

Suzana Madeira

**Estudo comparativo de inoculação do *Lacazia loboi*
em camundongos BALB/c e B10.A, a partir de análise
histopatológica, número de fungos e índice de
viabilidade**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças Tropicais, área
de concentração em Doenças Tropicais,
modalidade Biologia Tropical, da Faculdade
de Medicina de Botucatu, da UNESP, para a
obtenção do título de Mestre.**

**Orientador:
Prof. Dr. Diltor Vladimir Araujo Opromolla**

**Botucatu
2001**

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

Madeira, Suzana

Estudo comparativo de inoculação do *Lacazia loboi* em camundongos BALB/c e B10.A a partir de análise histopatológica, número de fungo e índice de viabilidade / Suzana Madeira. – 2001.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2001.

Orientador: Diltor Vladimir Araújo Opromolla

1. Fungos patogênicos – Estudos experimentais

CDD 589.2042

Palavras-chave: Doença de Jorge Lobo; *Lacazia loboi*; Camundongo; Inoculação

Dedicatória

Ao Rodnei, noivo e amigo, grande
incentivador e paciente nos momentos de ausência.

Aos meus pais, Antonio e Silvia, pela
minha existência.

À minha tia Lourdes de Fátima, pelo
exemplo de vida e dedicação.

Agradecimentos especiais

Ao Dr. Diltor Vladimir Araújo Opromolla,
meus sinceros agradecimentos na
transmissão de seus conhecimentos.

Ao Prof. Ms. Holmes Campanelli Costa, *in*
memorian, pelo tempo em que
trabalhamos juntos, fundamental ao meu
crescimento científico.

Agradecimentos

Há determinadas coisas que são difíceis de transformar em palavras, uma delas é o quanto posso agradecer a ajuda, compreensão, paciência, confiança, dedicação e incentivo que recebi de várias pessoas durante a elaboração desta dissertação, em especial:

Andrea F. F. Belone – Pesquisadora Científica – Equipe Técnica de Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) – Bauru .

Débora R. Fernandes, Ivete F. Freitas, Lázara M. Trino, Reinaldo V. Germino, Beatriz G. Carreira, Manoel L. da Matta e Valéria R. G. R. Pereira – Equipe Técnica de Microbiologia (ILSL).

Cleide Ortega e José Ricardo Franchim – Setor de Recursos Didáticos e Pedagógicos (ILSL).

Telma Ap. T. A. Sneideris – Centro de Processamento de Dados (ILSL).

Paula Opromolla – Assistência Técnica (ILSL).

Patrícia Sammarco Rosa – Setor de Biotério (ILSL).

Professores do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais – FMB – UNESP/ Botucatu.

Dr. José F. Furtado – médico do Hospital Souza Araújo em Rio Branco/Acre.

Dr. Marcos C. L. Virmond – Diretor Técnico do ILSL.

Vera Lúcia Mengue – Seção de Pós-Graduação da FMB – UNESP

Esther S. Nogueira, Fátima R. V. Moreno, Elaine V. C. Marcos e Eliane Silva – Pesquisadoras Científicas - Equipe Técnica de Imunologia do ILSL.

Prof. Dr. Flávio F. Aragon – Prof. Assit. Dr. do Departamento de Bioestatística – IB/UNESP/Botucatu

Prof. Dr. Carlos R. Padovani – Prof. Titular do Departamento de Bioestatística – IB/UNESP/Botucatu.

Aos pacientes – Rio Branco/Acre.

