



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Adriana Sierra Assêncio Almeida Barbosa

**Efeito do estado nutricional na resposta imunológica de
camundongos BALB/c inoculados com *Lacazia loboi***

Tese apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Doenças
Tropicais da Faculdade de Medicina
de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do Título de
Doutor em Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira
Co-orientadora: Profa. Dra. Fátima Regina Vilani Moreno

Botucatu – S.P.

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSÂNGELA LOBO**

Barbosa, Adriana Sierra Assencio Almeida.

Efeito do estado nutricional na resposta imunológica de camundongos BALB/c inoculados pelo fungo *Lacazia loboi* / Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Paulo Câmara Marques Pereira

Capes: 40101096

Desnutrição – Estudos experimentais. 2. Blastomicose queloidiana. 3. Sistema imune. 4. Micoses. 5. Camundongos como animal de laboratório.

Palavras-chave: BALB/c; Desnutrição; Doença de Jorge Lobo; *Lacazia loboi*; Sistema imune.

EPÍGRAFE

Salmo 23

*O Senhor é o meu Pastor, nada me
faltará. Deitar-me faz em verdes*

pastos,

*guia-me mansamente às águas
tranqüilas. Refrigera a minha*

alma,

*guia-me pelas veredas da justiça
por amor do seu nome.*

*Ainda que eu andasse pelo vale da
sombra da morte não temeria mal
algum, porque tu estás comigo, a
tua vara e o teu cajado me*

consolam.

*Preparas uma mesa perante mim
na presença dos meus inimigos,
unges a minha cabeça com óleo, o
meu cálice transborda.*

*Certamente que a bondade e a
misericórdia
me seguirão todos os dias da minha
vida,*

*e habitarei na casa do Senhor por
longos dias. Amém.*

Bíblia Sagrada

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIAS

A DEUS

Não tenho palavras para te agradecer, para te exaltar por tudo que tem preparado para mim. Estas comigo em todos os momentos, sempre me ajudando e me dando força para vencer cada obstáculo.

AOS MEUS PAIS

Ester Sierra Assêncio Almeida e Lourival Francisco Garcia Almeida

Dedico a vocês este estudo, pelo amor que sempre me deram, pelas palavras de incentivo e confiança em todos os momentos. Obrigada por tudo que fizeram por mim e agradeço a Deus todos os dias por vocês existirem.

MEU IRMÃO

André Sierra Assêncio Almeida

Eu, você e agora o Arthur somos as jóias preciosas que nossos pais possuem. Tenho um amor incondicional por você e que mesmo distante tenho certeza que sempre torceu por mim, assim como eu torço por você.

MEU ESPOSO

Alexandre Fernando Barbosa

Apareceu na minha vida no momento que eu menos esperava e em pouco tempo nós nos unimos pela palavra do Senhor Jesus num só corpo. Agradeço pela paciência, carinho, amor e compreensão. Está sempre presente e a cada dia que passa aumenta mais o meu amor por você, sendo este imensurável.

AO NOSSO FILHO

Arthur Sierra Assêncio Almeida Barbosa

Não temos palavras para expressar o amor que sentimos por você, mesmo ainda dentro da barriga da mamãe, nós todos já te amamos e temos certeza que você foi um presente que Deus nos deu.

“A VOCÊS DIVIDO OS MÉRITOS DESTA VITÓRIA PROMETIDA POR DEUS”

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira

Pela paciência, orientação e confiança depositada em mim. Sua sabedoria e competência foram essenciais durante todos os momentos.

A minha co-orientadora, Dra. Fátima Regina Vilani Moreno

Por ter acreditado em mim, possibilitando que um grande sonho da minha vida se tornasse real. Agradeço pelos estímulos em todas as etapas deste trabalho e por me fazer acreditar que posso ir muito mais além. Serei eternamente agradecida por tudo que fez.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima

Que permitiu que esse sonho se concretizasse.

Aos Funcionários e Amigos do Instituto Lauro de Souza Lima

Serei sempre grata a todos os funcionários da Equipe Técnica de Biologia, Equipe Técnica de Microbiologia, Equipe Técnica de Imunologia, Equipe Técnica de Patologia, Setor de Biotério e Laboratório Clínico, que me ajudaram e que foram sempre prontos a me auxiliar em todas as etapas dessa conquista. Faço agradecimentos a algumas pessoas que foram especiais nesta caminhada como: Andréa de Faria Fernandes Belone, Beatriz Sartori, Sílvia Cristina Barboza Pedrini, Sônia Maria Uso Ruiz Silva e Suzana Madeira Diório. A todos muito obrigada.

À Universidade Estadual Paulista-UNESP/Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Pela oportunidade da realização deste sonho.

À Solange, Michele, Alana e Júlio

Funcionários do Departamento de Doenças Tropicais que sempre me atenderam com carinho e atenção.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP)

Em especial ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente e Juliana Cristina Interdonato pela dedicação e atenção durante o meu caminho contribuindo para a realização desse trabalho.

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação

Pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Às Bibliotecárias

Pela colaboração, revisão, correção das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica desse trabalho.

A todos familiares e amigos

Que mesmo distantes, sempre torcendo pelas minhas conquistas.

A todos aqueles que de diferentes formas contribuíram para que esse sonho se transformasse em realidade.

“Que diremos, pois, diante dessas coisas? Se Deus é por nós, quem será contra nós?”

Aos Romanos Capítulo 8 verso 31.

RESUMO

RESUMO

A doença de Jorge Lobo é micose cutânea-subcutânea de evolução crônica causada pelo fungo *Lacazia loboi*. Esta micose é predominante na região Amazônica e afeta principalmente trabalhadores rurais que vivem em contato constante com a vegetação e o solo, como é o caso dos seringueiros dessa região. Até o momento não existem estudos sobre a participação do estado nutricional na resposta imunológica abordando a doença de Jorge Lobo; assim, este estudo tem por finalidade avaliar os efeitos da desnutrição protéico-calórica na resposta imune de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c inoculados com *L. loboi*, empregando parâmetros imunológicos e histopatológicos. O presente estudo foi desenvolvido com 120 camundongos do sexo masculino, da linhagem BALB/c, com idade aproximada de 12 semanas e cerca de 25g de peso corporal. Foram constituídos quatro grupos: G1: 30 camundongos inoculados com o fungo *L. loboi*, recebendo restrição dietética de 20% da dieta normal; G2: 30 camundongos não inoculados, recebendo restrição dietética de 20% da dieta normal; G3: 30 camundongos inoculados, recebendo dieta normal; G4: 30 camundongos saudáveis. Os animais dos grupos G1 e G2 foram submetidos previamente, por 20 dias, antes do início do estudo, a restrição dietética com oferta diária de 80% da quantidade ingerida pelos grupos G3 e G4. Após instalada a desnutrição, os animais foram inoculados no coxim plantar, via intradérmica, com fungo *L. loboi* e depois de 4 meses (período de aparecimento das lesões macroscópicas no coxim plantar), os animais foram sacrificados e submetidos ao lavado peritoneal e à necrópsia para a retirada dos órgãos: fígado e baço. Os coxins plantares foram removidos para determinação da viabilidade e do número total de fungos, além do histopatológico. As células do lavado peritoneal foram utilizadas para: cultura de células totais para dosagem da citocina IFN- γ , cultura de macrófagos para quantificação do NO, H₂O₂, O₂⁻ e da citocina TNF- α . Os resultados revelaram que a infecção pelo *L. loboi* não exerceu grande influência no peso corporal dos camundongos que recebiam dieta normal, quando comparados com o grupo controle, sendo assim ambos os grupos infectados (G1e G3) apresentaram comportamento semelhante ao dos seus respectivos controles. Em relação ao peso do

fígado e baço dos grupos desnutridos (G1 e G2), os resultados revelaram redução de peso quando comparados aos grupos sem restrição alimentar (G3 e G4), fato esse já esperado. A análise histopatológica do baço revelou apenas congestão sinusoidal em todos os grupos. A análise do fígado mostrou que os grupos inoculados (G1 e G3) apresentaram degeneração vacuolar e reatividade nuclear mais intensa. A viabilidade e o número total de fungos encontrados nos coxins plantares dos camundongos inoculados revelaram aumento nos camundongos nutridos (G3) quando comparados com os camundongos desnutridos (G1). Em relação à análise histopatológica dos coxins plantares observamos aumento do infiltrado inflamatório no grupo nutrido em relação ao grupo desnutrido, com grande número de macrófagos e células gigantes multinucleadas. No grupo nutrido (G3) os linfócitos estavam presentes em números discretos e aumentaram no grupo desnutrido (G1), enquanto o número de neutrófilos foi semelhante nos dois grupos. A desnutrição exerceu grande influência sobre a dosagem de H_2O_2 e NO, uma vez que no grupo desnutrido (G1 e G2) houve menor produção desses metabólitos em comparação ao grupo nutrido (G3 e G4); entretanto o processo infeccioso não estimulou maior liberação de H_2O_2 e NO, pois não houve diferença entre camundongos infectados e sadios (G3 e G4), assim como desnutridos infectados e desnutridos (G1 e G2). A dosagem de O_2^- não foi diferente nos grupos estudados. Os grupos desnutridos (G1 e G2) apresentaram diminuição na produção de NO e um aumento na produção de $IFN-\gamma$, quando comparado ao grupo sadio. No grupo nutrido e infectado (G3) a produção de $IFN-\gamma$ foi maior que seu respectivo controle, entretanto a produção espontânea de NO foi menor. Observamos que o $TNF-\alpha$ apresentou alterações significativas em relação aos grupos estudados, com maiores níveis no grupo desnutrido inoculado em comparação ao seu controle, assim como níveis elevados no grupo inoculado em relação aos sadios. Portanto, observamos que a infecção não exerceu grande influência sobre a perda de peso, a desnutrição prévia foi um fator desfavorável à viabilidade, ao número de fungos e ao infiltrado inflamatório do coxim plantar. A produção de H_2O_2 e NO ficaram reduzidas nos animais desnutridos. Outro fator importante foi a elevação marcante das citocinas tanto $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, quando comparamos o grupo sadio com os demais, essas elevações ficaram maior quando associamos desnutrição e infecção. Em resumo, podemos ressaltar que existe grande interação entre a doença de Jorge Lobo, nutrição e imunidade e que levando em consideração o fato dos pacientes possuírem baixas condições socioeconômicas e talvez

apresentarem provável carência nutricional, são necessários novos estudos em humanos para poder conhecer melhor essa interação entre a doença de Jorge Lobo, nutrição e imunidade com outros marcadores imunológicos e nutricionais, o que possibilitará um maior entendimento dessa complexa doença.

Palavras-chaves: BALB/c, desnutrição, doença de Jorge Lobo, *Lacazia loboi* e sistema imune.

ABSTRACT

ABSTRACT

The Jorge Lobo's disease is a cutaneous and subcutaneous mycosis with chronicle evolution caused by the fungus *Lacazia loboi*. This mycosis is predominant in the Amazon region and affects mainly rural workers who live in constant contact with the vegetation and the soil, such as the rubber tappers in this region. Up to this date there haven't been studies about the participation of the nutritional state in the immunological response approaching the Jorge Lobo; thus, this study aims to evaluate the effects of the protein-calorie malnutrition in the immune response of the isogenic mice lineage BALB/c inoculated with *L. loboi*, using hystopatological and immunological parameters. The present study was developed with 120 male mice lineage BALB/c, with approximately 12 weeks old and circa 25g of body weight. Four groups were made: G1: 30 mice inoculated with *L. loboi* fungus, receiving diet restriction of 20% of the normal diet; G2: 30 non inoculated mice, receiving diet restriction of 20% of normal diet; G3: 30 mice inoculated receiving normal diet; G4: 30 healthy mice. The animals in the groups G1 and G2 were previously submitted for 20 days before the beginning of the study to a diet restriction with a daily offer of 80% of the quantities ingested by groups G3 e G4. After malnutrition was installed the animals were inoculated in the plantar cushion, via intradermic, with *L. loboi* fungus and after 4 months (period of the appearance of the macroscopic lesions in the plantar cushion), the animals were sacrificed and submitted to a peritoneal washing and to a necropsy to remove the organs: liver and spleen. The plantar cushions were removed for determining the viability and the total number of fungi, besides the hystopatological. The cells in the peritoneal washing were used for: total cell culture for the dosage of cytokine IFN- γ , macrophage culture for quantification of NO, H₂O₂, O₂⁻ and the cytokine TNF- α . The results revealed that the infection by *L. loboi* did not have great influence in the body weight of the mice which received normal diet when compared to the control group. Thus, both infected groups (G1e G3) presented similar behavior to their respective control groups. In relation to the weight of the liver and spleen in the malnourished groups (G1 e G2) the results revealed a reduction of weight when compared to the groups without feeding restrictions (G3 e G4). A fact we have already expected. The hystopatological analysis of the spleen only revealed sinusoidal congestion in all

groups. The liver analysis showed that the inoculated groups (G1 e G3) presented vacuolar degeneration and more intense nuclear reactivity. The viability and the total number of fungi found in the plantar cushions of the inoculated mice revealed an increase in the nourished mice (G3) when compared to the malnourished mice (G1). In relation to the hystopatological analysis of the plantar cushions we have observed the increase of inflammatory infiltrate in the nourished group in relation to the malnourished group, with a great number of macrophages and multinucleated giant cells. In the nourished group (G3) the lymphocytes were presented in a small number and increased in the malnourished group (G1), while the number of neutrophils was similar in both groups. The malnourishment had a big influence on the H_2O_2 and NO dosage, once that in the malnourished groups (G1 e G2) there has been a lower production of these metabolites in comparison to the nourished groups (G3 e G4); however the infectious process did not stimulate a higher liberation of H_2O_2 e NO, once there has not been a difference between infected and healthy mice (G3 e G4), the same with the infected malnourished and the malnourished (G1 e G2). The dosage of O_2^- was not different in the groups studied. The malnourished groups (G1 e G2) presented a decrease in the production of NO and an increase in the production of $IFN-\gamma$, when compared to the healthy group. In the nourished and infected group (G3) the production of $IFN-\gamma$ was higher than its respective control group; however the spontaneous production of NO was smaller. We have observed that the $TNF-\alpha$ presented significant alterations in relation to the studied groups, with higher levels in the inoculated malnourished group in comparison to its control group, thus with higher levels in the inoculated group in relation to the healthy ones. Therefore we have observed that the infection did not have a great influence on the loss of weight, the previous malnourishment was an adverse factor to the viability, to the number of fungi and to the inflammatory infiltrated of the plantar cushion. The production of H_2O_2 e NO was reduced in the malnourished animals. Another important factor was the highlighted elevation of the cytokines $TNF-\alpha$ and $IFN-\gamma$, when we compare the healthy group with the others, these elevations become higher when we associate malnourishment and infection. In short, we can emphasize that there is a large interaction among Jorge Lobo's disease, nutrition and immunity, and taking into account the fact that the patients have lower social economic conditions and perhaps present a probable nutritional deficiency, new studies in humans are necessary to be able to know better

this interaction among Jorge Lobo's disease, nutrition and immunity with other immunological and nutritional markers, which will enable a higher understanding of this complex disease.

Key words: BALB/c, malnutrition, Jorge Lobo's disease, *Lacazia loboi* and immune system.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Introdução 01

Objetivos 13

Material e Métodos 16

Resultados 26

Discussão 47

Considerações Finais 59

Referências Bibliográficas 62

Anexo 81

Apêndices 83

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Nutrição, Infecção e Imunidade

Segundo Hughes & Kelly ⁽¹⁾, o termo desnutrição designa qualquer desordem resultado de uma dieta inadequada ou desequilibrada, de uma falta de absorção de elementos dietéticos, ou ainda, com alguma frequência, de um inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, geralmente motivado pelo acometimento de doenças infecciosas.

A desnutrição pode ocorrer como consequência de uma deficiência energética (desnutrição protéico-calórica-DPC) ou de um micronutriente. Seja qual for a causa, ela é considerada um dos fatores mais relevantes de doença e óbito em países em desenvolvimento, afetando particularmente crianças e gestantes. ⁽²⁻⁶⁾

A desnutrição é considerada a causa da maior prevalência de imunodeficiências adquiridas no mundo, sendo acompanhada por mortalidade e morbidade elevadas. Vários fatores ambientais de natureza biológica, incluindo os micro-organismos causadores de doenças, tais como vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos, podem ter o seu poder infectante e/ou patogênico modificado em indivíduos submetidos a diferentes dietas. ⁽⁷⁻⁹⁾

A interação entre nutrição e infecção tem sido considerada um dos maiores problemas para o desenvolvimento e sobrevivência do homem. ^(2,3,10) A desnutrição pode levar à gravidade das infecções e à mortalidade. ^(4,10)

O processo infeccioso estimula os mecanismos de defesa inespecíficos e específicos do hospedeiro e, estes, sofrem influência direta do estado nutricional. Além disso, o processo infeccioso generalizado costuma ser acompanhado por hipercatabolismo, agravado por anorexia, resultando na perda e na consequente depleção das reservas corpóreas de nutrientes. A maior demanda energética durante o processo infeccioso é acompanhada por grandes alterações no metabolismo do hospedeiro, que tem como finalidade prepará-lo no sentido de combater o agente agressor. ⁽¹¹⁻¹⁴⁾

As alterações imunológicas, que estão intimamente relacionadas ao estado nutricional, contribuem de forma acentuada para que ocorra uma suscetibilidade maior a instalação

de agentes infecciosos, que por outro lado pode levar ao agravamento do estado nutricional, formando-se, assim, um ciclo vicioso. ^(10,15-17)

Existe uma relação dinâmica entre doença, imunidade e nutrição. A imunidade do hospedeiro depende da replicação celular e da síntese protéica, por essa razão é diretamente afetada pelo estado nutricional do indivíduo, que determina a habilidade metabólica celular e a eficiência com que a célula reage aos estímulos, dando início e continuidade às respostas imunes. Dentre as consequências das deficiências nutricionais pode ser citada a diminuição dos mecanismos inespecíficos de defesa e da imunidade humoral e celular, ou seja, redução da capacidade bactericida dos fagócitos, da produção de componentes do sistema complemento, do número total de linfócitos e do equilíbrio entre os subtipos de linfócitos T. ⁽¹⁸⁻²²⁾

A DPC provoca uma deficiência de calorias e aminoácidos, essenciais na síntese de DNA e RNA, na produção de proteínas de fase aguda e de energia. Essa deficiência leva a um considerável comprometimento do sistema imune, uma vez que as citocinas são constituídas por aminoácidos e a expansão clonal desse sistema depende da síntese protéica. ⁽²³⁻²⁵⁾

As citocinas são mediadores de uma grande variedade de reações biológicas, algumas essenciais para resposta metabólica, hemodinâmica, imunológica e reparadora do organismo ao trauma. A complexa interação entre as citocinas, o sistema neuroendócrino clássico e os vários outros fatores humorais secundários estimula a resposta inflamatória que visa à preservação da vida. ^(19, 21-25)

A participação das citocinas tem sido observada tanto no processo inflamatório agudo quanto crônico. Todo esse processo é acompanhado por aumento da demanda energética e baixa ingestão de alimentos, o que pode afetar o estado nutricional do indivíduo, podendo até evoluir para caquexia, sendo que as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-6 possuem grande importância na tríade desnutrição, infecção e imunidade (Figura 1). ⁽²³⁾

