir de cultura cerebriforme da cepa 18 do *P. brasiliensis*, proveniente da micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da U.S.P., cultivada em meio de FAVA NETTO⁶. Após 7 dias de cultura, os fungos foram suspensos e inativados em solução salina estéril (0,85%), contendo mertiolato na concentração de 1/1000. A seguir, os fungos foram lavados três vezes por centrifugação, em solução salina estéril, ressuspensos em volume 10 vezes maior do que aquele do sedimento inicial e “quebrados” por cerca de 10 congelamentos e descongelamentos rápidos e sucessivos. Após a suspensão foi centrifugada a 700 g por 20 min. e metade do sobrenadante foi desprezado; o sedimento ressuspeso no volume restante se constituiu no antígeno particulado utilizado na sensibilização.

Os camundongos sensibilizados receberam injeção semanal intradérmica de 0,025 ml do antígeno particulado, na região lombar, durante 4 semanas consecutivas. O grupo experimental com infecção após sensibilização foi inoculado 1 semana após a última dose sensibilizante.

Inóculo

Utilizou-se a cepa 18 do *P. brasiliensis* cultivada como descrita acima. Os animais foram infectados com injeção intraperitoneal de 0,5 ml da suspensão de fungos em solução salina estéril, com turvação correspondente à do tubo 10 da escala de MacFarland (aproximadamente 20×10^6 fungos/ml). Os animais controle e apenas sensibilizados foram injetados intraperitonealmente com volume igual de solução salina estéril.

Avaliação da resposta imunológica

1) **Hipersensibilidade celular** — A resposta de hipersensibilidade celular específica contra *P. brasiliensis* foi avaliada “in vivo” 24 h antes do sacrifício de cada animal, pelo teste do coxim plantar, como já descrito⁹. Os volumes das patas injetadas foram medidos por pletismografia¹⁴ e os índices de resposta foram expressos como a diferença de volume entre a pata teste e a pata controle.

2) **Imunidade humoral** — A resposta sorológica contra *P. brasiliensis* foi quantificada por reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, como anteriormente padronizada⁹.

Estudo histopatológico

Os animais sacrificados foram autopsiados, com registro dos achados macroscópicos da cavidade peritoneal. Fragmentos com lesões do peritônio parietal e visceral foram fixados em solução de formalina a 10%, incluídos em parafina, cortados em 4μ e corados pelos métodos de Hematoxilina e Eosina (HE) e prata metenamina Gomori, pelas técnicas habituais.

RESULTADOS

Hipersensibilidade celular

A Tabela I demonstra os resultados do teste do coxim plantar realizado nos animais infectados, sensibilizados, sensibilizados e infectados, e controle, após 1 e 3 semanas da sensibi-

lização e/ou infecção. Foi realizada análise de variância dos dados, sendo o teste F significativo a 1% de probabilidade. Foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação dos contrastes de médias.

Os camundongos com 1 e 3 semanas de infecção não apresentaram respostas positivas no teste do coxim plantar. Os animais sensibilizados mostraram intensas respostas de hipersensibilidade retardada na 1.^a semana após sensibilização; a resposta persistiu, em menor intensidade, na 3.^a semana. Os animais infectados

após sensibilização prévia apresentaram intensa resposta de hipersensibilidade retardada com 1 e 3 semanas de infecção.

Imunidade humoral

A Tabela II demonstra os títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* detectados nos soros dos camundongos infectados, sensibilizados, e infectados, e controle, pela técnica de imunodifusão dupla em gel de ágar.

TABELA I
Resultados (diferença de volume entre a pata teste e a pata controle) do teste do coxim plantar

Sacrifício (semanas)	Tratamento	Diferença de volume (pata teste-pata controle)					Média (**)
1. ^a semana	Infecção	-0.2	0.2	0.3	0.6	0.9	0.36a
	Sensibilização	0.8	2.1	2.4	2.5	2.5	2.06b
	Sensibilização + Infecção	1.6	1.7	2.0	2.0	2.0	1.86b
	Controle	-0.2	-0.1	0.3	0.4	0.4	0.16a
3. ^a semana	Infecção	0.0	0.3	0.7	0.8	1.2	0.60a
	Sensibilização	0.9	1.2	1.4	1.5	1.8	1.36b
	Sensibilização + Infecção	1.5	1.5	1.6	2.4	2.6	1.92b
	Controle	0.2	0.3	0.4	0.4	NR(*)	0.32a