Acredito que a simplicidade traduz mil palavras, por isso, obrigada a todos vocês.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	08
Lista de figuras.....	09
Lista de tabelas.....	11
Resumo.....	12
1. Introdução.....	15
1.1. Aspectos morfológicos do <i>L. loboi</i>	18
1.2. Tentativas de cultivo.....	20
1.3. Aspectos imunológicos.....	21
1.4. Clínica.....	23
1.5. Aspectos histopatológicos.....	25
1.6. Inoculações experimentais.....	30
1.6.1. Quelônios.....	30
1.6.2. Tatus.....	30
1.6.3. Cobaias, hamsters, camundongos e coelhos.....	30
1.6.4. Golfinhos.....	33
2. Objetivos.....	35
3. Material e Métodos.....	37
3.1. Instituição envolvida.....	38
3.2. Paciente.....	38
3.3. Métodos.....	38
3.3.1. Biópsia.....	38
3.3.2. Suspensão fúngica (biópsia).....	39
3.3.3. Inoculação.....	40
3.3.4. Análise histopatológica.....	40
3.3.5. Determinação do número de células fúngicas e índice de viabilidade na suspensão obtida do coxim plantar.....	41
3.3.6. Documentação fotográfica.....	41

3.3.7. Análise estatística.....	41
4. Resultados.....	42
4.1. Linhagem BALB/c.....	43
4.1.1. Análise histopatológica.....	43
4.1.2. Lesões macroscópicas.....	45
4.1.3. Quantidade obtida de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício.....	46
4.1.4. Índice de viabilidade obtido nos diferentes períodos de sacrifício.....	47
4.2. Linhagem B10.A.....	47
4.2.1. Análise histopatológica.....	47
4.2.2. Alterações macroscópicas.....	50
4.2.3. Quantidade obtida de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício.....	51
4.2.4. Índice de viabilidade obtido nos diferentes períodos de sacrifício.....	51
4.2.4.1. Número de células fúngicas e índice de viabilidade obtidos nos diferentes períodos de sacrifício entre as linhagens BALB/c e B10.A.....	52
5. Discussão.....	71
5.1 Análise histopatológica.....	76
5.2 Número obtido de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício.....	79
5.3 Índice de viabilidade obtido nos diferentes períodos de sacrifício.....	81
5.4 Considerações finais.....	83
6. Conclusões.....	84
7. Referências Bibliográficas.....	86
8. Abstract.....	98

Lista de abreviaturas e siglas

d – dia

DF-BE – diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo

DNCB – dinitroclorobenzeno

h – hora

HE – hematoxilina-eosina

ILSL – Instituto “Lauro de Souza Lima”

m – mês (es)

p.i. – pós-inoculação.

PAS – ácido periódico de Schiff

PM – prata metenamina

PMN – polimorfonuclear

PPD – derivado protéico purificado do *Mycobacterium tuberculosis*

SS – solução salina

Lista de Figuras

Figura 1	Pele de coxim plantar de camundongo BALB/c 1mês após inoculação. Aspecto geral de infiltrado histiocitário subepidérmico entre feixes musculares. (HE – 50X).....	58
Figura 2	Pele de coxim plantar de camundongo BALB/c 1mês após inoculação evidenciando infiltrado inflamatório com predomínio de histiócitos e poucos fungos. (HE – 400X).....	59
Figura 3	Fungos mal corados e com aspecto de cápsula vazia em coloração pela PM. Camundongo BALB/c 1 mês após inoculação.(400X).....	59
Figura 4	Pele de coxim plantar de camundongos BALB/c 4 meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso moderado constituído por histiócitos, algumas células gigantes, tipo corpo estranho, fibroblastos e linfócitos. (HE – 400X).....	60
Figura 5	Pele de coxim plantar de camundongos BALB/c 7 meses após inoculação. Infiltrado granulomatoso moderado com predomínio de células gigantes e muitos fungos. (HE – 400X).....	60
Figura 6	Pele de coxim plantar de camundongo BALB/c 18 meses após inoculação. Aspecto geral de extenso infiltrado granulomatoso ocupando o derma superficial e profundo. (HE – 50X).....	61
Figura 7	Pele de coxim plantar de camundongo BALB/c 18 meses após inoculação evidenciando infiltrado granulomatoso com predomínio de células gigantes contendo numerosos fungos em seu interior. (HE – 400X).....	62
Figura 8	Coloração pela PM evidenciando grande número de fungos, formas em brotamento bem coradas e com aspecto de aspecto de cápsula vazia. Camundongo BALB/c 18 meses após inoculação.(400X).....	62
Figura 9	Lesão macroscópica inicial em coxim plantar de camundongos BALB/c após 7 meses de inoculação.....	63
Figura 10	Lesão macroscópica em coxim plantar de camundongos BALB/c 13 meses após inoculação.....	63
Figura 11	Lesão macroscópica com diferentes períodos de evolução em coxim plantar de camundongos BALB/c.....	64