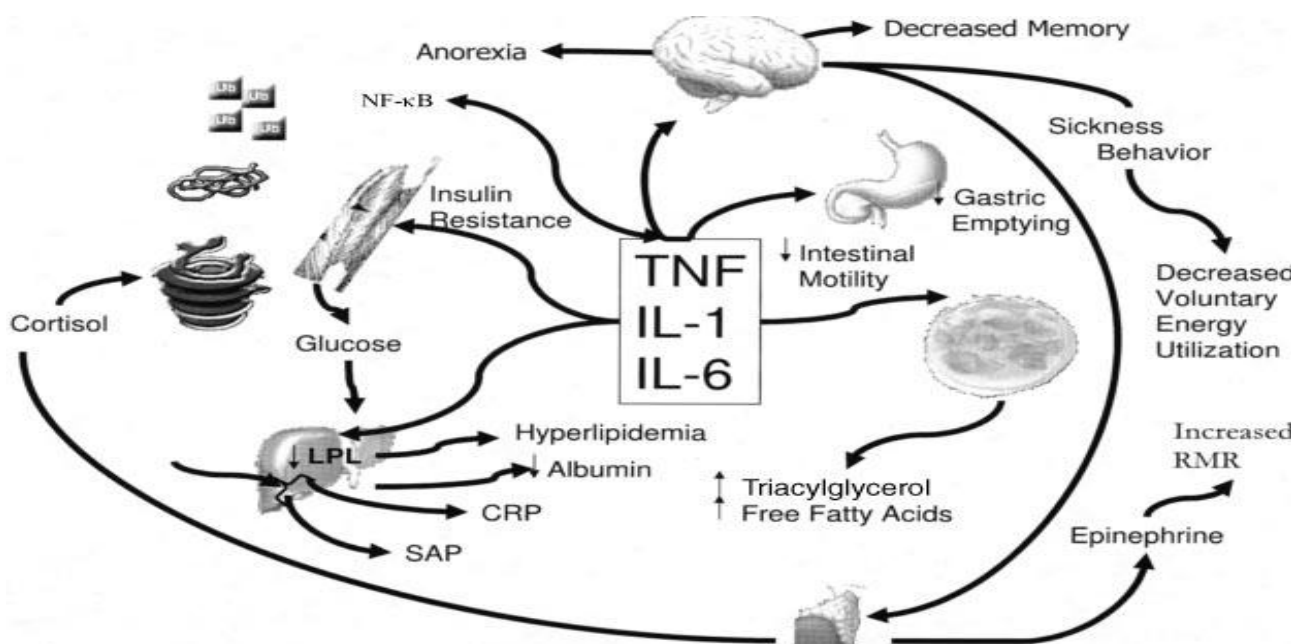


Figura 1: Participação da resposta imune na desnutrição. Fonte: Morley *et al.* 2006.⁽²³⁾

O impacto da desnutrição no sistema imune tem sido demonstrado tanto clinicamente como em estudos experimentais.⁽²⁶⁾ Os animais de laboratório vêm sendo empregados de forma crescente para avaliar os efeitos dos graus variáveis de desnutrição na susceptibilidade às infecções e também nos diferentes parâmetros da resposta imunológica. A grande vantagem do uso destes modelos é permitir avaliação altamente controlada de cada parâmetro nutricional o que não é possível no caso das populações humanas. Camundongos e ratos adultos (isogênicos ou não), alimentados com quantidades reduzidas de proteínas, vitaminas ou micronutrientes, constituem os modelos mais utilizados.^(26,27)

No estudo pioneiro realizado por Actor⁽²⁸⁾ envolvendo modelo murino, os resultados obtidos possibilitaram concluir que a DPC, associada à deficiência de vitaminas, está diretamente relacionada ao aumento da susceptibilidade à infecção por parasitas causadores da Leishmaniose Visceral. Através de observações epidemiológicas, Badaró *et al.*⁽²⁹⁾ concluíram que a DPC é também um sério fator de risco para o desenvolvimento da Leishmaniose Visceral em humanos.

Estudos avaliando a resposta imune humoral e celular em camundongos desnutridos, não isogênicos, inoculados com *Schistosoma mansoni* revelaram que na fase crônica da

infecção, os animais apresentam deficiência protéica com baixos títulos séricos de IgG1, IgG2 e IgG3 em relação a camundongos infectados e não desnutridos. Contudo, não houve diferença quanto à produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-5 nos dois grupos de animais estudados.⁽³⁰⁾

Outros estudos experimentais avaliando os níveis de imunoglobulinas em camundongos submetidos à desnutrição aguda revelaram níveis elevados de IgG1 e IgE e níveis inalterados de IgG2 e IgG3. Resultados similares foram descritos em modelo experimental murino com deficiência de vitamina A, no qual foi também observado aumento significativo de células T (Th2 ou T reguladoras) produtoras de IL-10, associado a uma queda no desenvolvimento de células Th1 de memória. Outros estudos demonstraram que a deficiência protéica diminuiu a proliferação de células T específicas, mas não a ativação de células B específicas em camundongos desnutridos.^(19,20,24)

Em outros estudos também tem sido observado que ratos desnutridos apresentam subpopulações reduzidas de linfócitos TCD3⁺ e TCD4⁺, juntamente com redução na expressão de moléculas associadas com o processo de ativação e proliferação, como é o caso de CD25 e CD71.^(20,22,27) Esta ativação comprometida de células T está claramente associada com baixa produção de citocinas, as quais são os principais mediadores moleculares da resposta imune. Isto ficou claramente evidenciado em crianças desnutridas as quais apresentaram redução acentuada na produção de citocinas séricas do tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ).^(21,22,27)

Existem vários estudos avaliando o estado nutricional e a resposta imune de camundongos infectados por *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania chagasi*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*^(26,27,30-32), entretanto não existem estudos relacionando o aspecto nutricional e a doença de Jorge Lobo, o que nos motivou a desenvolver este estudo como tema de nossa tese de doutorado.

1.2 - Nutrição, Infecção e Imunidade na Doença de Jorge Lobo

A doença de Jorge Lobo foi descrita em 1931 pelo médico Dr. Jorge de Oliveira Lobo, em Recife, em um paciente do sexo masculino de 52 anos que exercia atividades extrativistas nos seringais da Amazônia e apresentava, havia cerca de 19 anos, nódulos nas regiões lombo-sacral e glútea. ⁽³³⁾

A doença de Jorge Lobo é também denominada Lobomicose, Blastomicose Queloidiforme, Blastomicose tipo Jorge Lobo, Granulomatose Blastomicóide, Blastomicose da Amazônia e recentemente, Lacaziose. ⁽³⁴⁾

É uma infecção fúngica cutânea-subcutânea, crônica e granulomatosa, causada pelo fungo *Lacazia loboi* (*L. loboi*) e caracteriza-se por lesões nodulares isoladas e coalescentes, em geral de aspecto queloidiano, localizadas principalmente no pavilhão auricular e nos membros dos pacientes, não havendo registro de lesões mucosas. ^(34,35)

A doença é endêmica na região Amazônica brasileira e em menor número há casos em outros países como Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname, Panamá, Costa Rica, México, Peru, Honduras, Equador, Bolívia, Estados Unidos e Canadá. ^(34,36,37)

Por não se tratar de doença de notificação compulsória, a sua real prevalência é desconhecida. Woods et al. ⁽³⁸⁾ em um estudo desenvolvido no Departamento de Dermatologia Sanitária em Rio Branco e no interior do Estado do Acre, registrou 249 casos entre 1998 e 2008, comprovados por exame histopatológico e/ou micológico, totalizando 490 casos publicados no mundo. ⁽³⁴⁾

A micose tem sido observada em brancos, negros e índios. Estudo realizado sobre o número de casos da doença na população indígena da tribo Caiabi (sendo 57 casos diagnosticados em 560 indivíduos) determinou que os fatores ambientais e o risco de exposição ao agente eram importantes na disseminação da doença. Essa tribo estava situada em território entre os rios Arinos e Teles Pires, afluentes do Tapajós, no estado do Mato Grosso. Quando a tribo foi transferida para o Parque Nacional do Xingu, houve queda do número de casos devido à ausência da doença nos descendentes nascidos na nova área. ^(35,39-42)

A doença de Jorge Lobo acomete principalmente trabalhadores rurais que vivem em contato constante com a vegetação e o solo, como é o caso dos seringueiros da Amazônia. A doença é mais comum no sexo masculino devido às atividades

ocupacionais exercidas e manifesta-se, geralmente, na faixa etária de 21 a 40 anos, coincidindo com a maior exposição natural ao agente, por ser época de maior atividade laborativa. ^(34,35)

O seu agente etiológico é um fungo classificado como *L. loboi* pertencente à ordem *Onygenales*, família *Ajellomycetaceae* e apresenta muitas semelhanças com o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). A classificação taxonômica deste fungo sempre foi um desafio para os pesquisadores. Inicialmente classificado como *Glenosporella loboi* em 1940, *Blastomyces loboi* em 1942, *Glenosporopsis amazona* em 1943, *Paracoccidioides loboi* em 1948, *Loboa loboi* em 1956, *Lobomyces loboi* em 1968 e *Loboa loboi* em 1992, a partir de 1999 foi classificado como *Lacazia loboi*. ^(35, 37,43-47)

Foi Taborda et al. ⁽⁴⁵⁾ que propuseram a denominação *L. loboi*, argumentando que a designação *Paracoccidioides loboi* era taxonomicamente inválida, uma vez que encontraram melanina constitutiva na parede celular do fungo, detectável pela coloração de Fontana-Masson. Segundo os autores, esses achados reforçam a não inclusão do fungo no gênero *Paracoccidioides* ⁽⁴⁸⁾. A análise filogenética do *L. loboi*, realizada por Herr et al. ⁽⁴⁷⁾ sugere que o *L. loboi* é um fungo dimórfico, taxonomicamente irmão do *P. brasiliensis* e que eles pertencem a Ordem *Onygenales*, juntamente com o *Blastomyces dermatitides* e *Histoplasma capsulatum*.

À microscopia, o *L. loboi* é globóide, com espessas paredes de duplo contorno, refringentes, medindo 5 a 6 x 12 a 14µm e sua reprodução ocorre por gemulação simples. A abundância de fungos nos exames a fresco e nas preparações histológicas pode ser realçada pelos métodos de colorações do ácido periódico de Schiff (PAS) e prata metenamina de Gomori. ⁽⁴⁹⁻⁵²⁾

Em 1997, Vilani-Moreno & Opromolla ⁽⁵³⁾ determinaram a viabilidade do *L. loboi* obtido de lesões cutâneas de pacientes com a micose por meio do emprego dos corantes diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo (DF-BE). Verificaram índices de viabilidade que variaram de 21 a 46% e chamaram atenção para a enorme quantidade de células fúngicas presentes nas lesões que não apresentavam nenhuma estrutura no seu interior, parecendo cápsulas vazias que, ao tudo indica, correspondem a células inviáveis, conforme sugerido por Sesso & Baruzzi ⁽⁵¹⁾.

O habitat natural do *L. loboi* e suas condições de vida não são conhecidos. Presume-se que, na natureza, ele seja encontrado no solo, na água e nos vegetais. ^(35,54) O encontro

de golfinhos, naturalmente infectados com o fungo, sugere que a água, doce ou salgada, seja um de seus reservatório. ^(34,35)

A porta de entrada do *L. loboi* não se encontra totalmente esclarecida, acredita-se que o fungo penetre após pequenos traumatismos cutâneos. Parte dos pacientes relata o aparecimento das lesões após ferimentos provocados por traumatismo ou picada de insetos, fato muito comum em regiões de mata de áreas tropicais. ^(34,35)

O período de incubação da doença também não é conhecido, havendo evidências clínicas e laboratoriais de que ocorra entre um e dois anos. ^(34,35)

Clinicamente, a doença de Jorge Lobo caracteriza-se por lesões cutâneas de aspecto queloidiforme, infiltrativo, ulceroso, gomoso ou verruciforme, sendo que um mesmo paciente pode apresentar mais de um tipo de lesão ⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾. As formas infiltrativas da doença, segundo Silva ⁽⁵⁶⁾, são consideradas como sendo a forma inicial da micose, enquanto a forma ulcerosa, segundo Opromolla et al. ⁽³⁶⁾, parecem ser devidas mais a traumatismos do que primariamente à ulceração espontânea e, portanto, são clinicamente secundárias. Com relação à distribuição das lesões, Opromolla et al. ⁽³⁶⁾ classificaram como: lesões localizadas (restritas a uma única área), lesões multifocais (em um membro ou segmento de membro) e lesões disseminadas (envolvendo várias regiões anatômicas distintas).

Histopatologicamente, essa micose apresenta, como principal característica, uma reação histiocitária difusa, frequentemente com fibrose, restrita ao derma, com presença de células gigantes multinucleadas, tipo corpo estranho e Langhans, com numerosos fungos; linfócitos, plasmócitos e neutrófilos estão presentes em pequeno número. ^(35,37,55,60,61) Segundo Lacaz et al. ⁽³⁵⁾ o quadro histológico é bastante típico para permitir sua distinção de qualquer outra lesão blastomicótica.

O diagnóstico laboratorial da doença de Jorge Lobo é realizado através dos exames micológico direto e histopatológico. A pesquisa direta é feita em material obtido de lesões cutâneas onde o *L. loboi* é observado em grande número na forma de células leveduriformes globosas isoladas e em gemulação. ^(35,37,59,62-64)

É importante ressaltar que o diagnóstico precoce da doença assume grande importância, uma vez que, até o momento, não existe um tratamento eficaz, apesar das inúmeras tentativas empregando diferentes drogas. A remoção cirúrgica das lesões tem sido o tratamento utilizado, embora em muitos casos ocorra o aparecimento de novas lesões. Deste modo, os pacientes submetidos à retirada cirúrgica das lesões necessitam de

acompanhamento, por vários anos, antes de serem considerados como curados da micose. ^(63,65-67)

Cabe salientar que o fungo *L. loboi* ainda não foi cultivado em meios de cultura artificiais até o momento. Alguns autores relatam ter obtido sucesso em suas tentativas de cultivo, porém, o fungo obtido nessas culturas não corresponde ao agente etiológico da doença de Jorge Lobo. ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾

Muitos estudos foram realizados na tentativa de reproduzir experimentalmente a doença de Jorge Lobo e somente alguns mostraram resultados positivos. A inoculação do *L. loboi* na bolsa jugal do hamster por Sampaio et al. ⁽⁷¹⁾ resultou em lesões semelhantes às do homem, enquanto que em tatu do gênero *Euphractus*, Sampaio & Dias ⁽⁷²⁾ relataram lesões macroscópicas ricas em fungos. Em 2000, Opromolla et al ⁽⁷³⁾ inocularam o fungo no tecido celular subcutâneo da bolsa jugal do hamster e observaram que esse tecido não é local adequado para a proliferação do *L. loboi*, diferentemente dos resultados encontrados por Sampaio et al. ⁽⁷¹⁾.

A inoculação do fungo em camundongos Suíços, por via intradérmica, resultou em alterações histológicas semelhantes à doença humana, porém, sem lesões macroscópicas. ⁽⁷⁴⁾ Entretanto, Madeira et al. ⁽⁷⁵⁾ ao inocularem camundongos da linhagem BALB/c verificaram alterações histológicas semelhantes às da doença humana com grande número de fungos viáveis. Neste estudo, os fungos obtidos das lesões cutâneas de pacientes foram inoculados intradermicamente no coxim plantar do animal e a partir do 7º mês pós-inoculação, os animais começaram a apresentar lesões macroscópicas. Esses mesmos autores ao inocularem camundongos da linhagem BALB/c e B10. A com o fungo *L. loboi*, concluíram que o camundongo BALB/c é mais susceptível à infecção e deste modo, essa linhagem tornou-se modelo experimental para o estudo da doença de Jorge Lobo. ⁽⁷⁶⁾

Nos estudos relatados acima, os fungos foram obtidos de lesões cutâneas de pacientes com a micose, entretanto, Belone et al. ⁽⁷⁷⁾ reproduziram experimentalmente a doença de Jorge Lobo em camundongos BALB/c empregando fungos obtidos de outros camundongos previamente infectados e com lesões macroscópicas. Segundo os autores, os animais desenvolvem lesões macroscópicas antes do 7º mês pós-inoculação e apresentam alterações histológicas semelhantes às aquelas encontradas em camundongos inoculados com fungos obtidos de lesões humanas; sendo assim, sugeriram que a

linhagem de camundongos BALB/c é excelente para a manutenção do *L. loboi* em laboratório.

Na doença de Jorge Lobo os mecanismos envolvidos na suscetibilidade e resistência do hospedeiro frente ao *L. loboi* não estão ainda elucidados. Até o momento, não existem estudos sobre marcadores genéticos envolvidos na suscetibilidade à doença, exceto o trabalho realizado por Marcos et al ⁽⁷⁸⁾ que pesquisaram a frequência dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (HLA) de classe I e II em portadores desta micose e não encontraram qualquer tipo de associação entre os antígenos HLA e a doença de Jorge Lobo.

De modo semelhante, os estudos abordando os aspectos imunológicos são ainda muito escassos possivelmente pelo fato do seu agente etiológico não ter sido cultivado em meios artificiais, dificultando assim, a obtenção de antígenos específicos do fungo que possam ser empregados na avaliação da resposta imune humoral e celular. Dos estudos realizados até o momento, a maioria tem empregado antígenos do *P. brasiliensis* e revelam reações cruzadas entre eles. ⁽⁷⁹⁻⁸³⁾

Os estudos abordando os mecanismos inespecíficos de defesa do hospedeiro revelaram que os monócitos do sangue periférico dos pacientes com a micose de Jorge Lobo são capazes de fagocitar o *L. loboi* à semelhança dos indivíduos do grupo controle. ⁽⁸⁴⁾ Em outro estudo, pesquisadores demonstraram que o fungo *L. loboi* é capaz de ativar o sistema complemento pela via alternativa, além disso encontraram depósitos de C3 e IgG na parede dos fungos em cortes histológicos submetidos à imunofluorescência. Segundo os autores, os resultados destes estudos sugerem que o sistema complemento e as imunoglobulinas podem contribuir para os mecanismos de defesa do hospedeiro contra o *L. loboi*. ⁽⁸⁵⁾

A quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares dos pacientes com a micose revelou maior produção de IL-4 e IL-6 e níveis menores de IL-2 em comparação ao grupo controle, enquanto os níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-10 e IFN- γ não apresentaram alterações significativas. Assim, os autores sugerem que pacientes com doença de Jorge Lobo exibem predomínio de perfil Th2. ⁽⁸⁶⁾

Similarmente, estudo realizado por Mendoza et al. ⁽⁸⁷⁾ revelou níveis séricos de anticorpos IgG, que reconhece um antígeno com elevado peso molecular do *L. loboi*, em pacientes com a micose e também em camundongos BALB/c inoculados

experimentalmente, bem como em golfinhos naturalmente infectados, reforçando um predomínio do perfil Th2.

Um estudo realizado por Vilani-Moreno et al. ⁽⁸⁸⁾ identificaram a população celular do infiltrado inflamatório de 15 pacientes portadores da doença, através de método imunoistoquímico. Os autores verificaram a seguinte frequência de células: macrófagos CD68⁺ > linfócitos T CD3⁺ (linfócitos T CD4⁺ > linfócitos T CD8⁺) > células Natural Killer CD57⁺ > plasmócitos CD79⁺ > linfócitos B CD20⁺. Segundo os autores, a grande quantidade de fungos nas lesões, a desorganização das células no granuloma e as alterações no perfil de citocinas sugerem que os pacientes exibem distúrbios imunorregulatórios responsáveis pela não contenção do *L. loboi*.

Posteriormente, Xavier et al. ⁽⁸⁹⁾ ao avaliarem as lesões cutâneas de 25 casos da micose, por imunoistoquímica, encontraram positividade para macrófagos (CD68), bem como intensa marcação para TGF- β . Segundo os autores, a presença desta citocina desempenharia um papel fundamental na etiopatologia da infecção pelo *L. loboi*, ou por inibir a resposta imune celular mediada principalmente pelos macrófagos ou por induzir o processo da fibrose. Achados semelhantes foram encontrados por Quaresma et al. ⁽⁹⁰⁾ Recentemente, Vilani-Moreno et al. ⁽⁹¹⁾ investigaram a presença das citocinas IL-10, TGF- β 1 e TNF- α e da enzima iNOS nas lesões cutâneas de 16 pacientes portadores da micose, por método imunoistoquímico. Os resultados revelaram que o TGF- β 1 foi a citocina expressa com maior frequência pelas células presentes no infiltrado inflamatório, seguido pela IL-10 e iNOS; quanto ao TNF- α , houve um número mínimo de células expressando essa citocina. Esses resultados levaram os autores a sugerirem que a presença de citocinas imunossupressoras nas lesões dos pacientes poderia ser responsável pela não contenção do patógeno, evidenciado pela presença de numerosos fungos no granuloma.