(*) Não realizado

(**) Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA II
Resultados da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar

Sacrifício (semanas)	Tratamento	Títulos (*)					Mediana
1. ^a semana	Infecção	—	—	—	—	—	—
	Sensibilização	2	2	8	32	32	8
	Sensibilização + Infecção	64	64	128	256	256	128
	Controle	—	—	—	—	—	—
3. ^a semana	Infecção	4	4	16	32	32	16
	Sensibilização	—	—	—	4	8	—
	Sensibilização + Infecção	64	64	64	64	128	64
	Controle	—	—	—	—	—	—

(*) Os títulos representam a recíproca da diluição máxima do soro com linha de precipitação

Os camundongos do grupo controle e os sacrificados 1 semana após a inoculação não apresentaram anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*. Após 3 semanas, os títulos dos animais infectados foram moderadamente elevados. A sensibilização induziu discreta à moderada an-

ticorpo-gênese que decresceu após 3 semanas. Os camundongos infectados após sensibilização apresentaram títulos elevados e persistente de anticorpos anti-*P. brasiliensis* até a 3.^a semana de infecção.

Estudo histopatológico

A peritonite nos animais infectados sem sensibilização prévia foi semelhante à descrita no trabalho anterior⁹. O processo peritoneal envolveu os fungos inoculados, formando múltiplos pequenos nódulos nos folhetos parietal e visceral. A reação histopatológica foi predominantemente macrofágica, rica em neutrófilos, com número variável de linfócitos e plasmócitos (Figs. 1 e 2).

Houve grande semelhança entre esta resposta inflamatória e aquela observada nos camundongos infectados após sensibilização prévia. Neste grupo, a inflamação foi também neutrofilica-macrofágica, ao redor dos fungos inoculados, sem se observar a presença de reação granulomatosa tuberculóide (Figs. 3 e 4).

DISCUSSÃO

Neste estudo comparativo da resposta imunológica e da histopatologia da paracoccidioido-

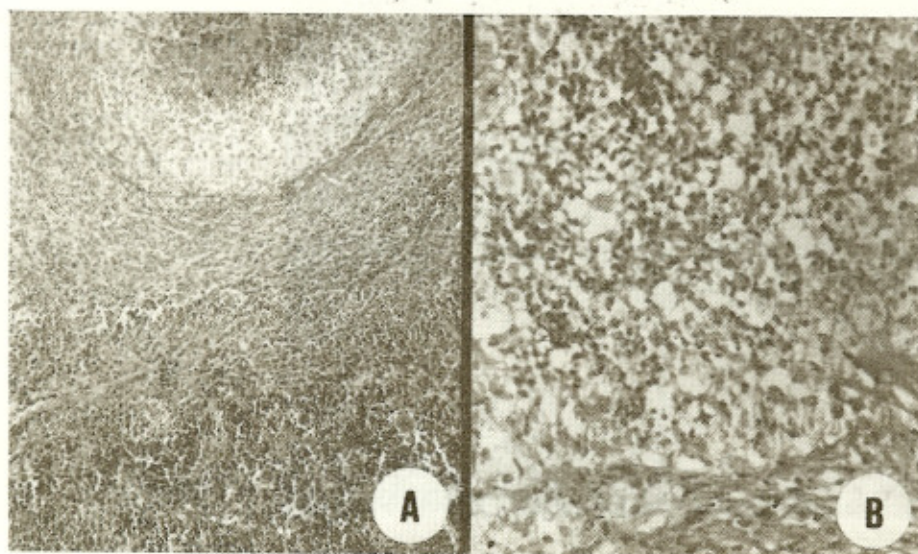


Fig. 1 — Infecção — 1.^a semana. A) Peritônio parietal do baço: inflamação inespecífica neutrofilica — macrofágica em torno dos fungos inoculados (*) (HE, 78 X). B) Detalhe da transição entre a inflamação inespecífica e o inóculo (HE, 200 X)