Figura 12	Lesão macroscópica evidenciando nódulos grandes com vasos dilatados em sua superfície. Camundongo BALB/c 18 meses após inoculação.....	64
Figura 13	Pele de coxim plantar de camundongo B10.A 1 mês após inoculação. Aspecto geral de infiltrado histiocitário subepidérmico entre feixes musculares.....	65
Figura 14	Pele de coxim plantar de camundongo B10.A 1 mês após inoculação evidenciando infiltrado inflamatório com predomínio de células histiocitárias com ou sem fungo em seu interior. (HE – 400X).....	66
Figura 15	Fungos isolados e com aspecto de cápsula vazia, em coloração pela PM. Camundongo B10.A 1 mês após inoculação.....	66
Figura 16	Pele de coxim plantar de camundongo B10.A 4 meses após inoculação. Infiltrado histiocitário evidenciando numerosas células histiocitárias com citoplasma de aspecto rendilhado. (HE – 400X).....	67
Figura 17	Pele de coxim plantar de camundongo B10.A 7 meses após inoculação, evidenciando infiltrado granulomatoso moderado com presença de células gigantes e histiócitos isolados. (HE – 400X).....	67
Figura 18	Pele de coxim plantar de camundongo B10.A 18 meses após inoculação. Aspecto geral de extenso infiltrado granulomatoso nodular ocupando o derma superficial e profundo. (HE – 50X).....	68
Figura 19	Pele de coxim plantar de camundongo B10.A 18 meses após inoculação evidenciando infiltrado granulomatoso constituído por histiócitos com citoplasma de aspecto rendilhado, células gigantes contendo fungos em seu interior e esparsos linfócitos. (HE – 400X).....	68
Figura 20	Coloração pela PM evidenciando numerosos fungos, formas em brotamento e mal coradas. Camundongo B10.A 18 meses após inoculação. (400X).....	69
Figura 21	Camundongo B10.A sem alteração macroscópica em coxim plantar.....	70

Resumo

O presente estudo teve por objetivos avaliar a susceptibilidade de camundongos isogênicos das linhagens BALB/c e B10.A à infecção pelo fungo *Lacazia loboi* (*L. loboi*), mediante estudo do aspecto histopatológico das lesões produzidas, número de fungos e índice de viabilidade obtidos nos diferentes períodos de sacrifício e também verificar se o padrão de resposta aos parâmetros avaliados, nos animais isogênicos, é homogêneo, de modo a permitir correlação dos resultados entre si.

Ambos coxins plantares traseiros de quarenta e quatro camundongos BALB/c e quarenta e quatro B10.A foram intradermicamente inoculados com 0,03ml de uma suspensão fúngica. A suspensão foi obtida a partir de um único fragmento de lesão, coletado de um paciente portador da doença de Jorge Lobo. A biópsia foi macerada em solução salina 0,85% para obtenção da suspensão, sendo imediatamente submetida à técnica de coloração vital com diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo para determinação do índice de viabilidade. A concentração fúngica foi estimada utilizando-se câmara de Neubauer e os resultados foram expressos em números absolutos. A suspensão possuía 9×10^5 fungos/ml ($2,7 \times 10^4$ fungos/0,03ml) e 45% de índice de viabilidade. Os animais foram sacrificados vinte e quatro e setenta e duas horas, sete e quinze dias, um, quatro, sete, dez, treze, dezesseis e dezoito meses após inoculação. Ambos coxins plantares foram excisados, sendo um deles enviado para análise histopatológica e o outro macerado em solução salina para determinação do número de fungos e do índice de viabilidade.