Baseado no exposto acima e considerando que até o momento não existem estudos sobre a participação do estado nutricional na resposta imunológica abordando a doença de Jorge Lobo e que a população afetada apresenta baixo nível socioeconômico com provável carência nutricional, este estudo tem por finalidade avaliar os efeitos da DPC na resposta imune de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c inoculados com *L. loboi*, empregando parâmetros imunológicos e histopatológicos.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1-Objetivo Geral:

Avaliar o efeito do estado nutricional na resposta imune de camundongos da linhagem BALB/c inoculados no coxim plantar com *Lacazia loboi*, aos 4 meses pós-inoculação.

2.2-Objetivos específicos:

Desenvolver a desnutrição protéico-calórica no modelo experimental murino da doença de Jorge Lobo através de restrição alimentar de 20%.

Avaliar o estado nutricional dos camundongos submetidos a desnutrição protéico-calórica, inoculados ou não com *L. loboi*, através do peso dos órgãos, fígado e baço, e da análise histopatológica.

Avaliar o processo infeccioso de camundongos inoculados com *L. loboi*, submetidos ou não a desnutrição protéico-calórica, através da determinação da viabilidade e do número total de fungos e da análise histopatológica do coxim plantar.

Avaliar a resposta imune de camundongos inoculados com *L. loboi*, submetidos ou não a desnutrição protéico-calórica, empregando as células do lavado peritoneal, através dos seguintes parâmetros:

Determinação dos metabólicos do oxigênio (H_2O_2 e O_2^-)

Dosagem do óxido nítrico (NO)

Quantificação das citocinas IFN- γ e TNF- α .

Contagem diferencial das células inflamatórias presentes no lavado peritoneal.

MATERIAL E MÉTODOS

3-MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa de protocolo nº. 785 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (Anexo 1)

3.1. Animais e ambiente de experimentação

O presente estudo foi desenvolvido com 120 camundongos do sexo masculino, da linhagem BALB/c, com idade aproximada de 12 semanas e cerca de 25g de peso corporal. Os animais foram obtidos do Biotério do Laboratório de Pesquisa, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.

Os parâmetros considerados no estudo foram os seguintes:

restrição dietética de 20% da dieta normal;

inoculação pelo fungo *Lacazia loboi*;

avaliações imunológicas e histopatológicas.

De acordo com esses parâmetros foram constituídos quatro grupos:

Grupo 01 (G1) - Composto por 30 camundongos inoculados com o fungo *L. loboi*, recebendo restrição dietética de 20% da dieta normal (Desnutridos X Inoculados).

Grupo 02 (G2) - Composto por 30 camundongos não inoculados com o fungo *L. loboi*, recebendo restrição dietética de 20% da dieta normal (Desnutridos).

Grupo 03 (G3) - Composto por 30 camundongos inoculados com o fungo *L. loboi*, recebendo dieta normal (Inoculados).

Grupo 04 (G4) - Composto por 30 camundongos saudáveis, não inoculados com o fungo *L. loboi*, recebendo dieta normal (Saudáveis).

3.2. Inóculo - fungo *L. loboi*

A suspensão de *L. loboi* foi obtida de lesões macroscópicas dos coxins plantares de camundongos BALB/c, previamente inoculados para manutenção do fungo ⁽⁷⁷⁾. Após a maceração dos coxins em solução salina 0,9%, a suspensão foi filtrada em filtro estéril de 40µm para eliminar os restos teciduais e o número total de fungos foi determinado em câmara de Neubauer. O índice de viabilidade fúngica foi avaliado por meio da coloração vital com diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo, padronizada para o *L. loboi* por Vilani-Moreno & Opromolla. ⁽⁵³⁾

3.3. Inoculação do fungo *L. loboi*

Os camundongos BALB/c foram inoculados por via intradérmica em ambos os coxins plantares traseiros com 0,03 ml da suspensão fúngica contendo $1,4 \times 10^6$ fungos, sendo a concentração do inóculo de $4,8 \times 10^7$ /ml e com uma viabilidade de 38%. Os animais foram mantidos, durante o período experimental, no Biotério da Equipe Técnica de Microbiologia do Instituto Lauro de Souza Lima, recebendo ração balanceada e água *ad-libitum*.

3.4. Dieta oferecida

Os animais receberam ração comercial Nuvilab CR-1 (Nuvital, Colombo, PR, Brasil), que é uma ração específica para alimentação de roedores de laboratório. Esse alimento tem como composição básica: carbonato de cálcio, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bi-cálcico, milho integral moído, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácido. Além desses componentes, a dieta inclui enriquecimento por Kg, a saber: ferro 50 mg; cobre 10,0 mg; zinco 60,0 mg; manganês 60,0 mg; iodo 2 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,5 mg; vitamina A 12.000UI; vitamina D3 1.800UI; vitamina E 30,0 mg; vitamina K3 3,0 mg; ácido fólico 1,00 mg; biotina 0,05mg; colina 600,0 mg; niacina 60,0 mg; ácido pantotênico 20,0 mg; vitamina B1 5,0 mg; vitamina B6 7,0 mg; vitamina

B2 6,00 mg; vitamina B12 20,00mg e antioxidante 100mg. A ração foi pesada em balança digital modelo AS5500C (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) com precisão de 0,25g a 5000g. Os animais dos grupos G1 e G2 foram submetidos previamente, por 20 dias, antes do início do estudo, a restrição dietética com oferta diária de 80% da quantidade ingerida pelos grupos G3 e G4.

3.5. Peso dos animais

A pesagem inicial dos animais ocorreu antes da submissão dos grupos G1 e G2 à restrição dietética. Após 20 dias, a desnutrição estava instalada e houve a pesagem para a inoculação, a partir desse momento. A determinação do peso dos animais de todos os grupos foi realizada mensalmente, tanto nos grupos com restrição alimentar quanto nos grupos sem restrição alimentar. Aos 4 meses, todos os animais foram pesados antes do sacrifício utilizando balança digital modelo AS5500C (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) com precisão de 0,25g a 5000g.

3.6. Sacrifício dos animais

Após 4 meses de inoculação (período de aparecimento das lesões macroscópicas no coxim plantar, conforme Belone et al. ⁽⁷⁷⁾) os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, conforme os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os animais foram submetidos ao lavado peritoneal, conforme descrito abaixo e à necrópsia para a retirada dos órgãos: fígado e baço. Os coxins plantares foram removidos para determinação da viabilidade e do número total de fungos, além do histopatológico. Baço e fígado foram pesados em balança digital modelo AB204 (Metler Toledo, Barueri, SP, Brasil) com precisão de 0,01g a 210g.

3.7. Determinação da viabilidade e número de fungos no coxim plantar

Após a maceração dos coxins em solução salina 0,9%, a suspensão foi filtrada em filtro estéril de 40µm para eliminar os restos teciduais e o número total de fungos foi determinado em câmara de Neubauer. O índice de viabilidade fúngica foi avaliado por

meio da coloração vital com diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo, padronizada para o *L. loboi* por Vilani-Moreno & Opromolla.⁽⁵³⁾

3.8. Obtenção de cortes histológicos dos órgãos e coxim plantar

Os órgãos, fígado e baço, foram retirados e na sequência, foram pesados em balança digital. O coxim plantar e os órgãos foram fixados em formalina tamponada a 10%, por 24 horas, e preparados pela técnica habitual para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4µm de espessura foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e prata metenamina de Gomori.⁽⁹²⁾

3.9. Isolamento das Células Peritoneais

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados em condições assépticas; para tanto, os materiais e reagentes utilizados foram previamente esterilizados e todos os passos foram realizados em câmara de fluxo laminar, previamente submetida à irradiação com luz ultravioleta por 20 min. Os animais foram colocados no interior da câmara de fluxo laminar e fixados em decúbito dorsal em suporte de dissecação. A parede abdominal foi exposta, rebatendo-se a pele da região e, em seguida, a cavidade abdominal foi lavada com 10 ml de solução salina 0,9% gelada, injetadas na porção mediana superior do abdome. A cavidade foi massageada e o líquido peritoneal foi colocado em tubos estéreis e mantidos em banho de gelo até o momento do uso. Este procedimento foi repetido 3 vezes. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1500 rpm por 10 min e as células ressuspensas em 1 ml de meio RPMI contendo L-glutamina e 25 mM de tampão HEPES adicionado de soro fetal bovino a 10% e penicilina (100 UI/ml)-estreptomicina (100 µg/ml) (meio completo). A determinação do número total de células peritoneais foi realizado através de diluição 1:2 com corante Turk a 5% em ácido cético glacial a 4% e contagem em câmara de Neubauer. A concentração final foi ajustada para 2×10^6 células/ml. A contagem do número total de macrófagos peritoneais foi realizada em câmara de Neubauer mediante diluição 1:8 da suspensão de células com corante vermelho neutro a 0,02% em solução salina, mantida por 20 min a 37°C. A concentração final da suspensão foi ajustada para 1×10^6 macrófagos/ml. A

viabilidade das suspensões celulares foi determinada com azul de Tripan a 0,1% em solução salina tamponada pH 7,2.

3.10. Cultura de Células Peritoneais

100 µl da suspensão celular de 2×10^6 células/ml foram distribuídos em placas de cultura de tecido, de fundo plano e com tampa, contendo 96 orifícios, na presença ou não do estímulo PHA-M (fitohemaglutinina, 10 µg/ml). A placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, durante 48 horas. Após este período, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos e estocados a -80°C para posterior dosagem da citocina IFN-γ.

3.11. Cultura de Macrófagos Peritoneais

100 µl da suspensão celular de 1×10^6 macrófagos/ml foram distribuídos em placas de cultura de tecido, de fundo plano e com tampa, contendo 96 orifícios. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, por 2 horas para aderência dos macrófagos. As células não aderentes foram removidas mediante lavagem dos orifícios com meio RPMI. Em seguida, foram adicionados 100 µl de meio completo em cada orifício na presença ou não de 10 µg/ml de LPS (lipopolissacáride da *E. coli*). A placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, durante 24 horas. Após este período, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, sendo uma parte empregada na dosagem do óxido nítrico e a outra estocada a -80°C para posterior dosagem da citocina TNF-α. Os macrófagos aderidos e cultivados por 24 h foram empregados para a determinação da água oxigenada e ânion superóxido.

3.12. Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) decompõe-se em nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) e sua detecção foi realizada por meio da medida de NO₂⁻ baseada no método colorimétrico da reação de Griess.⁽⁹³⁾ Em placa de 96 orifícios, foram pipetados 100 µl de sobrenadante de cultura e 100 µl do reagente de Griess, que contém n-(1-naftil)-etilenediamina (NEED) diluído a 0,1% em água destilada e sulfanilamida diluída a 1% em H₃PO₄ a 5%. Estes

reagentes, NEED e sulfanilamida, foram misturados em volumes iguais no momento da reação. A placa foi mantida por 10 min em temperatura ambiente e, a seguir, a leitura foi realizada em microleitor automático de ELISA com comprimento de onda de 540 nm, contra branco constituído por reagente de Griess. Os resultados foram expressos em micromolar (μM) de NO liberado/ 1×10^5 macrófagos, comparando-se a densidade óptica (DO) a uma curva padrão estabelecida em cada ensaio.

3.13. Produção de água oxigenada

A liberação de água oxigenada (H_2O_2) foi determinada de acordo com técnica descrita por Pick & Misel.⁽⁹⁴⁾ Após o período de 24 h do cultivo dos macrófagos e remoção dos sobrenadantes, as células aderentes foram ressuspensas no volume original (100 μl) em solução de vermelho de fenol contendo: 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho de fenol e 0,01 mg/ml de peroxidase de raiz forte tipo II. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida por 60 min, na presença ou não de 10 μl de forbol miristato acetato (PMA). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 10 μl de NaOH 1 N e a absorbância foi determinada em microleitor automático de ELISA com filtro de 620 nm, contra branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 1 N. Os resultados foram expressos em nanomol (nM) de H_2O_2 / 1×10^5 macrófagos, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída com concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho fenol, variando de 0,5, a 2,0 nM.

3.14. Produção do ânion superóxido

A dosagem do ânion superóxido (O_2^-) foi determinada utilizando-se o cromógeno ferricitocromo C, segundo método de Pick & Misel⁽⁹⁴⁾ adaptado por Russo et al.⁽⁹⁵⁾ Após o período de cultivo das células e remoção do sobrenadante, foi adicionado em cada orifício da placa 100 μl de solução contendo 160 μM de citocromo C em solução salina de Hank's livre de vermelho de fenol. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida por 15 min, na presença ou não de 10 μl de forbol miristato acetato (PMA). A leitura foi realizada em microleitor de ELISA com filtro de 540 nm, contra

branco constituído de solução de Hank's sem vermelho de fenol. A concentração do O_2^- foi expressa em nanomol (nM) e calculada por meio da seguinte relação: $\frac{DO \times 100}{6,3}$.

6,3

3.15. Citocentrifugação do Lavado Peritoneal

Após contagem do número total de células do lavado peritoneal e ajuste da concentração para $2,5 \times 10^5$ células/ml, 200 μ l da suspensão celular foi submetida à citocentrifugação (Citocentrífuga Marca Labho, modelo CR 12, Brasil) por 10 min, a 1500 rpm. As lâminas foram removidas, fixadas com metanol e coradas por Giemsa.

A porcentagem de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, mastócitos e células gigantes multinucleadas foi determinada contando-se 100 células com objetiva de 100x em microscópio óptico (NIKON, modelo Eclipse E2000).

3.16. Quantificação de Citocinas no sobrenadante de Cultura de Células do Lavado Peritoneal

A quantificação das citocinas foi realizada pelo método imunoenzimático ELISA, que se baseia no uso de placas de poliestireno com 96 orifícios recobertos pelo anticorpo monoclonal específico para a citocina que foi quantificada, conforme orientação do fabricante. Os kits utilizados foram da R&D Systems: IFN- γ (catálogo MIF00) e TNF- α (catálogo MTA00). As amostras foram adicionadas, em duplicata, aos orifícios das placas e incubados à temperatura ambiente por 2 h. Após 3 lavagens com tampão de lavagem foi adicionado o anticorpo policlonal conjugado com peroxidase, específico para cada uma das citocinas. As placas foram incubadas por 2 h, à temperatura ambiente, e a seguir foram realizadas 3 lavagens, sendo então adicionado o substrato, contendo H_2O_2 e tetrametilbenzidina. Após incubação à temperatura ambiente, por 20 min, foi adicionada a solução “stop” (ácido sulfúrico 2 N) para bloquear a reação. A atividade enzimática foi avaliada por leitura espectrofotométrica em 450nm. Os resultados foram expressos em pg/ml, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio.

3.17. Avaliação Histopatológica

As lâminas dos órgãos coradas pela HE foram submetidas à avaliação histopatológica e as lâminas coradas pela prata metenamina foram avaliadas para pesquisar a presença de fungos.

As lâminas do coxim plantar coradas pela HE foram avaliadas quanto às características do infiltrado inflamatório presente na derme, quantificando-se os elementos celulares, como segue: a presença de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas foi avaliada semi-quantitativamente em escala de 0-4 +, segundo: 0= ausente; 1= mínimo; 2= discreto; 3= moderado; 4= intenso. ^(60, 96) As lâminas coradas pela prata metenamina foram avaliadas quanto à presença de fungos, sendo o achado foi semi-quantificado em escala de 0 - 4 +, conforme descrito acima.

3.18. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados com assessoria do Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, com o uso do programa SAS for Windows, versão 9.2 para as análises estatísticas.

As comparações múltiplas entre os pesos corporais foram feitas através de composições de interações grupos x momentos utilizando o teste de Tukey ajustados a um modelo em medidas repetidas.

Para as variáveis: fígado, baço, viabilidade dos fungos e dosagens de H_2O_2 , O_2^- e NO, as comparações entre os grupos foram feitas por uma análise da variância seguida do teste de Tukey. O mesmo foi realizado para a contagem de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, mastócitos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas.

No caso dos dados da contagem de células totais, de macrófagos e do número de fungos, as comparações entre grupos foram feitas utilizando um modelo com distribuição de POISSON ou binominal negativa, em seguida o teste de Razão de Verossimilhança para as comparações múltiplas. O mesmo foi feito para comparações entre LPS, PHA, IFN- γ e TNF- α .

Em todos os testes foi utilizado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

As determinações do peso corpóreo, peso do fígado e baço e as determinações do perfil imunológico foram realizados nos camundongos BALB/c que receberam dieta normal e nos com restrição dietética; G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis.

Os animais dos grupos desnutridos foram submetidos previamente, por 20 dias, antes do início do estudo, à restrição dietética com oferta diária de 80% da quantidade ingerida pelos grupos não desnutridos.

Após instalada a desnutrição, os animais dos grupos G1 e G3 foram inoculados, com o fungo *L. loboi*, por via intradérmica, em ambos os coxins plantares traseiros e mantidos por 4 meses.

Depois deste período, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, foi realizado o lavado peritoneal e a necropsia para a retirada dos órgãos: fígado e baço. Os coxins plantares foram removidos para determinação da viabilidade e do número total de fungos, além do histopatológico.

Serão apresentados, a seguir, os resultados obtidos na determinação das variáveis nos quatro grupos de estudos.

4.1. Avaliações nutricionais

4.1.1. Pesos corpóreos dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo e os momentos da determinação.

O comportamento dos quatro grupos não foi similar ao longo do tempo. No momento inicial não houve diferença significativa entre os grupos de estudo. Após a pesagem inicial, os animais dos grupos G1 e G2 foram submetidos à restrição dietética, enquanto os animais dos grupos G3 e G4 receberam dieta normal. No momento da inoculação houve uma diminuição significativa de peso dos grupos G1 e G2 e um aumento significativo de peso dos grupos G3 e G4, quando comparado ao momento inicial de cada grupo. No momento final não houve diferença significativa de peso dos grupos G1 e G2, entretanto houve um aumento significativo de peso dos grupos G3 e G4, quando comparado ao momento da inoculação de cada grupo. Nos grupos G1 e G2 houve uma diferença significativa de peso nos momentos da inoculação e final quando comparado ao momento inicial. Nos grupos G3 e G4 houve uma diferença significativa de peso quando comparamos os três momentos. (Tabela 1 e Figura 1- Apêndice 1)

Tabela 1. Pesos corpóreos, em gramas, dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo e os momentos da determinação.

Grupos	Inicial		Inoculação		Final	
	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}$	s^2
G1	25,75	1,33 aA	21,37	1,18 bA	21,57	1,09 bA
G2	26,13	2,37 aA	21,28	1,89 bA	21,03	2,14 bA
G3	26,36	1,71 aA	27,83	1,72 bB	32,47	1,91 cB
G4	24,38	0,97 aA	27,63	1,63 bB	32,58	1,63 cB

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos sadios. $\bar{x}$: média e s^2 : desvio padrão. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra minúscula (linha) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra maiúscula (coluna) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

G1: inicial > inoculação e final. G2: inicial > inoculação e final. G3: inicial < inoculação < final. G4: inicial < inoculação < final.

Inicial: G1 = G2 = G3 = G4. Inoculação: G1 e G2 < G3 e G4. Final: G1 e G2 < G3 e G4.