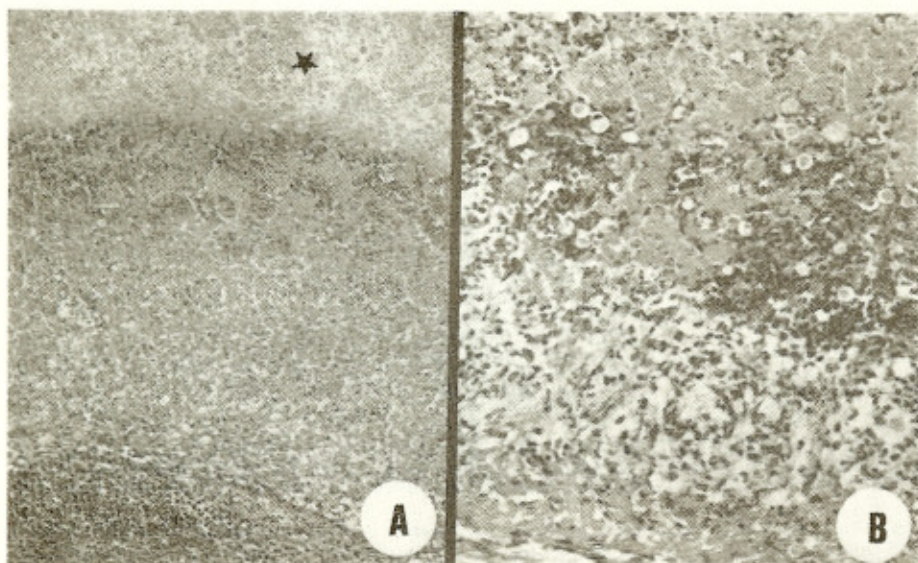


Fig. 2 — Infecção — 3.^a semana. A) Peritônio parietal do fígado: tecido de granulação inespecífica envolvendo os fungos inoculados (*) (HE, 78 X). B) Detalhe da reação neutrofilica-macrofágica em torno dos fungos (HE, 200 X)

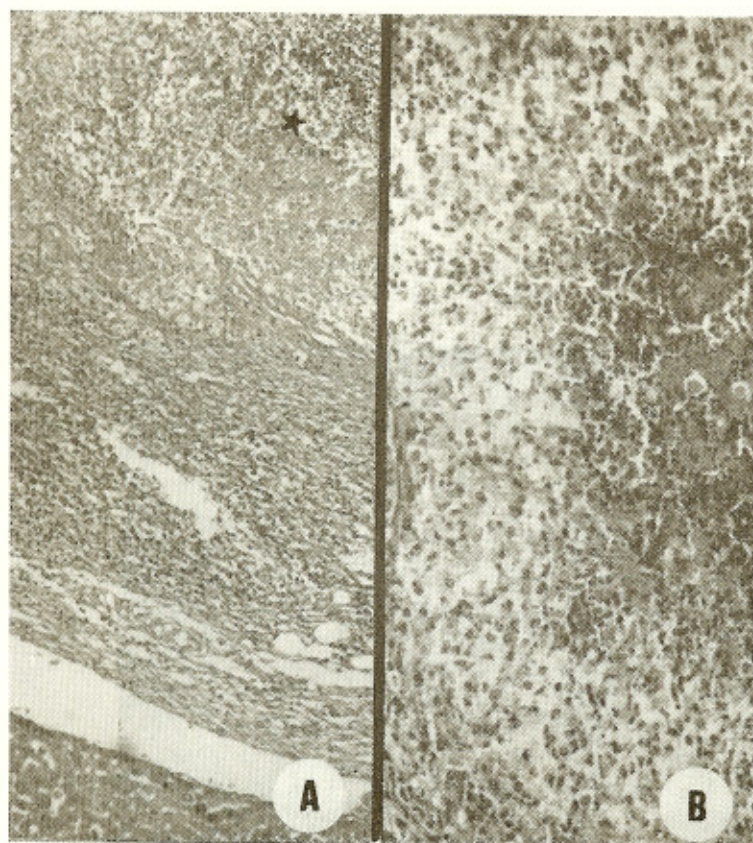


Fig. 3 — Infecção após sensibilização prévia — 1.^a semana. A) Peritônio parietal do fígado: inflamação inespecífica em torno do inóculo (*) (HE, 78 \times). B) Detalhe da reação neutrofílica — macrófágica em torno dos fungos (HE, 200 \times)