A linhagem BALB/c apresentou extenso infiltrado granulomatoso muito semelhante ao observado na doença humana e evoluiu progressivamente nos diferentes períodos de sacrifício. O número obtido de fungos aumentou progressivamente no decorrer do experimento e, a partir do sétimo mês de inoculação, observaram-se alterações macroscópicas no coxim

plantar de dois animais. No final do experimento, 34% dos animais apresentaram alterações macroscópicas. Os índices de viabilidade obtidos variaram de 0% a 43%.

A linhagem B10.A também apresentou infiltrado granulomatoso exuberante, porém não foram observadas alterações macroscópicas em nenhum dos animais. O número obtido de fungos aumentou discretamente, ficando próximo do inoculado. Os índices de viabilidade obtidos foram menores, variando de 0% a 26%.

Considerando-se os achados histopatológicos, a presença de alterações macroscópicas e a grande quantidade obtida de fungos, pode-se concluir que a linhagem BALB/c é mais susceptível à infecção pelo fungo *L. loboi* do que a linhagem B10.A.

1. Introdução

A doença de Jorge Lobo ou blastomicose queloidiana foi descrita pela primeira vez no ano de 1931, pelo Prof. Jorge de Oliveira Lobo, em Recife (PE), em um paciente seu, seringueiro, com 52 anos, procedente do estado do Amazonas, que apresentava lesões nodulares, salientes, confluentes, duras, localizadas na região sacra e com 19 anos de evolução (LOBO, 1931).

É uma micose cutâneo-subcutânea, de evolução crônica, sem comprometimento visceral, cujo agente etiológico, até recentemente, era denominado de *Paracoccidioides lobo*i. Porém, TABORDA et al. (1999), ao estudarem aspectos taxonômicos do fungo, verificaram que o gênero *Paracoccidioides* era incorreto. Propuseram então a criação do gênero *Lacazia* e a nova denominação de *Lacazia lobo*i (*L. lobo*i). Análises filogenéticas posteriores, realizadas a partir de estudos moleculares, indicaram que o *L. lobo*i é um fungo dimórfico pertencente à ordem Onygenales e muito parecido com o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), entretanto, essa semelhança não é, do ponto de vista filogenético, suficiente para justificar a classificação no gênero *Paracoccidioides* (HERR et al, 2001).

A doença de Jorge Lobo é endêmica na região amazônica e já foi descrita, além do Brasil, também no Suriname, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Panamá, Costa Rica, Equador, Bolívia, Honduras, México e Peru. Embora possua baixa taxa de ocorrência, o número de casos descritos vem aumentando lentamente. Porém, não se sabe a sua real situação como problema de saúde pública no Brasil.

Evidências apontam a pele como porta de entrada do fungo, pelo fato de as lesões se localizarem quase exclusivamente no tecido cutâneo. A transmissão da doença provavelmente ocorre pelo contato do material infectante com soluções de continuidade da pele.

LACAZ et al. (1986) relatam que não há evidência de que haja maior suscetibilidade de determinado grupo étnico à infecção pelo *L. loboi*, tendo sido a doença descrita em brancos, negros e índios. É particularmente digno de nota o fato de uma tribo indígena, a dos Caiabi, ter mostrado uma alta tendência a adquirir a moléstia, enquanto permaneceram na região entre os rios Teles Pires e Arinos, formadores do rio Tapajós, no atual estado do Mato Grosso. Foram diagnosticados cinquenta e seis casos da doença de Jorge Lobo, entre esses índios, no período de 1953 a 1983. Depois que os Caiabi ingressaram no Parque Nacional do Xingu, nenhum índio mais adoeceu. Embora isso sugira fortemente a influência do ambiente na transmissão da moléstia, deve haver outros fatores para explicar a sua alta prevalência nessa tribo.