4.1.2. Peso do fígado e baço dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

Houve interação significativa entre o efeito da dieta e os grupos de estudo. O peso do fígado e baço dos grupos desnutridos G1 e G2 revelou diferença significativa quando comparado aos grupos sem restrição alimentar G3 e G4 (Tabela 2, Figuras 2 e 3- Apêndice 1).

Tabela 2. Peso do fígado e baço, em gramas, dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

Grupos	Fígado		Baço	
	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}$	s^2
G1	1,08	0,18 A	0,07	0,02 A
G2	1,09	0,21 A	0,05	0,01 A
G3	1,76	0,30 B	0,14	0,03 B
G4	1,60	0,15 B	0,12	0,02 B

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos sadios. $\bar{x}$: média e s^2 : desvio padrão. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra maiúscula (coluna) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.
Fígado: G1 e G2 < G3 e G4. Baço: G1 e G2 < G3 e G4

4.1.3. Avaliação histopatológica dos órgãos dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

A análise histopatológica do fígado e baço não revelou diferenças significativas entre os grupos de estudo. Em concordância com o peso dos órgãos, os cortes histológicos do fígado revelaram atrofia de trabécula hepática nos grupos desnutridos (G1 e G2).

Nos dois grupos inoculados com o fungo *L. loboi* (G1 e G3) o fígado apresentou degeneração vacuolar e reatividade nuclear mais intensa em comparação aos não inoculados.

Os cortes histológicos do baço revelaram apenas congestão sinusoidal em todos os grupos.

Nos grupos inoculados com o *L. loboi* (G1 e G3), não foram encontrados fungos nos cortes histológicos do fígado e baço, corados pela prata metenamina.

4.2. Determinação da viabilidade e do número total de fungos dos coxins plantares dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo

Os animais dos dois grupos (G1 e G3) apresentaram os coxins plantares com lesões macroscópicas, que em geral, foi maior no grupo G3 (inoculados) em comparação ao grupo G1 (desnutrido e inoculados), conforme ilustrado na Figura 2.

A viabilidade e o número total de fungos do grupo G1 apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo G3 (Tabela 3, Figuras 4 e 5- Apêndice 2).

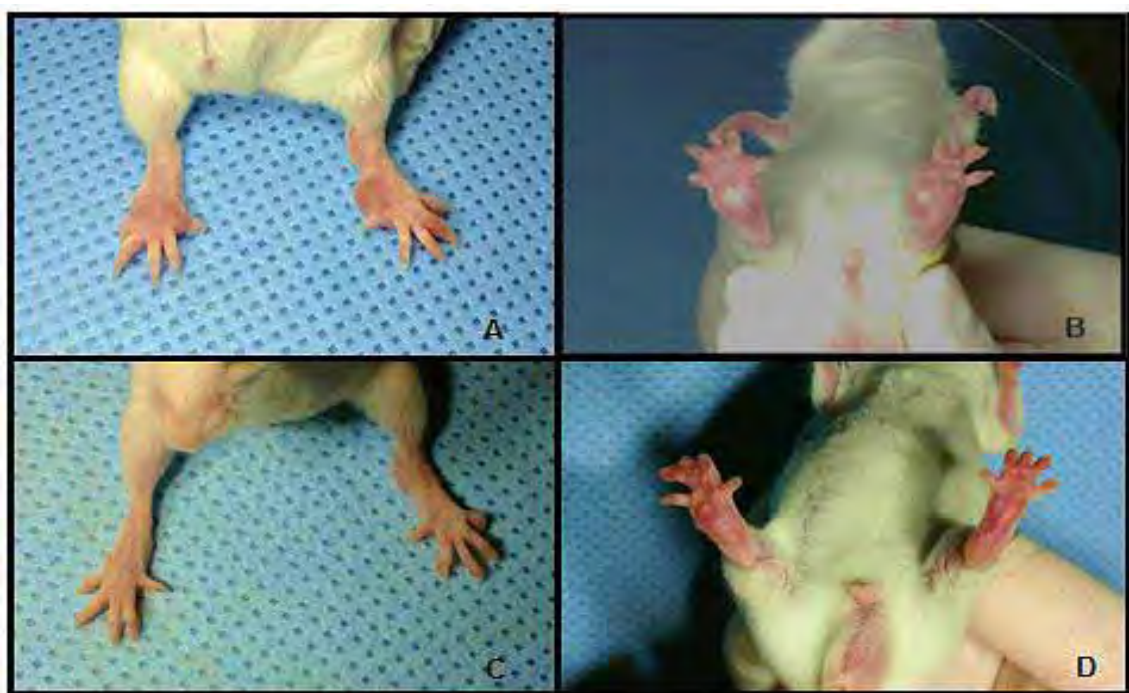


Figura 2. Lesão macroscópica do coxim plantar de camundongos inoculados com o fungo *Lacazia loboi*, aos 4 meses pós-inoculação. **A.B.** Camundongo do grupo inoculado (G3). **C.D.** Camundongo do grupo desnutrido inoculado.

Tabela 3. Viabilidade, em porcentagem, e números totais de fungos, x 10⁶/ml, obtidos do coxim plantar dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

Grupos	Número de fungos x 10 ⁶ / ml		Viabilidade (%)	
	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}$	s^2
G1	1,95	2,61 A	32,23	8,93 A
G3	3,22	2,41 B	41,8	5,56 B

G1: camundongos desnutridos inoculados e G3: camundongos inoculados. $\bar{x}$: média e s^2 : desvio padrão. Número de fungos: média e desvio padrão seguidos de mesma letra maiúscula (coluna) não diferem significativamente pelo Teste de Razão de Verossimilhança ao nível de 5%. Viabilidade: média e desvio padrão seguidos de mesma letra maiúscula (coluna) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

Número de fungos: G1 < G3. Viabilidade: G1 < G3.

4.3. Avaliação histopatológica dos coxins plantares dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo

A análise histopatológica dos coxins plantares de camundongos inoculados com *L. loboi*, independentemente da desnutrição protéico-calórica (G1 e G3), demonstrou padrão morfológico semelhante. Neste sentido, observou-se a presença de um infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos (4+) e células gigantes multinucleadas (CGM), tanto do tipo corpo estranho como do tipo Langhans, e numerosos fungos no interior de macrófagos e CGM, muitos deles com características morfológicas de viabilidade.

Nos camundongos inoculados e sem restrição alimentar (G3), os linfócitos estavam presentes em número discreto (2+) e encontravam-se dispersos entre macrófagos ou formavam pequenos acúmulos em torno de vasos e de macrófagos e CGM. Os neutrófilos estavam presentes em número moderado (3+), também dispersos pelo infiltrado ou se agregavam formando microabscessos. Em muitos campos havia alternância de áreas com mais linfócitos ou neutrófilos, entretanto, os neutrófilos sempre estavam presentes em maior número (Figuras 3 e 4).

Nos camundongos inoculados e com restrição alimentar (G1) observou-se que o infiltrado inflamatório era menor se comparado aos animais sem restrição alimentar (G3). Entretanto, nesses animais foi visto um aumento no número de linfócitos (3+), enquanto o número de neutrófilos não se alterou (3+). A distribuição das células foi semelhante tanto em animais sem restrição alimentar (G3) quanto naqueles com restrição (G1). Em ambos os grupos observou-se raros plasmócitos (Figuras 3 e 5).

Nos dois grupos estudados, houve um grande número de fungos nos coxins plantares, conforme ilustrado na Figura 6.

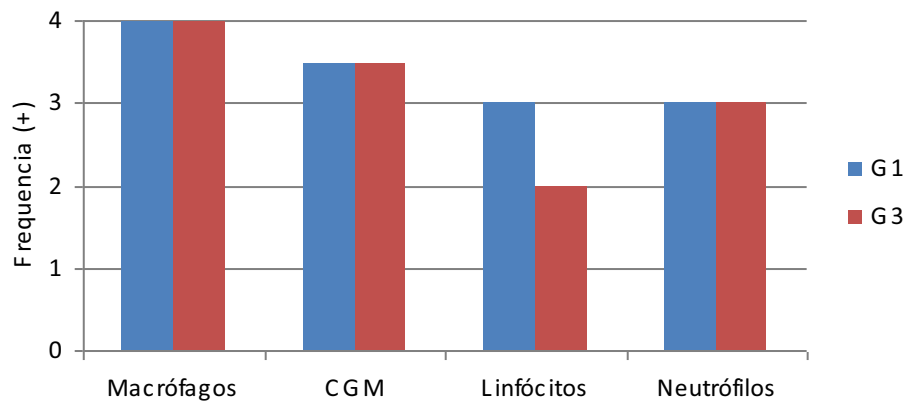


Figura 3. Frequência das células nos cortes histológicos do coxim plantar dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados e G3: camundongos inoculados.

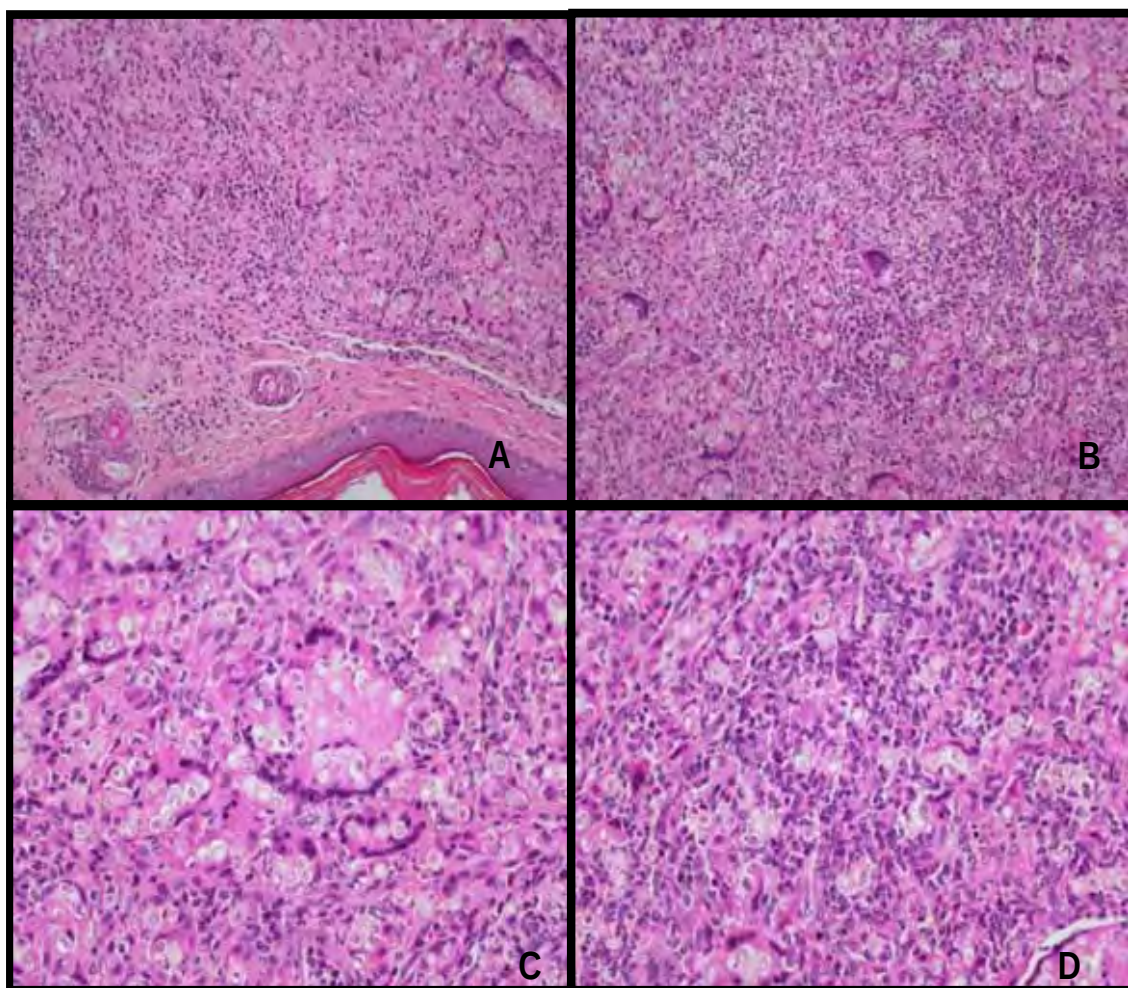


Figura 4. Aspecto histológico do coxim plantar de camundongos inoculados com *Lacazia loboi*, aos 4 meses pós-inoculação. Grupo inoculado (G3). **A.B.** Presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas (CGM) e numerosos fungos (HE, objetiva 20x). **C.** CGM com vários fungos no seu interior. **D.** Presença de neutrófilos (HE, objetiva 40x).

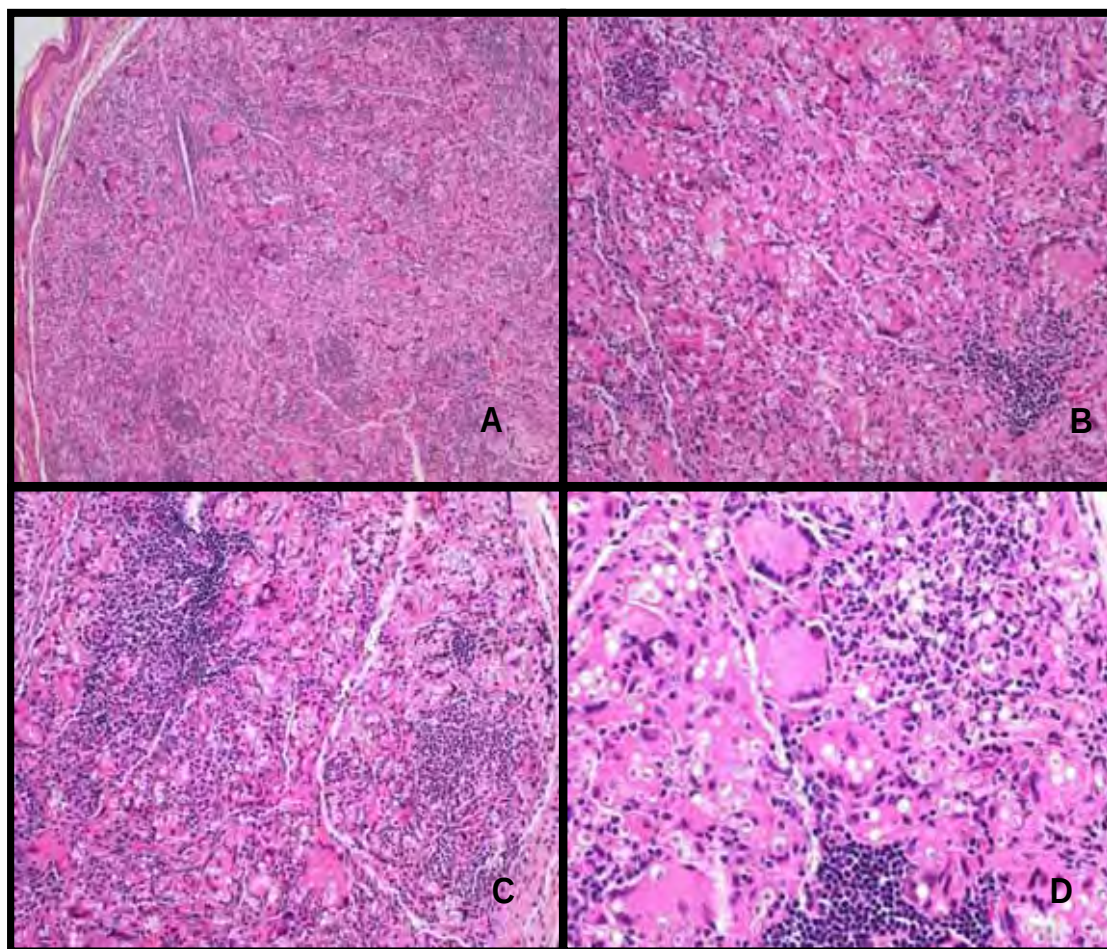


Figura 5. Aspecto histológico do coxim plantar de camundongos inoculados com *Lacazia loboi*, aos 4 meses pós-inoculação. Grupo desnutrido inoculado (G1). **A.B.** Presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas (CGM), fungos e agregados de linfócitos (HE, objetiva 20x). **C.** Focos de linfócitos (à esquerda) e de neutrófilos (à direita) **D.** Presença de neutrófilos, linfócitos e CGM (HE, objetiva 40x).

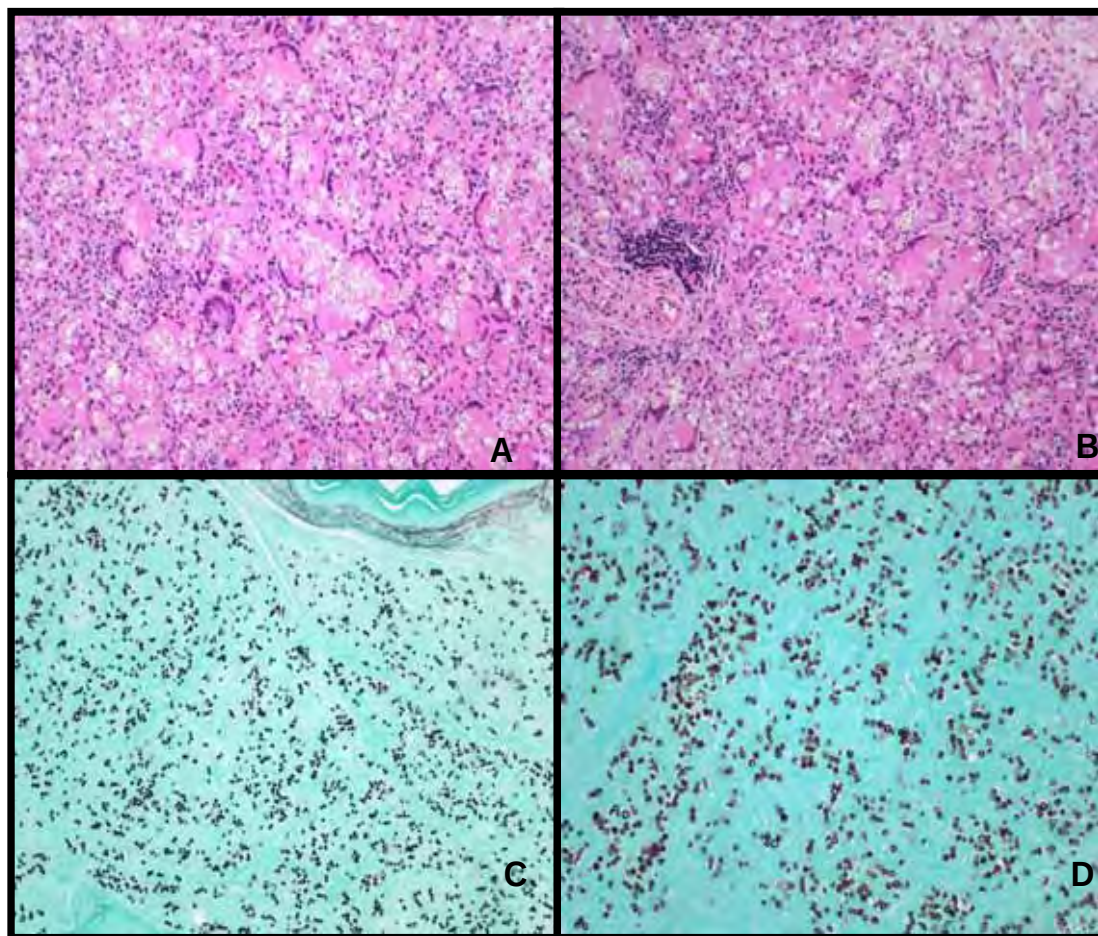


Figura 6. Aspecto histológico do coxim plantar de camundongos inoculados com *Lacazia loboi*, aos 4 meses pós-inoculação. **A.B.** Presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas (CGM) e numerosos fungos (HE, objetiva 20x). **C.D.** Presença de numerosos fungos corados pela prata metenamina com coloração de fundo verde-luz (C. objetiva 20x, D. objetiva 40x).