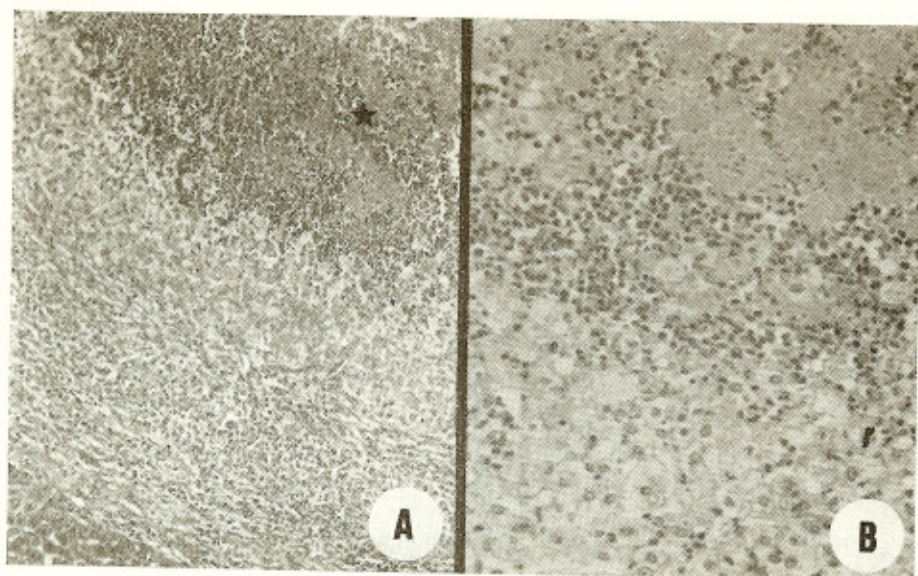


Fig. 4 — Infecção após sensibilização prévia — 3.^a semana. A) Peritônio parietal do baço: peritonite inespecífica semelhante à vista na Fig. 2 (HE, 78 \times). B) Detalhe da inflamação não-granulomatosa em torno do inóculo (HE, 200 \times)

micose intraperitoneal em camundongos com e sem sensibilização prévia, alguns aspectos merecem ser ressaltados.

1) O curso da infecção intraperitoneal pelo *P. brasiliensis* em animais sem sensibilização prévia foi semelhante ao do experimento anterior⁹. A inflamação foi inespecífica, encapsulante dos fungos inoculados. A anticorpo-gênese foi moderada e detectada apenas na 3.^a semana. Ao contrário do previamente reportado⁹, os camundongos não apresentaram respostas de hipersensibilidade retardada na 1.^a e 3.^a semanas de infecção. Esta discrepância de resultados talvez tenha sido devida à diferença na partida do antígeno solúvel utilizado nos testes, já que todas as outras variantes experimentais foram mantidas constantes.

2) A sensibilização dos camundongos foi realizada por injeção intradérmica de formas mortas de *P. brasiliensis*, segundo esquema padronizado para a indução de hipersensibilidade retardada contra antígeno micótico (*Coccidioides immitis* e *Candida albicans*)¹². O presente trabalho demonstrou a eficácia do método para o *P. brasiliensis*. Após 1 semana da última dose sensibilizante, os animais apresentaram moderada anticorpo-gênese e intensa resposta de hipersensibilidade retardada; após 3 semanas, os títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* se negataram e houve persistência da resposta de imunidade celular.

3) A resposta imune-celular (3.^a semana) e a humoral (1.^a e 3.^a semanas) nos camundongos infectados após sensibilização foram mais intensas do que às dos animais apenas infectados ou sensibilizados. Este dado demonstrou que a infecção atuou como dose sensibilizante de reforço (dose "booster") para os camundongos previamente sensibilizados. Mais ainda, indicou que, neste modelo experimental de paracoccidiodomicose, a infecção não se acompanha de diminuição da capacidade de resposta imuno-específica, como tem sido observado na infecção humana¹⁰, ou mesmo em outros modelos experimentais^{10,11}.