O fungo ainda não foi cultivado em meios de cultura artificiais. 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 (FONSECA & LACAZ, 1971).

O tratamento da doença de Jorge Lobo tem se limitado à exérese cirúrgica de lesões localizadas. A clofazimina foi a única droga testada que demonstrou alguma ação contra o fungo. A ausência de testes terapêuticos *in vitro*, até recentemente, decorria, entre outros fatores, da impossibilidade de testes em animais de laboratório, uma que vez não existia um modelo experimental para o estudo da doença.

Várias tentativas de reproduzir a doença em animais de laboratório foram realizadas no passado, porém os resultados foram isolados. Recentemente, OPROMOLLA et al. (1999) conseguiram manter a infecção por um longo período de tempo e padronizar uma metodologia de inoculação a partir da contagem do número de células fúngicas e determinação do índice de viabilidade em camundongos Suíços. Seguindo a mesma metodologia, MADEIRA et al. (2000) obtiveram êxito ao reproduzirem a doença em camundongos da linhagem BALB/c que, além de produzir uma grande quantidade de fungos, apresentaram lesão macroscópica nos coxins plantares inoculados. Essa descoberta, de um modelo animal capaz de reproduzir experimentalmente a

doença, vem possibilitar, então, o estudo dos diversos aspectos do fungo, como mecanismos patogênicos envolvidos na infecção, interação parasita-hospedeiro, constituição bioquímica, propriedades antigênicas e estudos terapêuticos.

Considerando-se que os trabalhos experimentais realizados no passado produziram resultados limitados e que as linhagens isogênicas de camundongos são freqüentemente utilizadas em estudos que avaliam os níveis de susceptibilidade ao agente infeccioso, neste trabalho foi proposto o estudo da susceptibilidade do *L. loboi* às linhagens BALB/c e B10.A., comparando-se os aspectos histopatológicos, número de células fúngicas e índice de viabilidade, obtidos. A importância de se ter um modelo animal ideal, aliado ao fato de não haver um meio de cultura para o fungo, de não se conhecer quase nada a respeito das relações imunológicas do organismo hospedeiro com o fungo e de não haver ainda um tratamento específico para essa doença justificam um estudo sistematizado dessa micose que acomete um número considerável de pacientes.

1.1 - Aspectos morfológicos do *L. loboi*

JORGE LOBO (1933) descreveu o fungo *L. loboi* como se apresentando redondo e com membrana de duplo contorno, sendo a membrana irisada em toda sua circunferência, tendo, em seu interior, granulações dotadas de movimentos brownianos. Esse fungo media 8 a 16µm e era Gram-positivo. O autor notou, nos cortes corados pela hematoxilina - eosina (HE), que os parasitas uns se apresentavam com o protoplasma corado pela hematoxilina e outros não tomavam o corante. Eles eram mais ou menos do mesmo tamanho e alguns eram campanuliformes. O autor constatou, também, em grande aumento, formas em ampulhetas ou em halteres. Ao utilizar o método de Good-Pasture-Mac Callum para estudar a morfologia dos parasitas nos tecidos, Jorge Lobo observou parasitas corados em violeta escuro, quase negro, e até parasitas que não tomavam o corante, mostrando que a coloração era muito variável. Em alguns, o seu interior estava constituído por uma massa homogênea e em outros eram notadas granulações coradas em violeta. Nas formas em ampulheta, ele verificou que uma

das partes componentes estava menos provida de cromatina, enquanto que a outra estava corada homogeneamente.