4.4. Contagem do número total de células e de macrófagos no lavado peritoneal dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

A contagem das células totais peritoneais revelou diferença significativa entre os grupos G2 e G3. Quanto ao número de macrófagos não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela 4 e Figura 6- Apêndice 3).

Tabela 4 - Contagem de células totais e macrófagos peritoneais, x 10⁶/ml, dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

Grupos	Células Totais x 10 ⁶ / ml		Macrófagos x 10 ⁶ / ml	
	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}$	s^2
G1	5,56	1,66 AB	2,77	0,90 A
G2	4,47	1,79 B	2,85	0,82 A
G3	6,61	2,83 A	3,17	1,32 A
G4	5,40	2,93 AB	2,90	1,47 A

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos sadios. $\bar{x}$: média e s^2 : desvio padrão. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra maiúscula (coluna) não diferem significativamente pelo Teste de Razão de Verossimilhança ao nível de 5%.

Células Totais: G3>G2. Macrófagos: G1=G2=G3=G4

4.5. Determinações dos metabólicos do oxigênio e do nitrogênio em cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

Os resultados da dosagem do H_2O_2 revelam que não houve diferença significativa entre PMA e CC nos grupos G2, G3 e G4, a diferença só foi encontrada no grupo G1. Houve diferença significativa na produção de H_2O_2 estimulada pelo PMA e não estimulada (CC) nos grupos desnutridos (G1 e G2) em comparação aos demais grupos (G3 e G4). Os resultados estão apresentados na Tabela 5 e Figura 7 do Apêndice 4.

A Tabela 5 e Figura 8 (Apêndice 4) ilustram os resultados da dosagem do O_2^- onde não houve diferença entre PMA e CC nos quatro grupos de estudos. Também não houve diferença significativa na produção de O_2^- em culturas estimuladas ou não com PMA em todos os grupos estudados.

A dosagem do NO revelou que houve diferença entre LPS e CC nos grupos G2, G3 e G4, entretanto no grupo G1 não houve diferença. Os grupos desnutridos G1 e G2 tiveram uma diferença significativa quando comparados aos grupos G3 e G4 nas culturas estimuladas com LPS, enquanto a produção espontânea de NO (CC) no grupo G4 diferiu significativamente dos demais grupos. Os resultados estão apresentados na Tabela 5 e Figura 9 do Apêndice 4.

Tabela 5 - Determinações dos metabólicos do oxigênio e do nitrogênio em cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

Grupos	H ₂ O ₂ (nM)			O ₂ ⁻ (nM)			NO (uM)		
	PMA $\bar{x}$	s^2	CC $\bar{x}$	PMA $\bar{x}$	s^2	CC $\bar{x}$	LPS $\bar{x}$	s^2	CC $\bar{x}$
G1	0,11	0,04 aA	0,03 0,02 bA	3,27	0,32 aA	3,23 0,25 aA	2,56	1,84 aA	1,02 0,97 aA
G2	0,13	0,12 aA	0,04 0,05 aA	3,24	0,29 aA	3,15 0,24 aA	2,62	3,10 aA	1,13 1,03 bA
G3	0,23	0,23 aB	0,16 0,20 aB	3,39	0,32 aA	3,33 0,25 aA	4,38	2,87 aB	0,89 0,94 bA
G4	0,33	0,20 aB	0,22 0,20 aB	3,25	0,18 aA	3,21 0,14 aA	6,63	5,88 aB	2,52 1,08 bB

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos sadios. PMA: forbol miristato acetato, LPS: Lipopolissacáride e CC: Cultura controle (produção espontânea). H₂O₂: Peróxido de hidrogênio; O₂⁻: Ânion superóxido e NO: Óxido nítrico. $\bar{x}$: média e s^2 : desvio padrão. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra maiúscula (coluna) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra minúscula (linha) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

H₂O₂: PMA>CC: G1; PMA=CC: G2,G3 e G4; PMA: G1 e G2 < G3 e G4; CC: G1 e G2 < G3 e G4.

O₂⁻: G1=G2=G3=G4. NO: LPS =CC: G1; LPS > CC: G2, G3 e G4; LPS: G1 e G2 < G3 e G4; CC: G4 > G1, G2 e G3

4.6. Contagem diferencial das células peritoneais dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

A contagem das células peritoneais nos grupos estudados revelou que a porcentagem de macrófagos no grupo G1 foi maior e estatisticamente significativa quando comparado ao grupo G2 e G4; a porcentagem de linfócitos no grupo G4 diferiu do grupo G1. A porcentagem de neutrófilos do grupo G2 diferiu significativamente dos outros grupos, enquanto a porcentagem de mastócitos e células gigantes multinucleadas não diferiram em todos os grupos estudados (Tabela 6 e Figura 6).

Tabela 6 – Contagem diferencial das células peritoneais dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

Grupos	Macrófagos $\bar{x}$ s^2	Linfócitos $\bar{x}$ s^2	Neutrófilos $\bar{x}$ s^2	Mastócitos $\bar{x}$ s^2	CGM $\bar{x}$ s^2
G1	75,57 2,88 A	10,86 2,48 A	8,28 2,56 A	3,43 1,13 A	1,86 0,69 A
G2	70,00 3,55 B	13,25 2,25 AB	11,37 2,56 B	3,37 0,74 A	2,00 1,07 A
G3	73,70 3,95 ABC	11,80 4,05 AB	6,50 1,90 A	4,60 1,35 A	3,40 1,78 A
G4	69,82 3,84 BC	15,27 2,41 B	8,00 1,67 A	3,82 0,98 A	3,09 1,38 A

CGM: Células gigantes multinucleadas. G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos sadios.
 $\bar{x}$: média e s^2 : desvio padrão. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra maiúscula (coluna) não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.
Macrófagos: G1 > G2 e G4
Linfócitos: G1< G4
Neutrófilos: G2 > G1, G3 e G4
Mastócitos: G1=G2=G3=G4.
CGM: G1=G2=G3=G4.

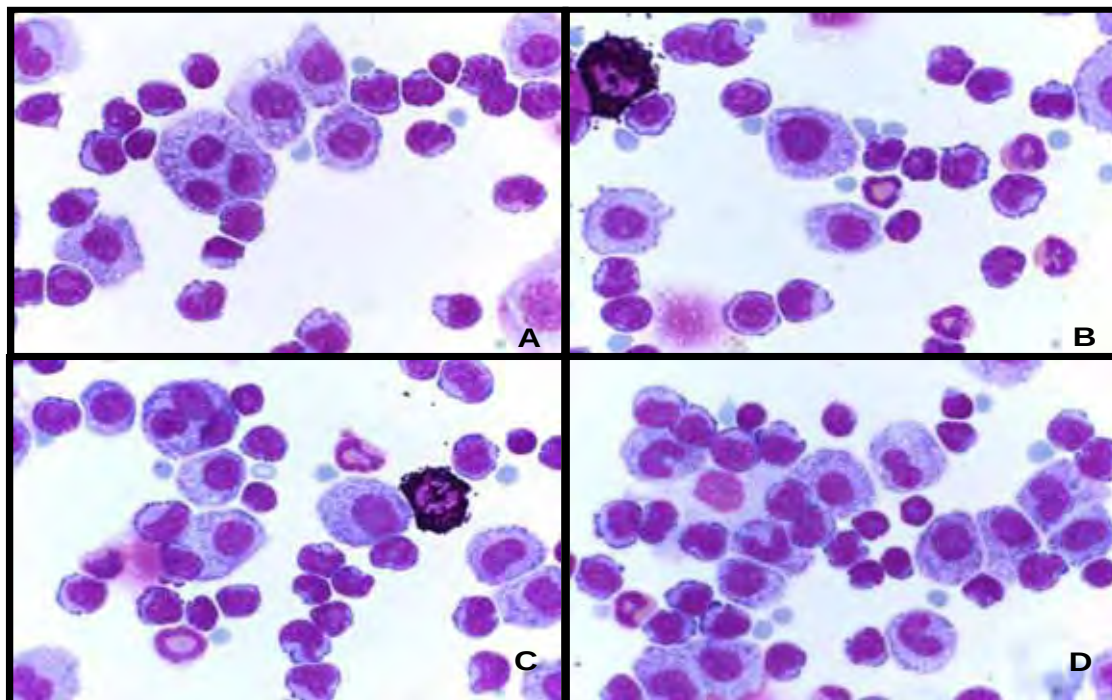


Figura 6. Células do lavado peritoneal submetidas à citocentrifugação e coradas por Giemsa de camundongos inoculados com *Lacazia loboi*, aos 4 meses pós-inoculação. **A.B.C.D.** Presença de macrófagos e linfócitos. **A.C.** Presença de célula gigante multinucleada. **B.C.** Presença de mastócito. **B.C.D.** Presença de neutrófilos (objetiva 100x).

4.7. Quantificações dos níveis de IFN- γ e TNF- α

A Tabela 7 e Figuras 10 e 11 do Apêndice 5 mostram os resultados da quantificação dos níveis das citocinas TNF- α e IFN- γ em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais e de célula totais, respectivamente.

Os resultados da quantificação de TNF- α revelam que houve diferença entre LPS e CC em todos os grupos estudados. Houve diferença significativa na produção de TNF- α em culturas estimuladas com LPS nos quatro grupos, enquanto que em culturas não estimuladas (CC) apenas os grupos G1 e G4 diferiram dos demais.

A quantificação do IFN- γ revelou que houve diferença entre PHA e CC em todos os grupos estudados. Os níveis de IFN- γ em culturas estimuladas ou não com PHA apresentaram diferenças significativas no grupo G4 em comparação aos demais grupos.

Tabela 7 - Quantificação de TNF- α e IFN- γ , pg/ml, em camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

Grupos	TNF- α (pg/ml)				IFN- γ (pg/ml)			
	LPS		CC		PHA		CC	
	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}$	s^2
G1	857	41,04 aA	349	51,64 bA	363	196,99 aA	145	62,57 bA
G2	430	54,93 aB	224	46,63 bB	283	174,84 aA	147	82,42 bA
G3	586	60,90 aC	244	21,76 bBC	320	162,31 aA	119	49,33 bA
G4	76	8,59 aD	40	3,91 bD	93	5,44 aB	48	6,95 bB

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. $\bar{x}$: média e s^2 : desvio padrão. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra minúscula (linha) não diferem significativamente pelo Teste de Razão de Verossimilhança ao nível de 5%. Média e desvio padrão seguidos de mesma letra maiúscula (coluna) não diferem significativamente pelo Teste de Razão de Verossimilhança ao nível de 5%.

TNF- α : LPS x CC: todos diferem. LPS: todos diferem. CC: G 1>G2,G3eG4; G2=G3, G4<G1,G2 e G3.

IFN- γ : PHA x CC: todos diferem. PHA e CC: G1, G2 e G3 > G4.

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

A doença de Jorge Lobo é micose rara, que ocorre predominantemente na região amazônica brasileira, causada pelo fungo *L. loboi*. São poucos os estudos que avaliam as alterações imunológicas do paciente portador dessa micose, e também não se conhecem os fatores relacionados à predisposição ou à proteção ao aparecimento da doença nos indivíduos afetados.^(34,35) Além disso, não existe nenhum estudo avaliando as alterações nutricionais nesta micose.

Os estudos da doença de Jorge Lobo são escassos possivelmente pelo fato do seu agente etiológico não ter sido cultivado em meios artificiais e na ausência deles, um modelo animal que pudesse reproduzir a doença e também servir de fonte para obtenção de grandes quantidades de fungos, seria altamente desejável. Neste sentido, Madeira et al.⁽⁷⁵⁾ concluíram que o camundongo BALB/c é mais susceptível à infecção e deste modo, essa linhagem tornou-se modelo experimental para o estudo da doença de Jorge Lobo. Com a existência desse modelo tornou-se possível compreender melhor os mecanismos de patogenicidade do fungo e também estudar os aspectos microbiológicos, imunológicos, bioquímicos e terapêuticos. Porém, até o momento não existem estudos sobre a participação do estado nutricional na resposta imunológica abordando a doença de Jorge Lobo, sendo assim, este estudo tem por finalidade avaliar os efeitos da DPC na resposta imune de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c inoculados com *L. loboi*, empregando parâmetros imunológicos e histopatológicos.

A desnutrição tem sido caracterizada como a principal causa de imunossupressão adquirida no mundo. Como consequência da DPC, alterações imunológicas são observadas, incluindo redução na resposta imune humoral e celular. Observa-se, também, alta incidência na morbidade e mortalidade por infecções.⁽⁷⁻⁹⁾

Alterações nutricionais têm sido descritas como potencial patogênico de agentes infecciosos em várias patologias. Qualquer alteração no hospedeiro, que desencadeie imunodepressão significativa, pode ser responsável por recrudescimento de infecções.^(10,15-17)

O impacto da desnutrição no sistema imune tem sido demonstrado tanto clinicamente como em estudos experimentais em várias patologias.⁽²⁶⁻³²⁾ Esses relatos sugerem que o estado nutricional pode interferir na resposta imune, e assim exercer efeito na evolução das infecções.

O presente estudo foi iniciado pelo estabelecimento de um modelo experimental de desnutrição, previamente realizado em várias pesquisas. ^(27,31,32,97,98) Foi realizado um projeto piloto para verificação da sobrevivência dos animais com a desnutrição por 4 meses e com resultados positivos, realizamos o projeto definitivo.

O peso corporal é um dos indicadores mais utilizados para avaliação do estado nutricional. ⁽⁹⁹⁾ O grau de comprometimento nutricional avaliado pelo peso corpóreo dos animais mostrou alterações significantes na comparação entre os grupos. Observou-se que a infecção pelo *L. loboi* não exerceu grande influência no peso corporal dos camundongos que recebiam dieta normal, quando comparados com o grupo controle, sendo assim ambos os grupos infectados apresentaram comportamento semelhante ao dos seus respectivos controles. O peso corpóreo é a soma de todos os componentes de cada nível da composição corporal. É uma medida aproximada das reservas totais de energia do corpo e mudanças no mesmo podem refletir alterações no equilíbrio de energia, proteínas e tem grande valor no acompanhamento e prognóstico de infecções. ⁽⁹⁹⁾

Vários relatos da literatura têm descrito o papel do processo infeccioso no organismo, que costuma ser acompanhado por hipercatabolismo, agravado por anorexia, resultando na perda de reservas corpóreas, ⁽²⁻⁴⁾ mas no presente estudo esse agravo não foi encontrado, talvez pelo fato da doença de Jorge Lobo comprometer apenas a região cutânea-subcutânea da pele.

De acordo com Abreu et al. ⁽¹⁰⁰⁾, a DPC é causa de várias manifestações clínicas, porém as alterações mais aparentes são aquelas que se verificam nas medidas e na massa, tanto do corpo como um todo, quanto dos diversos órgãos.

O fígado e baço tem participações importantes, tanto no processo nutricional, quanto no infeccioso. Na DPC, alterações histológicas, bem como o peso desse órgão, podem refletir mudanças nutricionais. ^(101,102)

Nesse sentido, no presente estudo, os animais foram sacrificados e retirados o fígado e o baço para verificação do peso e análise histológica desses órgãos. Em relação ao peso do fígado e baço dos grupos desnutridos, os resultados revelaram redução de peso quando comparados aos grupos sem restrição alimentar, conforme relatos na literatura de outras patologias. ⁽¹⁰³⁻¹⁰⁶⁾

No estudo realizado por Pereira ⁽⁹⁷⁾, observou-se que a toxoplasmose aguda não interferiu no peso do fígado e baço nos animais que receberam dieta normal quando

comparados com o grupo controle. Por outro lado, nos animais submetidos à desnutrição prévia e infectados com toxoplasmose, tratados ou não com sulfa, houve aumento no peso do fígado e do baço.

Estudos realizados por Couto et al.⁽¹⁰⁶⁾ sobre as alterações da função hepática em camundongos com esquistossomose associada à desnutrição verificaram que ambas, infecção e/ou desnutrição, interferiram nos níveis dos indicadores bioquímicos, mas as alterações mais importantes da função hepática ocorreram durante a inflamação intensa causada pela esquistossomose.

Na desnutrição, a deterioração fisiológica está em consonância com seu grau e o fígado e baço tornam-se quase sempre afetados. A necrose hepática e fibrose podem ser observadas em estudos experimentais com animais submetidos à dietas com redução de proteínas e aminoácidos essenciais.⁽¹⁰⁶⁾

Em relação à análise histopatológica do fígado, estudos desenvolvidos por Oliveira et al.⁽¹⁰²⁾ e Coutinho et al.⁽¹⁰⁷⁾ mostraram que a má nutrição afeta vários mecanismos de regeneração, como a diminuição da proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e albumina e que o estado nutricional do hospedeiro tem papel importante modificando os tecidos conectivos na esquistossomose hepática murina.

No presente estudo a análise histopatológica do baço revelou apenas congestão sinusoidal em todos os grupos. A análise do fígado mostrou que os grupos inoculados apresentaram degeneração vacuolar e reatividade nuclear mais intensa. A maior diferença encontrada foi em relação ao peso dos órgãos entre os grupos nutridos e desnutridos, talvez pelo fato da presença de atrofia de trabécula hepática no grupo desnutrido. Devido ao fato da desnutrição ser crônica e o fungo causador da doença de Jorge Lobo não se disseminar para outros órgãos, os cortes histológicos corados pela prata metenamina não revelaram a presença de fungos em fígado e baço, sendo provável que não se observem muitos danos nos órgãos citados acima.

Estudos realizados por Pereira⁽⁹⁷⁾ em animais infectados com *Toxoplasma gondii* revelou na análise histopatológica do fígado degeneração gordurosa nos espaços porta e centro lobular, com infiltrado mononuclear multifocal e difuso nos animais nutridos infectados a partir do 2º dia de experimento e nos desnutridos infectados, essas alterações foram mais evidentes. O baço mostrou atrofia nos animais desnutridos e nutridos infectados com *T. gondii*, em decorrência da rarefação da polpa branca, principalmente, e também da polpa vermelha.

No presente estudo, outro aspecto importante a ser ressaltado, é a do coxim plantar, que foram removidos para determinação da viabilidade e do número total de fungos, além do histopatológico. O índice de viabilidade fúngica foi avaliado por meio da coloração vital com diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo (DF-BE), padronizada para o *L. loboi* por Vilani-Moreno & Opromolla.⁽⁵³⁾

A determinação do índice de viabilidade de microrganismos é importante nas tentativas de reprodução experimental das doenças infecciosas. Vários métodos podem ser empregados, porém a coloração DF-BE é um dos mais comumente utilizados. Em 1978, Calich et al.⁽¹⁰⁸⁾ utilizaram esse método para detecção da viabilidade de células fúngicas leveduriformes como *Candida sp.*, *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*.

A viabilidade e o número total de fungos encontrados nos coxins plantares dos camundongos inoculados revelaram aumento nos camundongos nutridos quando comparados com os camundongos desnutridos. Como não existe outro estudo relacionando desnutrição e doença de Jorge Lobo, as comparações dos nossos resultados com outras pesquisas ficam restritas somente a camundongos inoculados sem restrição dietética.

Estudos realizados por Madeira et al.⁽⁷⁵⁾ com camundongos BALB/c e Vilani-Moreno & Opromolla⁽⁵³⁾ em lesões cutâneas de pacientes revelaram índices de viabilidade semelhantes aos encontrados no nosso estudo. Do mesmo modo, pesquisa realizada por Belone et al.⁽⁷⁷⁾ com camundongos inoculados com *L. loboi* revelou que o número de fungos recuperados aos 4 meses pós-inoculação era semelhante ao nosso.