4) O curso, a intensidade e a natureza da peritonite paracoccidiodomicótica induzida nos animais sensibilizados, com moderada resposta humoral e intensa resposta de imunidade celular anti-*P. brasiliensis*, foram semelhantes aos dos animais infectados sem sensibilização pré-

via. Este fato levanta interessante discussão sobre a correlação entre resposta de hipersensibilidade retardada e imunidade ou resistência. Como em outras infecções e modelos experimentais^{7,8,13,15}, na presente infecção intraperitoneal induzida após sensibilização, pareceu ocorrer dissociação entre os dois fenômenos; o esquema de sensibilização determinou elevados índices do teste do coxim plantar, indicativos de resposta de hipersensibilidade retardada², sem, porém, ter conferido aos animais nenhum grau de proteção frente ao desafio representado pela injeção intraperitoneal de suspensão de *P. brasiliensis*.

Hipersensibilidade retardada e resistência são fenômenos que, apesar de poderem ocorrer paralelamente^{7,15}, parecem refletir mecanismos imunológicos inteiramente distintos. O desenvolvimento destes dois fenômenos depende de ampla e variada gama de fatores, como a via de administração, natureza química e quantitativa do antígeno injetado, bem como a capacidade de resposta do hospedeiro⁴.

A complexidade da dissociação entre hipersensibilidade retardada-resistência foi recentemente ressaltada no modelo fibrossarcoma induzido pelo metilcolantreno, em camundongos BALB/c⁸; neste experimento, demonstrou-se que a resistência ao crescimento do tumor pode ser transferida apenas por células (fenômeno linfócito T — dependente), enquanto que a capacidade de resposta de hipersensibilidade celular, medida pelo teste do coxim plantar, pode também ser transferida por soro. Os Autores⁸ sugeriram que os antígenos responsáveis pela indução de resistência foram diferentes daqueles responsáveis pela resposta de hipersensibilidade retardada.

Investigações sobre as interrelações entre resistência e hipersensibilidade, imunidade celular e humoral, estudos sobre as células e/ou anticorpos envolvidos na indução e expressão da resistência do hospedeiro frente ao *P. brasiliensis*, serão de importância para a padronização de procedimentos preventivos ou mesmo curativos para pacientes portadores de paracoccidiodomicose. Neste contexto, o modelo experimental descrito no presente trabalho abre perspectivas de pesquisas posteriores.

5) No presente trabalho, a reação inflamatória ao *P. brasiliensis* não foi granulomatosa

epitelióide, mesmo nos camundongos previamente sensibilizados, que foram infectados quando já apresentavam índices elevados de resposta de hipersensibilidade retardada.

O papel desta resposta na indução da inflamação granulomatosa tem sido extensamente revisto e não parece haver necessariamente relação causa-efeito entre os dois fenômenos¹.

Admite-se, entretanto, que a presença de resposta imunocelular possa aumentar e acelerar o desenvolvimento de granulomas com células epitelióides e gigantócitos¹. Tem sido demonstrado que a inflamação granulomatosa é imunologicamente específica, transferida por linfócitos T e seu aparecimento abolido por timectomia ou administração de soro anti-linfocitário¹.

No presente trabalho, a infecção atuou como dose "booster" para os animais previamente sensibilizados, que mantiveram respostas positivas do teste do coxim plantar mesmo após 3 semanas de infecção, sem, no entanto, desenvolverem inflamação granulomatosa.

Os mesmos fatores ligados aos antígenos e resposta do hospedeiro, que sugerimos para explicar a dissociação entre resistência e hipersensibilidade retardada, teriam sido eventualmente os responsáveis pela ausência de resposta granulomatosa frente ao *P. brasiliensis*.

Este é assunto controverso, polêmico e ainda pouco explorado. Recentemente, observamos que partículas de bentonita são capazes de absorver antígenos do *P. brasiliensis*⁵. Este fato, apoiado nos trabalhos do grupo Warren³ sobre a patogenia do granuloma, abre perspectivas de futuras investigações visando o estudo da relação entre frações antigênicas do *P. brasiliensis* e a morfogênese do granuloma paracoccidioidomicótico.

SUMMARY

Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse. II — Intraperitoneal infection after previous sensitization.

Twenty male mice were intraperitoneally infected with 10×10^6 yeast forms of *P. brasiliensis* (18 strain). Prior to infection, 10 of those animals were sensitized during 4 weeks with a particulate *P. brasiliensis* antigen. As control groups, 10 mice were only sensitized and 10 re-

ceived no treatment. The animals were sacrificed 1 and 3 weeks after the infection and/or sensitization. It was carried out: 1) Footpadding tests for measuring specific delayed hypersensitivity response, performed 24 h prior to sacrifice; 2) Immunodiffusion tests for measuring specific humoral immune response; 3) Histopathology of the peritoneum.