Em relação à análise histopatológica dos coxins plantares observamos aumento do infiltrado inflamatório no grupo nutrido em relação ao grupo desnutrido. Esses achados são extremamente importantes e levam a hipótese de que a desnutrição na doença de Jorge Lobo pode causar certa resistência ao desenvolvimento do fungo, observados pela menor viabilidade, número total de fungos e redução do tamanho dos coxins encontrados no grupo desnutrido.

As infecções agudas ocasionam respostas ao estresse causado no organismo, desencadeando alterações metabólicas com finalidade de fortalecer o hospedeiro no combate ao agressor. O aumento da demanda energética e o hipercatabolismo, associados à menor ingestão de nutrientes, podem agravar o processo infeccioso⁽²⁻⁴⁾, o

que não ocorreu no nosso estudo, talvez pelo fato da doença de Jorge Lobo comprometer apenas a região cutânea-subcutânea da pele.

Sabe-se que em indivíduos doentes e desnutridos ocorre menor capacidade na formação de anticorpos específicos, redução da atividade fagocitária, alteração na integridade dos tecidos, redução ou falta de secreção de muco, alteração de microbiota nutricional, nas reações inflamatórias, entre outras. A desnutrição causa desestruturação nos sistemas de defesa do hospedeiro em responder ao estímulo do processo infeccioso, podendo, assim, ser responsável por desde infecção assintomática, até doenças graves. (7-14)

Segundo Ghosn et al. ⁽¹⁰⁹⁾ a cavidade peritoneal é um compartimento com uma variedade de células imunológicas residentes, no qual os macrófagos são muito estudados. Um estudo experimental realizado por Bhaumik et al. ⁽¹¹⁰⁾, em ratos inoculados com tumor AK-5, via subcutânea, revelou que houve um influxo de células imunes na cavidade peritoneal, hiperativação de macrófagos peritoneais e níveis elevados de citocinas, NO e O_2^- . À medida que o tumor regredia, a quantidade de macrófagos ativados da cavidade peritoneal também diminuía. Segundo os autores, não está claro como o tumor sólido é capaz de induzir aumento na população celular do peritônio; eles sugerem que substâncias quimiotáticas para monócitos e proteínas da matrix extracelular poderiam atrair e ativar os macrófagos peritoneais. ⁽¹¹⁰⁾ Por esse motivo empregamos as células do lavado peritoneal para avaliar a resposta imune dos animais submetidos ou não a desnutrição e inoculados com o *L. loboi*.

A contagem de células totais do lavado peritoneal revelou-se superior no grupo inoculado quando comparado com o grupo desnutrido não inoculado e a contagem dos macrófagos foi semelhante nos quatro grupos estudados.

Os macrófagos produzem e secretam várias substâncias biologicamente importantes para as respostas inflamatória e imune, como citocinas, enzimas, metabólitos do ácido aracdônico, componentes do sistema complemento, reativos intermediários do oxigênio (RIO) e do nitrogênio (RIN). ⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾

Os macrófagos ao serem ativados apresentam uma série de alterações morfológicas, funcionais e metabólicas quando comparados aos não ativados. ⁽¹¹⁴⁾ Funcionalmente, ocorre a explosão respiratória, resultando em aumento no consumo de oxigênio e na geração dos RIO, como a H_2O_2 e O_2^- , além disso, ocorre maior expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e produção dos RIN, como o NO,

esses reativos antimicrobianos são importantes na eliminação de patógenos. ^(112,114) O NO desempenha importante papel na função vascular durante as respostas inflamatórias, reduzindo a agregação e aderência plaquetárias, inibindo a inflamação induzidas por mastócitos e servindo como regulador do recrutamento de leucócitos. ⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾

As dosagens de H_2O_2 , O_2^- e NO são importantes para avaliar os sistemas bioquímicos antimicrobianos dos fagócitos mononucleares, que são de vital importância na defesa do organismo contra as infecções e na eliminação dos patógenos. Elas podem ser empregadas, também, como parâmetros de ativação dos macrófagos, uma vez que macrófagos ativados exibem aumento da liberação dos RIO e RIN. ⁽¹¹¹⁻¹¹⁷⁾

Na quantificação dos metabólitos do oxigênio emprega-se como estímulo o ester de forbol (PMA). Esse agente ativa a proteína quinase C, uma enzima dependente de íons Ca_2^+ e fosfolípidos, amplamente distribuída em vários tipos celulares, levando deste modo, a explosão respiratória com consequente produção de metabólitos tóxicos do oxigênio, como a H_2O_2 . ^(112, 113)

Os nossos resultados revelaram que a desnutrição exerceu grande influência sobre a dosagem de H_2O_2 e NO, uma vez que no grupo desnutrido houve menor produção desses metabólitos em comparação ao grupo nutrido; entretanto o processo infeccioso não estimulou maior liberação de H_2O_2 e NO, pois não houve diferença entre camundongos infectados e sadios, assim como desnutridos infectados e desnutridos. A dosagem de O_2^- não foi diferente nos grupos estudados. Há necessidade de outros estudos relacionando desnutrição e doença de Jorge Lobo, para comparação dos nossos resultados, já que ficam restritas somente a outras patologias.

Ainda não são conhecidos os mecanismos pelos quais os macrófagos lisam o *L. loboi*. Estudos realizados por Taborda et al. ⁽⁴⁸⁾ relataram que o fungo possui na sua parede celular melanina constitutiva, o que poderia lhe conferir resistência aos RIO produzidos pelos macrófagos. Ao que parece, células melanizadas são menos suscetíveis a morte pelos RIO e RIN que células não melanizadas. Este pigmento parece estar associado com virulência fúngica, resistência ao ataque microbiano e maior sobrevivência sob condições de estresse ^(118,119)

Os mecanismos microbicidas e de ativação macrofágica têm sido intensamente explorados. Estudos realizados por Nathan et al. ⁽¹²⁰⁾ descreveram que a capacidade de macrófagos murinos em destruir ou inibir a replicação intracelular de parasitas como *T.*

gondii e *Trypanosoma Cruzi* dependia do grau de ativação macrofágica e correlacionava-se diretamente com a liberação dos ROI, como a H_2O_2 .

Pesquisadores demonstraram que na hanseníase, o *Mycobacterium leprae* parece apresentar uma capacidade inata para resistir aos efeitos tóxicos dos RIO, pois a presença da enzima superóxido dismutase, no interior do bacilo, juntamente com o glicolípido fenólico-1 (PGL-1), componente da sua parede celular, atuam como inibidores do O_2^- .^(121,122)

Por outro lado, um estudo desenvolvido com animais deficientes em iNOS permitiu conhecer alguns aspectos envolvidos na patogenia da esquistossomose aguda, relacionando também o óxido nítrico com a desnutrição e a esquistossomose.⁽¹⁰³⁾ A iNOS está presente em todas as células e é expressa em resposta as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β), liberando prolongadas taxas de NO, que vão atuar na esquistossomose como um regulador da resposta inflamatória. Na ausência dessa enzima, o NO em taxas reduzidas poderá comprometer a formação do granuloma esquistossomótico e associado ao estado nutricional mostrou resultados decorrente da associação, iNOS x desnutrição.⁽¹⁰³⁾

Na esquistossomose, o NO é importante para o hospedeiro não somente devido às suas características antimicrobianas, mas também servindo como um potente mediador inflamatório e antifibrótico.⁽¹²³⁾

Na Paracoccidiodomicose, um estudo realizado por Balderramas⁽¹²⁴⁾ revelou que a quantificação de NO em macrófagos pulmonares de camundongos AIRmax e AIRmin infectados com *P. brasiliensis*, foi maior em comparação ao seus respectivos controles. Em nosso estudo, a produção de NO foi menor nos animais desnutridos em comparação aos nutridos, independentemente do processo infeccioso, sugerindo que a desnutrição afeta a produção desses metabólitos.

A atividade microbicida dos macrófagos pode ser aumentada por determinadas citocinas, como o IFN- γ e os fatores estimuladores de colônia. O IFN- γ aumenta a capacidade de geração da explosão respiratória por macrófagos, sendo que a estimulação do metabolismo oxidativo promove maior atividade microbicida contra uma grande variedade de patógenos intracelulares.^(112,113,125) Além disso, o IFN- γ também estimula a expressão da enzima iNOS, essencial para a formação do NO.^(112,113,125) Fato esse não encontrado no nosso estudo, onde os grupos desnutridos apresentaram uma diminuição na produção de NO e um aumento na produção de IFN- γ ,

quando comparados ao grupo sadio. Nossos resultados são semelhantes aos descritos por Anstead et al. ^(126,127) que ao avaliarem a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos desnutridos inoculados por *Leishmania donovani* encontraram menor produção desse metabólito nos animais desnutridos quando comparados ao grupo sadio.

As citocinas interagem com seus receptores específicos modulando a função macrofágica. Deste modo, citocinas como o IFN- γ , TNF- α , interleucina-2 (IL-2), fator estimulador de colônia de monócito (MCSF) e fator estimulador de colônia de monócito/granulócito (GM-CSF) são importantes no processo de ativação macrofágica, enquanto que outras, como a interleucina-10 (IL-10) e o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) são considerados fatores de desativação dos macrófagos. ^(112, 113,128,129) As citocinas pró-inflamatórias, de perfil Th1, TNF- α e INF- γ foram utilizadas neste trabalho como marcadores na avaliação da desnutrição e do processo infeccioso causado pelo *L. loboi* apesar de algumas pesquisas sugerirem perfil Th2 para essa doença. ^(86,89-91)

O TNF- α apresenta atividades biológicas diversificadas, isto é, induz a produção de citocinas e a expressão de receptores para IL-2 pelos linfócitos T, aumenta a produção de anticorpos e promove a proliferação dos linfócitos B, atua como quimiotático para monócitos-macrófagos e induz a produção de IL-1, interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) pelos macrófagos. ^(112,113,128,129) A produção e liberação excessiva TNF- α tem sido associada com evolução de caquexia, observada em pacientes com infecção aguda. ⁽²³⁾

O INF- γ é a citocina mais importante na ativação de macrófagos e conseqüentemente da imunidade celular. O INF- γ estimula a apresentação antigênica, a produção de citocinas, a fagocitose e secreção dos RIO e RIN. Deste modo, esta citocina aumenta a atividade microbicida dos macrófagos. ^(111,112,128,129)

Um fato interessante é que, segundo Lyons ⁽¹³⁰⁾, o aumento da produção de IFN- γ está comumente associado com o aumento de mediadores inflamatórios, que sofrem sinergismo com NO e potencializam seus efeitos. Desta forma, a partir do presente estudo, era esperado que a alta produção de IFN- γ nos camundongos desnutridos influenciasse a alta produção de NO, fato esse não ocorrido e a alta produção de IFN- γ pelo grupo nutrido inoculado aumentasse a produção do NO. No grupo sadio, entretanto, ocorreu uma diminuição de IFN- γ e um aumento de NO.

Estudo realizado por Silva ⁽¹⁰⁴⁾ com animais desnutridos e nutridos inoculados com *S. mansoni*, revelou que os animais nutridos mostraram níveis mais elevados de IL-13 do que IFN- γ indicando perfil Th2. Os camundongos desnutridos produziram níveis mais elevados de IFN- γ do que IL-13, caracterizando um perfil Th1. Os nossos resultados revelaram que os níveis de IFN- γ foram semelhantes nos animais desnutridos (G1 e G2) e nutridos (G3), a diferença só foi encontrada no grupo sadio, que produziram níveis menores de IFN- γ .

Estudo realizado por Nascimento et al ⁽¹³¹⁾ com animais inoculados com *P. brasiliensis*, revelou que macrófagos peritoneais de camundongos resistentes (A/Sn) secretam altos níveis de NO e baixos de TNF- α , enquanto que macrófagos de animais suscetíveis (B10.A) fazem o contrário. Os nossos resultados revelaram que camundongos nutridos e inoculados secretaram altos níveis de NO e baixos de TNF- α , em comparação quando comparamos aos camundongos desnutridos inoculados, semelhantes aos resultados obtidos por Nascimento et al ⁽¹³¹⁾ nos animais A/Sn.

Trabalho realizado por Goto ⁽¹³²⁾ com animais BALB/c inoculados com *T. cruzi* submetidos ou não a desnutrição, revelou que houve um aumento significativo na produção das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 e IL-6 nos camundongos desnutridos, revelando uma grande interação entre desnutrição, processo infeccioso agudo, causado pelo parasita, e resposta imune. Os nossos resultados foram semelhantes em relação os níveis de TNF- α .

Vilani-Moreno et al. ⁽⁸⁶⁾ não encontraram alterações significativas nos níveis de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-10 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares dos pacientes em relação ao grupo controle. Entretanto, a quantificação de IL-4 e IL-6 revelou maior produção, mas para IL-2 os níveis apresentaram-se menores, sugerindo que pacientes com doença de Jorge Lobo exibem um predomínio de perfil Th2. Comparando com o nosso estudo observamos que o TNF- α apresentou alterações significativas com elevação em relação aos grupos estudados. Cabe salientar que o trabalho acima citado foi realizado com humanos e o nosso com camundongos e que ainda não existem estudos na literatura com animais, relacionando a doença de Jorge Lobo, nutrição e imunologia.

Recentemente, Vilani-Moreno et al. ⁽⁹¹⁾ investigaram a presença das citocinas IL-10, TGF- β 1 e TNF- α e da enzima iNOS nas lesões cutâneas de 16 pacientes portadores da micose, por método imunoistoquímico. Os resultados revelaram que o TGF- β 1 foi a

citocina expressa com maior frequência pelas células presentes no infiltrado inflamatório, seguido pela IL-10; houve discreta positividade de células expressando TNF- α e iNOS. Esses resultados levaram os autores a sugerirem que a presença de citocinas imunossupressoras nas lesões dos pacientes poderia ser responsável pela não contenção do patógeno, evidenciado pela presença de numerosos fungos no granuloma. Esses dados divergem com o nosso estudo, onde observamos que o TNF- α apresentou alterações significativas com elevação em relação ao grupo controle, embora as citocinas do trabalho foram quantificadas nas lesões cutâneas e as nossas foram dosadas em sobrenadante de cultura de células do lavado peritoneal. É possível que as células do lavado peritoneal não estejam refletindo o que está acontecendo no coxim plantar dos animais estudados.

Portanto, observamos que a infecção não exerceu grande influência sobre a perda de peso e que a desnutrição prévia foi um fator desfavorável à viabilidade, ao número de fungos e ao infiltrado inflamatório do coxim plantar. A produção de H₂O₂ e NO ficaram reduzidas nos animais desnutridos. A dosagem de O₂⁻ não foi diferente nos grupos estudados. Outro fator importante foi a elevação marcante das citocinas, tanto TNF- α e IFN- γ , quando comparamos o grupo sadio com os demais, essas elevações ficaram maior quando associamos desnutrição e infecção, particularmente para TNF- α .

Em resumo, podemos ressaltar que existe grande interação entre a doença de Jorge Lobo, nutrição e imunidade e que levando em consideração o fato dos pacientes possuírem baixas condições socioeconômicas e talvez apresentarem provável carência nutricional, são necessários novos estudos em humanos para poder conhecer melhor essa interação entre a doença de Jorge Lobo, nutrição e imunidade com outros marcadores imunológicos e nutricionais, o que possibilitará um maior entendimento dessa complexa doença.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A finalidade desse estudo foi avaliar os efeitos da DPC na resposta imune de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c inoculados com *L. loboi*, empregando parâmetros imunológicos e histopatológicos.

Sendo assim, a análise dos resultados obtidos neste estudo permitiu elaborar as seguintes conclusões:

Observamos que a infecção pelo *L. loboi* não exerceu grande influência no peso corporal dos camundongos que recebiam dieta normal, quando comparados com o grupo controle, sendo assim ambos os grupos infectados apresentaram comportamento semelhante ao dos seus respectivos controles.

Em relação ao peso do fígado e baço dos grupos desnutridos verificamos redução de peso em comparação aos grupos sem restrição alimentar, fato esse já esperado. A análise histopatológica do baço revelou apenas congestão sinusoidal em todos os grupos. A análise do fígado mostrou que os grupos inoculados apresentaram degeneração vacuolar e reatividade nuclear mais intensa. A maior diferença encontrada foi em relação ao peso dos órgãos entre os grupos nutridos e desnutridos, devido à presença de atrofia de trabécula hepática no grupo desnutrido. Como a desnutrição é crônica e o fungo causador da doença de Jorge Lobo não se dissemina para outros órgãos, talvez sejam esses fatos de não haver muito dano nos órgãos citados acima.

A viabilidade e o número total de fungos encontrados nos coxins plantares dos camundongos inoculados revelaram aumento nos camundongos nutridos quando comparados com os camundongos desnutridos. Em relação à análise histopatológica dos coxins plantares observamos aumento do infiltrado inflamatório no grupo nutrido em relação ao grupo desnutrido, em concordância com a menor viabilidade, número total de fungos e redução do tamanho dos coxins encontrados nos desnutridos.

Os nossos resultados revelaram que a desnutrição exerceu grande influência sobre a dosagem de H_2O_2 e NO, uma vez que no grupo desnutrido houve menor produção desses metabólitos em comparação ao grupo nutrido; entretanto o processo infeccioso não estimulou maior liberação de H_2O_2 e NO, pois não houve diferença entre camundongos infectados e saudáveis, assim como desnutridos infectados e desnutridos. A dosagem de O_2^- não foi diferente nos grupos estudados.

Os grupos desnutridos apresentaram diminuição na produção de NO e um aumento na produção de IFN- γ , quando comparados ao grupo sadio. Desta forma, era esperado que a alta produção de IFN- γ nos camundongos desnutridos influenciasse a maior produção de NO, fato esse não ocorrido. No grupo nutrido e infectado a produção de IFN- γ foi maior que seu respectivo controle, entretanto a produção espontânea de NO foi menor. Observamos que o TNF- α apresentou alterações significativas em relação aos grupos estudados, com maiores níveis no grupo desnutrido inoculado em comparação ao seu controle, assim como níveis elevados no grupo inoculado em relação aos sadios.

Como não existem estudos relacionando desnutrição e doença de Jorge Lobo, e também talvez pelo fato dessa doença comprometer apenas a região cutânea-subcutânea da pele, as comparações dos nossos resultados com outras pesquisas ficam restritas somente a outras patologias.

Em resumo, podemos ressaltar que existe grande interação entre a doença de Jorge Lobo, nutrição e imunidade e que levando em consideração o fato dos pacientes possuírem baixas condições socioeconômicas e talvez apresentarem provável carência nutricional, são necessários novos estudos em humanos para poder conhecer melhor essa interação entre a doença de Jorge Lobo, nutrição e imunidade com outros marcadores imunológicos e nutricionais, o que possibilitará um maior entendimento dessa complexa doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS*

- 1- Hughes S, Kelly P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. *Parasite Immunol.* 2006; 28: 577-88.
- 2- Pereira PCM, Burini PC. Resposta do hospedeiro à infecção. Sistema de defesa e mediadores químicos. *Arq Bras Med.* 1991; 65: 403-10.
- 3- Pereira PCM. Interação entre infecção, nutrição e imunidade na medicina tropical. In: Cimenan S, Cimerman B. *Medicina Tropical.* São Paulo: Atheneu; 2003. p.655-660.
- 4- Pereira PCM. Interaction between infection, nutrition and immunity in tropical medicine. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2003; 9: 163-73.
- 5- Müller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ.* 2005; 173: 279-86.
- 6- Monteiro CA, Benicio MHD, Konno SC, Silva ACF, Lima ALL, Conde WL. Causas do declínio da desnutrição infantil no Brasil, 1996-2007. *Rev Salud Publica.* 2009; 43: 35-43.
- 7- Chandra RK, Kumaris S. Nutrition and immunity: an overview. *J Nutr.* 1994; 124: 1433S-5.

* International Committee of Medical Journal Editors. Requisitos uniformes para manuscritos apresentados a periódicos biomédicos. *Rev Saúde Pública.* 1999; 33: 6-15.

- 8- Brundtland GH. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. *Nutr Rev.* 2000; 58: S1-4.
- 9- Collins S. Treating severe acute malnutrition seriously. *Arch Dis Child.* 2007; 92: 453-61.
- 10- Beisel WR. Nutrition and immune function: overview. *J Nutr* 1996; 126: 2611S-5.
- 11- Alam NH, Hamadani JD, Dewan N, Fuchs GJ. Efficacy and safety of a modified oral rehydration solution (ReSoMaL) in the treatment of severely malnourished children with watery diarrhea. *J Pediatr.* 2003; 143: 614-9.
- 12- Schaible UE, Kaufmann SH. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med.* 2007; 4(5): e115.
- 13- Agarwal D, Chakravarty J, Sundar S, Gupta V, Bhatia BD. Correlation between clinical features and degree of immunosuppression in HIV infected children. *Indian Pediatr.* 2008; 45: 140-3.
- 14- Katona P, Katona-Apte J. The interaction between nutrition and infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 1582-8.
- 15- Grimble RF. Malnutrition and the immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88: 615-9.
- 16- Pereira PCM, Meira DA, Curi PR, Sousa N, Burini RC. The malaria impact on the nutritional status of Amazonian adult subjects. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1995; 37(1S): 19-24

- 17-Fernandes G, Jolly CA, Lawrence RA. Nutrition and the immune system. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ. Modern nutrition in health and disease. 10 th. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p.670-84.
- 18-Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001; 106: 255-8.
- 19-Neyestani TR, Woodward B. Blood concentrations of Th2-type immunoglobulins are selectively increased in weanling mice subjected to acute malnutrition. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005; 230: 128-34.
- 20-Fernández RG, Leehan JA, Pastrana RF, Muñiz RO. Effect of malnutrition on K⁺ current in T lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005; 12: 808-13.
- 21-Fock RA, Vinolo MA, de Moura Sá Rocha V, de Sá Rocha LC, Borelli P. Proteinenergy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine*. 2007; 40: 105-14.
- 22-Cortés-Barberena E, González-Márquez H, Gómez-Olivares JL, Ortiz-Muñiz R. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. 2008; 152: 585-92.
- 23- Morley JE, Thomas DR, Wilson MM. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83: 735-43.
- 24-Stephensen CB, Jiang X, Freytag T. Vitamin A deficiency increases the in vivo development of IL-10-positive Th2 cells and decreases development of Th1 cells in mice. *J Nutr*. 2004; 134: 2660-6.

- 25-Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab.* 2007; 51: 301-23.
- 26-Malafaia G, Serafim TD, Silva ME, Pedrosa ML, Rezende AS. Protein-energy malnutrition decreases immune response to vaccine in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 2009; 31: 41-9.
- 27-Ribeiro DA, Pereira PCM, Machado JM, Silva SB, Pessoa AWP, Salvador DMF. Does toxoplasmosis cause DNA damage? An evaluation in isogenic mice under normal diet or dietary restriction. *Mutat Res.* 2004; 559: 169-76.
- 28-Actor P. Protein and vitamin intake in visceral leishmaniasis in the mouse. *Exp Parasitol.* 1960; 10: 1-20.
- 29-Badaró R, Jones TC, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area Brazil. *J Infect Dis.* 1986; 154: 639-49.
- 30-Oliveira SA, Silva LM, Barbosa Junior AA, Coutinho EM, Andrade ZA, Soares MBP. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2004; 93: 30-5.
- 31-França TGD, Ishikawa LLW, Zorzella-Pezavento SFG, Chiuso-Minicucci F, Guerino CPF, Cunha MLRS, et al. Immunization protected well nourished mice but not undernourished ones from lung injury in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *BMC Microbiol.* 2009, 9: 240-7.
- 32-Ishikawa LLW, França TGD, Chiuso-Minicucci F, Zorzella-Pezavento SFG, Marra NM, Pereira PCM, et al. Dietary restriction abrogates antibody

production induced by a DNA vaccine encoding the mycobacterial 65 kDa heat shock Protein. *Genet Vaccines Therap.* 2009; 7: 11.

33-Lobo JO. Um caso de blastomicose produzido por uma espécie nova, encontrada em Recife. *Rev Med Pernambuco.* 1931; 1: 763-5.

34-Brito AC, Quaresma JAC. Lacaziose (doença de Jorge Lobo): revisão e atualização. *An Bras Dermatol.* 2007; 82: 461-74.

35-Lacaz CS, Baruzzi RG, Rosa MCB. Doença de Jorge Lobo. São Paulo: Editora da USP-IPSIS; 1986.

36-Opromolla DVA, Taborda PR, Taborda VBA, Viana S, Furtado JF. Lobomicose: relato de 40 casos novos. *An Bras Dermatol.* 1999; 74: 135-41.

37-Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Medica Lacaz. 9a. ed. São Paulo: Savier; 2002. p.462-78.

38-Woods WJ, Belone AFF, Carneiro LB, Rosa PS. Ten years experience with Jorge Lobo's disease in the State of Acre, Amazon region, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2010; 52: 273-8.

39-Baruzzi RG, Castro RM, Andretta C, Carvalhai S, Ramos OL, Pontes PL. Ocorrência de blastomicose queiloidiana entre índios Caibi. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1967; 9: 135-42.

40-Machado PA, Silveira DF. Piraip, a falsa lepra dos Caiabis. *Rev Bras Leprol.* 1966; 34: 60.

- 41-Baruzzi RG, Lacaz CS, Souza FAA. Historia natural da doenca de Jorge Lobo. Ocorrencia entre os índios Caiabi (Brasil Central). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1979; 21: 302-38.
- 42-Martinez R, Vitali LH, Henriques JHS, Machado AA, Albernaz A, Lima AA. Inquérito soropidemiológico para infecções por fungos causadores de micoses sistêmicas na Reserva Indígena Xacriabá, Estado de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35: 347-50.
- 43-Lacaz CS, Rodrigues MC, Porto E. *Paracoccidioides lobo* x *Loboa lobo*: uma questão de nomenclatura médica. An Bras Dermatol. 1994; 69: 143-4.
- 44-Lacaz CS. *Paracoccidioides lobo* (Fonseca Filho et Área Leão, 1940) Almeida et Lacaz, 1948-1949. Description of the fungus in latin. Rev Inst Med Trop. 1996; 38: 229-31.
- 45-Taborda PR, Taborda VA, McGinnis MR. *Lacazia lobo* gen nov., comb. Nov., the etiologic agent of lobomycosis. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2031-3.
- 46-Mendoza L, Ajello L, Taylor JW. The taxonomic status of *Lacazia lobo* and *Rhinosporidium seeberi* has been finally resolved with the use of molecular tools. Rev Iberoam Micol. 2001; 18: 95-8.
- 47-Herr RA, Tarcha EJ, Taborda PR, Taylor JW, Ajello L, Mendoza L. Phylogenetic analysis of *Lacazia lobo* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. J Clin Microbiol. 2001; 39: 309-14.
- 48-Taborda VBA, Taborda PRO, McGinnis M. Constitutive melanin in the cell wall of the etiologic agent of Lobo's Disease. Rev Inst Med Trop. 1999; 41: 9-12.

- 49-Furtado JS. Structure and reproduction of *Paracoccidioides lobo*i. Mycol. 1967; 59: 286-94.
- 50-Abreu WM, Miranda JL. Microscopia eletrônica scanning: agente da micose de Jorge Lobo. An Bras Dermatol. 1972; 47: 115-24.
- 51-Sesso A, Baruzzi RG. Interaction between macrophage and parasite cells in lobomycosis. The thickened cell wall of *Paracoccidioides lobo*i exhibits apertures to the extracellular milieu. J Submicrosc Cytol Pathol. 1988; 20: 537-48.
- 52-Sesso A, Faria FP, Baruzzi RG. The causative agent of Jorge Lobo's disease, the fungus *P. lobo*i (= *Loboa lobo*i) may be seen extracellularly encircled by histiocytes. Observations at the transmission and scanning electron microscopes. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1993; 35: 305-6
- 53-Vilani-Moreno FR, Opromolla DVA. Determinação da viabilidade do *Paracoccidioides lobo*i em biópsias de pacientes portadores de doença de Jorge Lobo. An Bras Dermatol. 1997; 72: 433-7.
- 54-Burns RA. Report of the first human case of Lobomycosis in the United States. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1283-5.
- 55-Lacaz CS. Aspectos clínicos e epidemiológicos das micoses profundas na América do Sul. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1959; 1: 150-64.
- 56-Michalany J, Lagonegro B. Corpos asteróides na blastomicose de Jorge Lobo. A propósito de um novo caso. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1963; 5: 33-6.

- 57-Silva D, Brito A. Formas clínicas não usuais da micose de lobo. *An Bras Dermatol.* 1994; 69: 133-6.
- 58-Lupi O, Tyring SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 53: 931-51.
- 59-Carneiro FP, Maia LB, Moraes MA, Magalhães AV, Vianna LMS, Zancanaro PCQ, et al. Lobomycosis: diagnosis and management of relapsed and multifocal lesions. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2009; 65: 62-4.
- 60-Opromolla DVA, Belone AFF, Taborda PRO, Taborda VBA. Correlação clínico patológica em 40 casos novos de blastomicose. *An Bras Dermatol.* 2000; 75: 425-34.
- 61-Talhari C, Oliveira CB, Santos MNS, Ferreira LC, Talhari S. Disseminated lobomycosis. *Int J Dermatol.* 2008; 47: 582-3.
- 62-Dias LB, Sampaio MM, Silva D. Jorge Lobo's disease. Observations on its epidemiology and some unusual morphological forms of the fungus. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1970; 12: 8-15.
- 63-Baruzzi RG, Marcopito LF, Michalani NS, Livianu J, Pinto NRS. Early diagnosis and prompt treatment by surgery in Jorge Lobo's disease (Keloidal blastomycosis). *Mycopathol.* 1981; 74: 51-4.
- 64-Mapurunga ACP, Teixeira FLL, Bargiona SP, Gonçalves HMG, Monteiro CM, Lima AAB. Micoses profundas doagnoticadas no Serviço de Dermatologia do

Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) no período de 1978 a 1989. An Bras Dermatol. 1991; 66: 243-50.

65- Golcman B, Yagima ME. Blastomicose Queloidiana de Jorge Lobo. Tratamento de cirúrgico de 2 casos. An Bras Dermatol. 1973; 48: 7-11.

66- Cuce LC, Wroclawski EL, Sampaio SAP. Treatment of paracoccidioidomycosis, candidosis, chromomycosis, lobomycosis and mycetoma with ketoconazole. Int J Dermatol. 1980; 19: 405-8.

67- Lawrence DN, Ajello L. Lobomycosis in western Brazil: report of a clinical trial with ketoconazole. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35: 162-6.

68- Azulay RD, Andrade LC, Silva D. Reprodução experimental da blastomicose de Jorge Lobo. An Bras Dermatol. 1969; 43: 261-6.

69- Fonseca OJ, Lacaz CS. Estudo de culturas isoladas de blastomicoses queloidiforme (Doença de Jorge Lobo). Denominação ao seu agente etiológico. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1971; 13: 225-51.

70- Silva D. Estudo experimental da micose de Lobo. An Bras Dermatol. 1994; 69: 88-91.

71- Sampaio MM, Dias LB. Experimental infection of Jorge Lobo's disease in the cheek-pouch of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Rev Inst Med Trop São Paulo. 1970; 12: 115-20.

- 72-Sampaio MM, Dias LB. The armadillo *Euphractus sexcinctus* as a suitable animal for experimental studies of Jorge Lobo's disease. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1977; 19: 215-20.
- 73-Opromolla DVA, Nogueira ME. Inoculation of *Lacazia loboi* into the subcutaneous tissue of the hamster cheek pouch. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2000; 42: 119-23.
- 74-Opromolla DVA, Madeira S, Belone AFF, Vilani-Moreno FR. Jorge Lobo's disease: Experimental inoculation in Swiss mice. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1999; 41: 359-64.
- 75-Madeira S, Opromolla DVA, Belones AFF. Inoculation of BALB/C mice with *Lacazia loboi*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2000; 42: 239-43.
- 76-Madeira S, Belone AFF, Padovani CR, Omoprolla DVA. Comparative experimental infection of *Lacazia loboi* in BALB/c and B10.A mice. Rev Iberoam Micol. 2003; 20: 55-9.
- 77-Belone AFF, Madeira S, Rosa PS, Opromolla DVA. Experimental reproduction of the Jorge Lobo's disease in BALB/c mice inoculated with *Lacazia loboi* obtained from a previously infected mouse. Mycopathol. 2001; 155: 191-4.
- 78-Marcos EVC, Souza FC, Torres EA, Lauris JRP, Opromolla DVA. Estudo de associação entre antígenos leucocitários humanos e doença de Jorge Lobo. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2005; 38: 399-401.

- 79-Fava-Netto C, Raphael A. A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis*, na Blastomicose Sul-Americana. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1961; 3: 161-5.
- 80-Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic Absorption Test for Serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 1984; 20: 103-8.
- 81-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: 1610-5.
- 82-Vidal MS, Palacios AS, Melo NT, Lacaz CS. Reactivity of anti-gp43 antibodies from *Paracoccidioides brasiliensis* antiserum with extracts from cutaneous lesions of Lobo's disease [preliminary note]. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1997; 39: 35-7.
- 83-Camargo ZP, Baruzzi RG, Maeda SM, Florino MC. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* by serological methods. Med Mycol. 1998; 36: 413-7.
- 84- Vilani-Moreno FR, Silva LM, Opromolla DV. Evaluation of the phagocytic activity of peripheral blood monocytes of patients with Jorge Lobo's disease. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37: 165-8.
- 85- Vilani-Moreno FR, Mozer E, Sene AMG, Ferascoli MO, Pereira TC, Miras MG, et al. In vitro and in situ activation of the complement system by the fungus *Lacazia loboi*. Rev Inst Med Trop. 2007; 49: 97-101.

- 86- Vilani-Moreno FR, Lauris JRP, Opromolla DVA. Cytokine quantification in the supernatant of mononuclear cell cultures and in blood serum from patients with Jorge Lobo's disease. *Mycopathol.* 2004; 158: 17-24.
- 87- Mendoza L, Belone AFF, Vilela R, Rehtanz M, Bossart GD, Reif JS, et al. Western blotting analyses of the humoral immune response to *Lacazia loboi* antigens using sera from humans and dolphins with lacaziosis and sera from experimentally infected mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15: 164-7.
- 88- Vilani-Moreno FR, Belone AFF, Soares CT, Opromolla DVA. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. *Rev Iberoam Micol.* 2005; 22: 44-9.
- 89- Xavier MB, Libonati RMF, Unger D, Oliveira C, Corbett CEP, Brito AC, et al. Macrophage and TGF- β immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease. *Hum Pathol.* 2008; 39: 269-74.
- 90- Quaresma JAS, Oliveira E, Brito AC. Is TGF-b important for the evolution of subcutaneous chronic mycoses? *Med Hypotheses.* 2008; 70: 1182-5.
- 91- Vilani-Moreno FR, Belone AFF, Lara VS, Venturini J, Lauris JRP, Soares CT. Detection of cytokines and nitric oxide synthase in skin lesions of Jorge Lobo's disease patients. *Med Mycol.* 2011; 49: 643-8.
- 92- Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol.* 1995; 25: 975-9.
- 93- Grenn LC. Nitrite biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci.* 1981; 18: 7764-8.

- 94- Pick A, Misel G. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. J Immunol Methods. 1981; 46: 211-26.
- 95- Russo M, Teixeira HC, Marcondes MCG, Barbuto JAM. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. Braz J Med Biol Res. 1989; 1271-3.
- 96- Vilani-Moreno FR, Fecchio D, Mattos MCI, Moscardi-Bacchi M, Defaveri J, Franco M. Study os pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells: resistant vc. Susceptible mice. Mycopathol 1998; 141: 79-91.
- 97- Pereira PCM. Efeito do estado nutricional na resposta inflamatória de camundongos BALB/c infectados com *Toxoplasma gondii* [memorial]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu; 2006.
- 98- Ishikawa LLW, Rosa LC, França TGD, Peres RS, Chiuso-Minicucci F, Zorzella-Pezavento SFG, et al. Is the BCG vaccine safe for undernourished individuals? Clin Dev Immunol. Forthcoming 2012.
- 99- Waitzberg DL, Lotierzo PHP, Silva AJD, Schronts E, Cerra F. Imunonutrição. In: Waitzberg DL. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p.1-38.
- 100- Abreu MAMM, Weckx LLM, Hirata CHN. Histological and ultrastrutural aspects of the tongue in undernourished rats. Rev Bras Otorrinolaringol. 2006; 72: 523-7.
- 101- Coutinho EM. Malnutrition and Hepatic Fibrosis in Murine Schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99: 85-92.

- 102- Oliveira SA, Silva LM, Barbosa Junior AA, Ribeiro-Dos-Santos R, Coutinho EM, Andrade ZA, et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 2005; 93: 30-5.
- 103- Ramos RP. Infecção esquistossomótica aguda: produção de citocinas em camundongos desnutridos e deficientes em iNOS [dissertação]. Recife: Fundação Oswaldo Cruz; 2007.
- 104- Silva FL. Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni* [dissertação]. Recife: Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
- 105- Pinto GM. Avaliação da resposta immune de camundongos BALB/c vacinados com o antígeno de *Leishmaniose chagasi* durante um período de desnutrição proteico-calórica [dissertação]. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto; 2009.
- 106- Couto JLA, Vieira RCS, Barbosa JM, Machado SS, Ferreira HS. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41: 390-3.
- 107- Coutinho EM, Silva FL, Barros AF, Araújo RE, Oliveira SA, Luna CF, et al. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. Acta Trop. 2007; 101: 15-24.
- 108- Calich VLG, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. Mycopathol. 1978; 1(66): 175-7.

- 109- Ghosn EEB et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 2568-73.
- 110- Bhaumik S, Mitra R, Varalaksmi C, Khar A. Activated macrophages migrate to the subcutaneous tumor site via the peritoneum: a novel route of cell trafficking. *Exp Cell Res*. 2001; 266: 44-52.
- 111- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Abul K. *Imunologia Básica*. 2º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007
- 112- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Abul K. *Imunologia celular e molecular*. 6º. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- 113- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Imunologia*. 4a. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
- 114- Johnston Jr RB. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med*. 1988; 318: 747-52.
- 115- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redoxactive forms. *Science*. 1992; 258: 2898-902.
- 116- Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet*. 1994; 343: 1199-206.
- 117- Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 27: 2002-12.

- 118- Jacobson ES, Tinnel SB. Antioxidant function of fungal melanin. *J Bacteriol.* 1993; 175: 7102-4.
- 119- Torres-Guerrero H, Edman JC. Melanin-deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 303-13.
- 120- Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med.* 1980; 303: 622-6.
- 121- Wheeler PR, Gregory D. Superoxide dismutase, peroxidatic activity and catalase in *Mycobacterium leprae* purified from armadillo liver. *J Gen Microbiol.* 1980; 121: 457-64.
- 122- Neill MA, Klebanoff SJ. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J Exp Med.* 1988; 167: 30-42.
- 123- Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by pattern of l-arginine metabolism. *J Immunol.* 2001; 167: 6533-44.
- 124- Balderramas HA. Efeito de um inibidor de leucotrienos no processo inflamatório decorrente da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos geneticamente selecionados [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2009.
- 125- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 593-623.