It was observed: 1) The specific sensitization evoked good cellular and humoral immune responses; 2) In the previously sensitized mice, the infection mimicked a booster injection, determining increase in both the cellular and humoral immune response; 3) The course, the intensity and the quality of the paracoccidioidomycotic peritonitis were similar in all sensitized and insensitized infected animals; 4) The peritoneal inflammation was non-specific, without granulomata, even in the previously sensitized mice showing elevated specific immune-cellular responses.

The presented model should be a good experimental tool for further studies on the role of resistance and delayed hypersensitivity in the course of the disease and in the morphogenesis of the granuloma in paracoccidioidomycosis.

AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem a colaboração técnica dos Srs. Luiz Gastão Chamma e Wilson Virgílio Fábio e estudo estatístico feito pela Dra. Sheila Zambello Pinho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D. O. — The granulomatous inflammatory response. A review. *Am. J. Path.* 84: 164-192, 1976.
2. BOLEN, J. B. & TRIBBLE, J. L. — Delayed hypersensitivity to *Staphylococcus aureus* in mice: "in vivo" responses to isolated staphylococcal antigens. *Immunology* 38: 809-817, 1979.
3. BOROS, D. L. & WARREN, K. S. — The bentonite granuloma. Characterization of a model system for infection and foreign body granulomatous inflammation using mycobacterial, histoplasma and schistosoma antigens. *Immunology* 24: 511-529, 1973.
4. CROWLE, A. J.; ATKINS, A. & MAY, M. — Induction of delayed hypersensitivity to protein antigens in mice without Freund adjuvants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 60: 14-26, 1977.
5. FABIO, W. V.; CHAMMA, L. G. & FRANCO, M. F. — Reação de imunofluorescência indireta com partículas

- de bentonita sensibilizadas com antígeno polissacáride ou protéico de *P. brasiliensis*. **ENCONTRO SOBRE PARACOCIDIOIDOMICOSE**. Barra Bonita, São Paulo, Set. 28-30, 1979. Anais... Barra Bonita, 1979, p. 14.
6. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exper.* 18: 197-254, 1955.
 7. GRAYBILL, J. R. & TAYLOR, R. L. — Host defense in cryptococcosis. In. An "in vivo" model for evaluating immune response. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* 57: 101-113, 1978.
 8. HENDERSON, D. C.; PARKER, D. & TURK, J. L. — Dissociation between tumor resistance and delayed-type hypersensitivity to tumour-associated antigens in the mouse. *Immunology* 39: 1-9, 1980.
 9. MOSCARDI, M. & FRANCO, M. F. — Paracoccidiodomicose experimental do camundongo. I. Aspectos imunopatológicos da infecção intraperitoneal. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 22: 286-293, 1980.
 10. MUSATTI, C. C. — **Imunidade celular na paracoccidiodomicose**. [Tese de Doutorado]. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1974.
 11. PERAÇOLI, M. T. S. — **Paracoccidiodomicose experimental do hamster. Estudo da imunidade celular e humoral, correlação com a morfologia das lesões de inoculação e disseminação**. [Tese de Mestrado]. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1978.
 12. RIFKIND, D.; FREY, J. A.; PETERSON, E. A. & DINOWITZ, M. — Delayed hypersensitivity to fungal antigens in mice. I. Use of the intradermal skin and footpad swelling tests as assays of active and passive sensitization. *J. Infect. Dis.* 133: 50-56, 1976.
 13. VAN DER MEER, C.; HOFHUIS, F. M. A. & WILLERS, J. M. N. — Delayed-type hypersensitivity and acquired cellular resistance in mice immunized with killed *Listeria monocytogenes* and adjuvants. *Immunology* 37: 77-82, 1979.
 14. WINDER, C. V.; WAX, J. & BEEN, M. A. — Rapid foot volume measurement on unanesthetized rats, and the question of phenylbutazone effect on anaphylactoid edema. *Arch. Int. Pharmacodyn. Theor.* 62: 174-187, 1957.
 15. YOUMANS, G. P. — Editorial — Relation between delayed hypersensitivity and immunity in tuberculosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 111: 109-118, 1975.
- Recebido para publicação em 15/9/1980.