- 126- Anstead GM, Chandrasekar B, Lhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. Infect Immun. 2001; 69: 4709-18.
- 127- Anstead GM, Chandrasekar B, Lhao W, Yang J, Melby PC. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network, nuclear factor-kB activation, and nitric oxide production. J Leukoc Biol. 2003; 74: 982-91.
- 128- Geller P, Geller M. Citocinas e imunorregulação. An Acad Nac Med. 1997; 157: 97-102.
- 129- Varella PPV, Forte WCN. Citocinas: revisão. Rev Bras Alerg Immunopatol. 2001; 24: 146-54.
- 130- Lyons CR. The role os nitric oxide in inflammation. Adv Immunol. 1995; 60: 323-71.
- 131- Nascimento FRF, Calich VLG, Rodrigues D, Russo M. Dual role of nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance but overproduction associated with susceptibility. J Immunol. 2002; 168: 4593-600.
- 132- Goto RL. Efeito da desnutrição e das citocinas pró-inflamatórias na infecção experimental em camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi* [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2012.

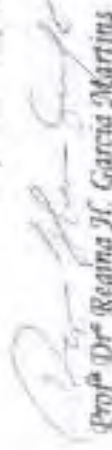
ANEXO



Certificado

Certificamos que o Protocolo n.º 785 sobre o projeto de pesquisa "Efeito do estado nutricional na resposta imunológica de camundongos BALB/c inoculados pelo fungo *Laccaria Loboi*", de autoria de Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa, orientada pelo Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira, co-orientada por Fátima Regina Vilani Moreno, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "camundongos", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 25/03/2010.


Prof.ª Dr.ª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Dr.ª Renata Júlio Junior - 31/4 - Botucatu - SP - CEP: 16.015-970 Fone/Fax: (067) 47.3811-6143 e-mail: secretaria_cca@fmb.unesp.br

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Avaliações nutricionais

1.1. Pesos corpóreos dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo e os momentos da determinação.

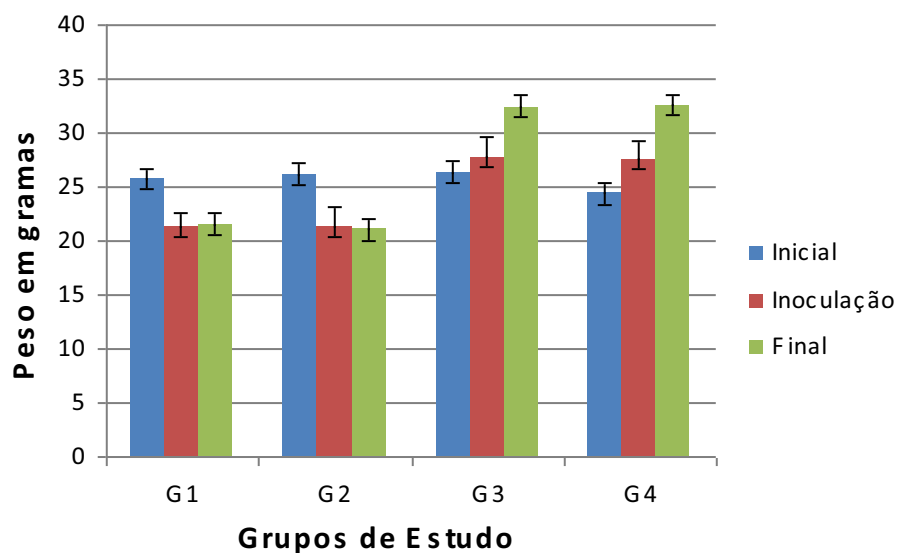


Figura 1. Pesos corpóreos, em gramas, dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo e os momentos da determinação.

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. Análise estatística: Teste de Tukey ao nível de 5%.

G1: inicial > inoculação e final. G2: inicial > inoculação e final. G3: inicial > inoculação > final. G4: inicial > inoculação > final.

Inicial: G1 = G2 = G3 = G4. Inoculação: G1 e G2 < G3 e G4. Final: G1 e G2 < G3 e G4.

1.2. Peso do fígado e baço dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

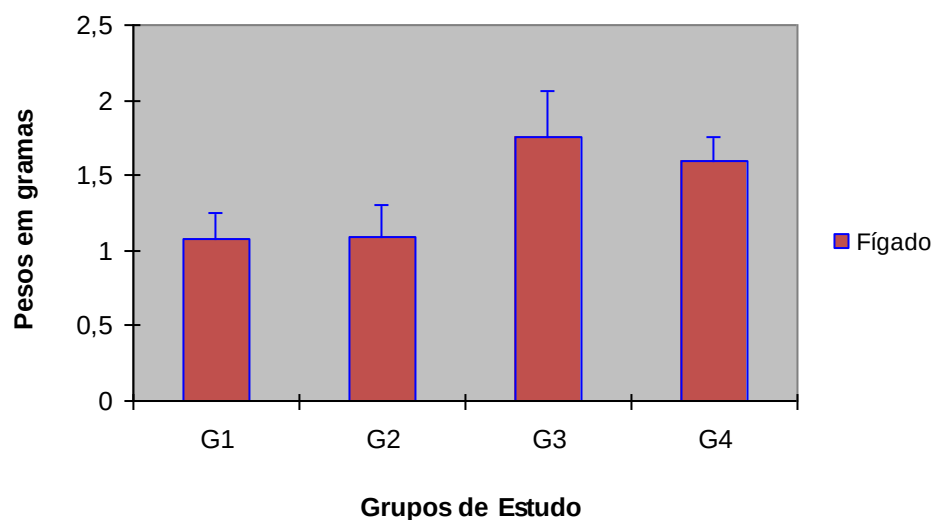


Figura 2. Peso do fígado, em gramas, dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. Análise estatística: Teste de Tukey ao nível de 5%. Fígado: G1 e G2 < G3 e G4.

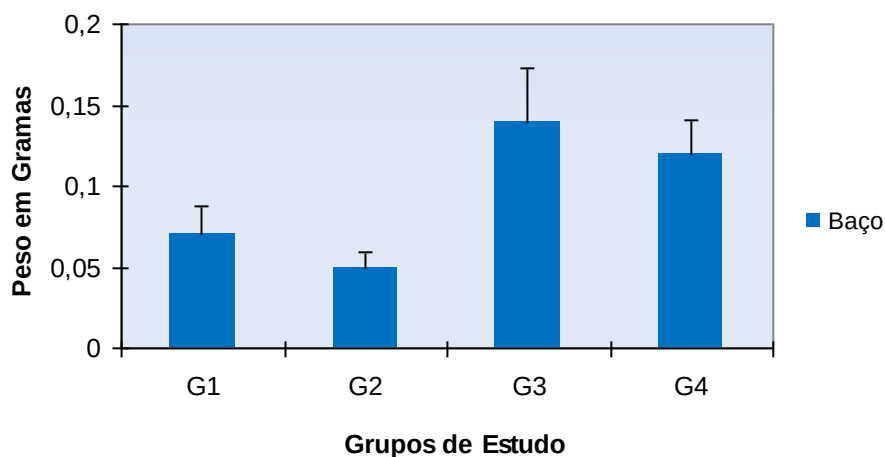


Figura 3. Peso do baço, em gramas, dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. Análise estatística: Teste de Tukey ao nível de 5%. Baço: G1 e G2 < G3 e G4.

APÊNDICE 2. Determinação da viabilidade e do número total de fungos dos coxins plantares dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

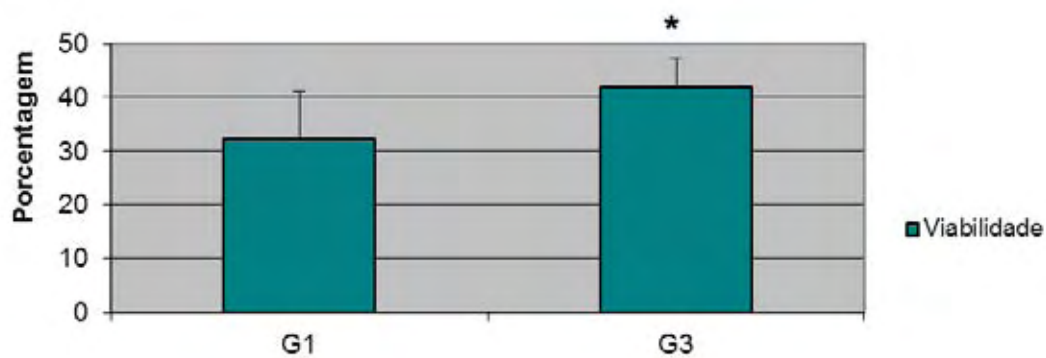


Figura 4. Viabilidade dos fungos, em porcentagem, obtidos do coxim plantar dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados e G3: camundongos inoculados. Análise estatística: Teste de Tukey ao nível de 5%.

Viabilidade: G1 < G3.

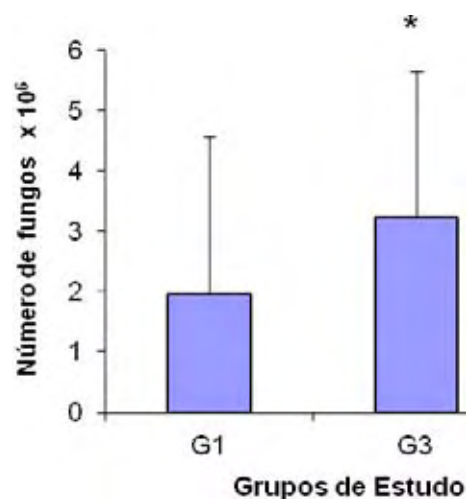


Figura 5. Número de fungos x 10⁶/ml, obtidos do coxim plantar dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados e G3: camundongos inoculados. Análise estatística: Teste de Tukey ao nível de 5%.

Número de fungos: G1 < G3.

APÊNDICE 3. Contagem de células totais e macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

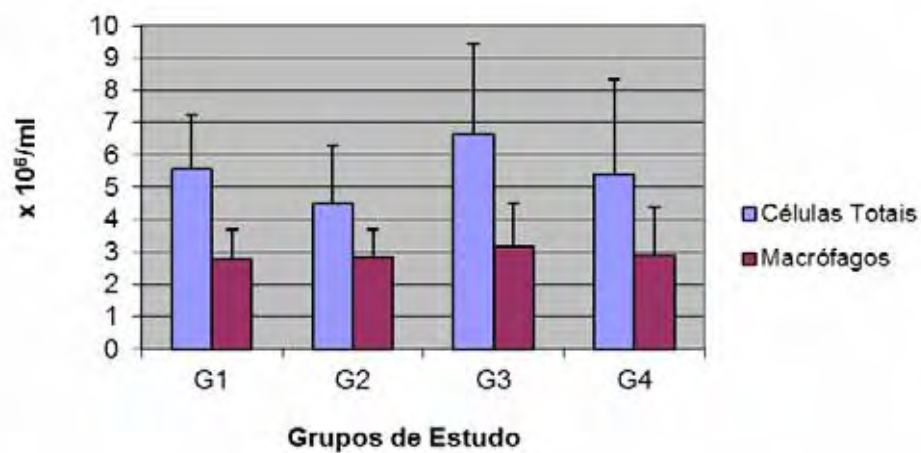


Figura 6 - Contagem de células totais e macrófagos peritoneais, número x 10⁶/ ml, dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos sadio. Análise estatística: Teste de Razão de Verossimilhança ao nível de 5%.

Células Totais: G3>G2 Macrófagos: G1=G2=G3=G4

APÊNDICE 4. Determinação dos metabólicos do oxigênio e do nitrogênio em cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

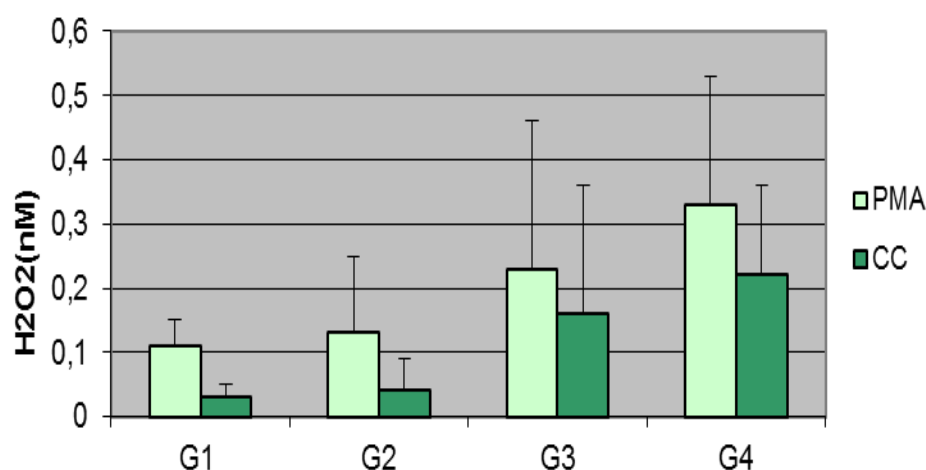


Figura 7. Determinação de H_2O_2 , em nM, em camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. Análise estatística: Teste de Tukey ao nível de 5%.
PMA > CC: G1; PMA=CC: G2, G3 e G4; PMA: G1 e G2 < G3 e G4; CC: G1 e G2 < G3 e G4.

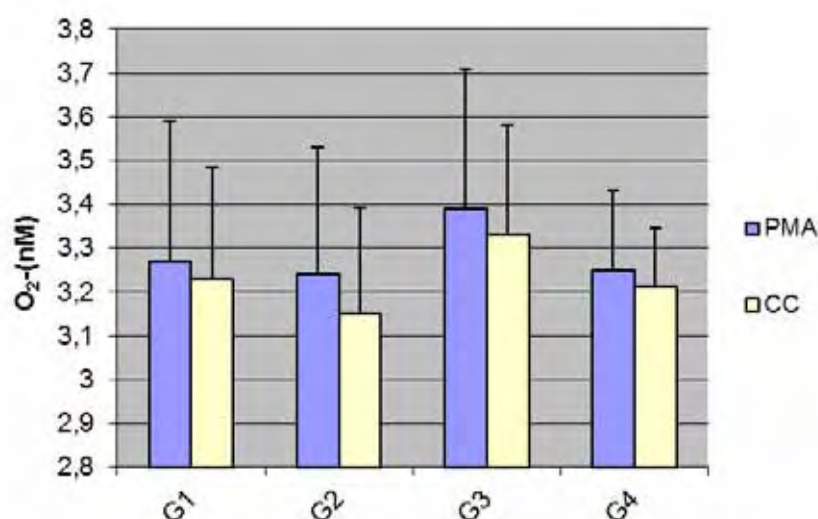


Figura 8. Determinação de O_2^- , em nM, em camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. Análise estatística: Teste de Tukey ao nível de 5%.
 O_2^- : G1=G2=G3=G4.

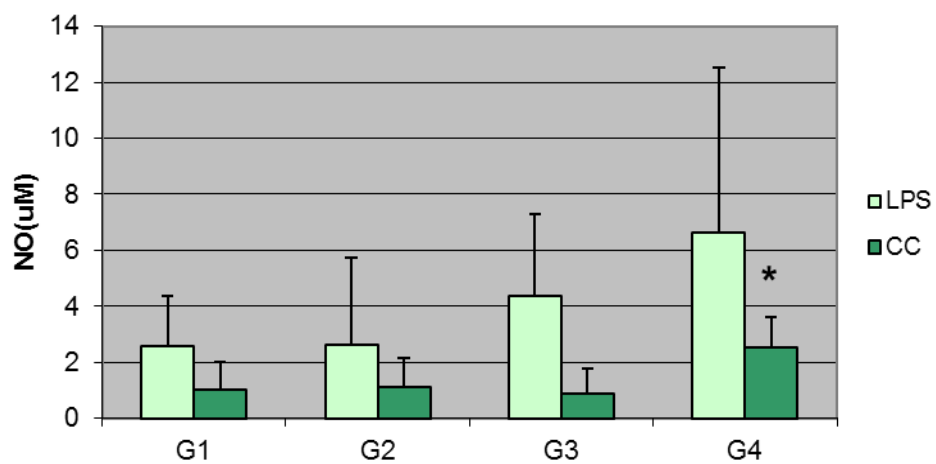


Figura 9. Determinação de NO, em μM , em camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. Análise estatística: Teste de Tukey ao nível de 5%.

LPS=CC: G1; LPS > CC: G2, G3 e G4. LPS: G1 e G2 < G3 e G4. CC: G4 > G1, G2 e G3.

APÊNDICE 5. Quantificação dos níveis de IFN- γ e TNF- α em camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

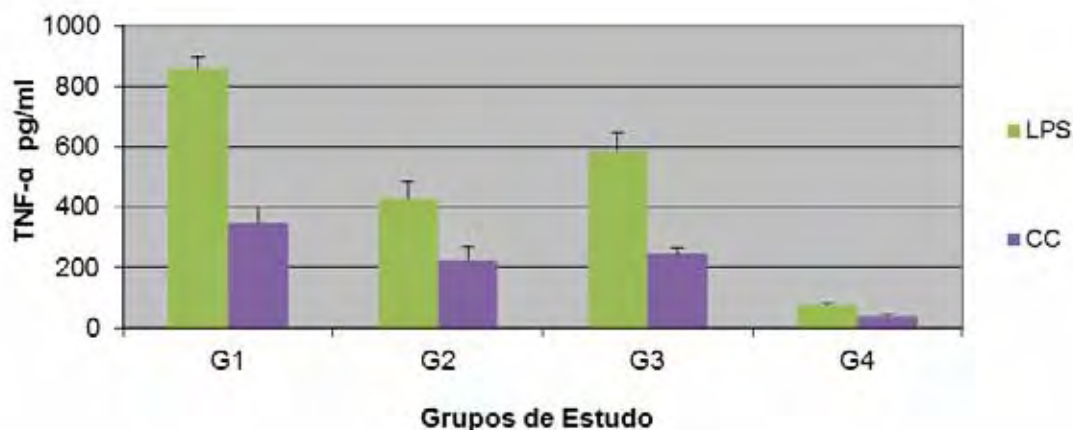


Figura 10. Quantificação de TNF- α em camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. Análise estatística: Teste de Razão de Verossimilhança ao nível de 5%.

LPS x CC: todos diferem. LPS: todos diferem. CC: G1>G2,G3 e G4; G2=G3, G4<G1,G2 e G3

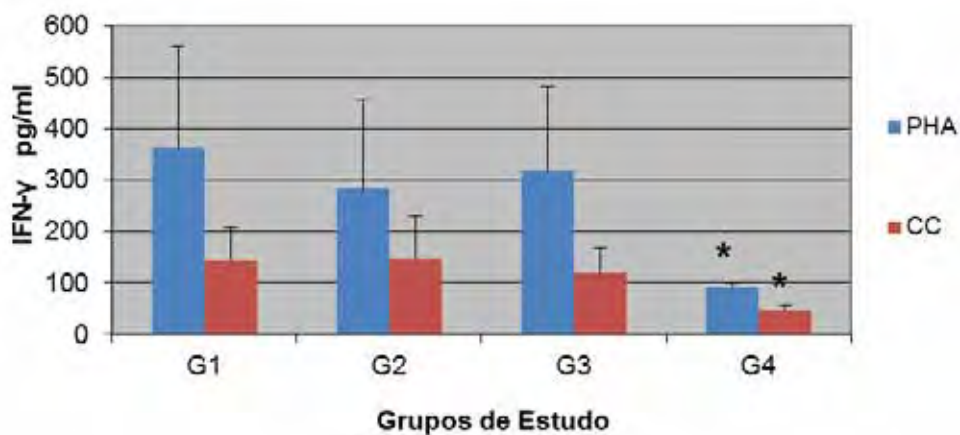


Figura 11. Quantificação de IFN- γ , pg/ml, em camundongos BALB/c de acordo com os grupos de estudo.

G1: camundongos desnutridos inoculados; G2: camundongos desnutridos; G3: camundongos inoculados; G4: camundongos saudáveis. Análise estatística: Teste de Razão de Verossimilhança ao nível de 5%.

PHA x CC: todos diferem. PHA e CC: G1, G2 e G3 > G4