FIALHO, em 1938, descrevendo o seu caso, verificou que a reprodução dos parasitas era feita, em geral, por um broto único, mais raramente dois. Os dois parasitas ficavam ligados por uma espécie de tubo, daí as formas em halteres e ampulheta. Esse autor verificou também que os parasitas se agrupavam em fileiras de três ou quatro elementos ou em pequenos grupos irregulares, sempre rodeados de histiócitos; outras vezes, estavam no interior de gigantócitos. Não foi observado nenhum processo de esporulação. Notou-se que, muito freqüentemente, os parasitas davam a impressão de cápsulas vazias, mas certos elementos mostravam uma massa esférica, densa, corada em vermelho pela eosina e que era discretamente granulosa.

Vários outros autores descreveram os aspectos morfológicos do fungo, porém sem acrescentar algo mais do que já havia sido descrito. NERY-GUIMARÃES & MACEDO (1950) chamaram a atenção para as cápsulas vazias constituídas por parasitas mortos e que resistem longamente às substâncias líticas dos tecidos. Com relação ao processo reprodutivo dos fungos, consideraram que prevalecia o do brotamento simples e, quando esse ocorria de forma sucessiva, seriam visualizadas as chamadas formas catenuladas. Às vezes, três fungos se dispunham triangularmente, como resultado aparente de um brotamento duplo, mas brotamentos múltiplos, como no *P. Brasiliensis*, não foram observados.

WIERSEMA, em 1971, verificou que a parede de cada célula fúngica corava-se pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e não pelo HE e, com a coloração para fungos de Gridley, a parede tornava-se vermelha e, com a prata metenamina de Grocott (PM), tornava-se cinzenta ou negra, dependendo do tempo de exposição à solução da prata.

Em 1972, ABREU & MIRANDA, ao estudarem aspectos morfológicos do fungo pela microscopia eletrônica, observaram que a membrana era trilaminar, sendo a mais externa constituída de placas imbricadas, conferindo-lhe um aspecto eriçado.

LACAZ et al., em 1986, revendo os trabalhos realizados até aquela época sobre a morfologia do agente da doença de Jorge Lobo, citaram os estudos realizados pela microscopia eletrônica. Relataram eles que, com essa técnica, o *L. loboi* apresentava as mesmas estruturas do *P. brasiliensis*, não havendo distinção entre os dois fungos referente às suas organelas, mas sim no modo de brotamento. SESSO & BARUZZI (1983) e SESSO et al. (1983) verificaram que, após o fungo ter sido englobado pela célula fagocítica, sua parede celular se alterava e eram observados restos dela reagindo positivamente pela fosfatase ácida, indicando que hidrolases lisossômicas estavam no interior dos vacúolos contendo os seus restos. Esses restos dos fungos agregavam-se em massas esferóides e conferiam à célula, à microscopia óptica, aspecto espumoso.

Em 1997, VILANI-MORENO & OPRMOLLA estudaram várias colorações vitais para determinar a viabilidade do *L. loboi* e verificaram que a coloração com diacetato de fluoresceína-brometo de etídeo (DF-BE) é a mais adequada. Eles estabeleceram um índice de viabilidade e também realizaram a contagem de fungos, através da técnica do DF-BE, propondo a sua utilização para estudos relacionados com as tentativas de cultura e inoculação.

OPRMOLLA et al. (1999), estudando o método de coloração pela PM, verificaram que a coloração irregular dos fungos estava relacionada com os graus de degeneração deles e que o material granuloso argentofílico observado nos cortes histológicos correspondia aos restos das células fúngicas, como já havia sido referido por CHANDLER et al. (1980) e SESSO & BARUZZI (1988) na microscopia eletrônica.

1.2 - Tentativas de cultivo

JORGE LOBO (1933) acreditou ter isolado o fungo em meio de Sabouraud e relatou que as culturas eram obtidas com muita dificuldade e na temperatura de 26 a 30°. Em 1971, FONSECA & LACAZ, revendo cinco amostras de fungos pretensamente isoladas de casos da doença de Jorge Lobo, concluíram que a cultura *princeps* havia sido trocada na Micoteca do Instituto

Oswaldo Cruz, pois não havia mais dúvida de que o cultivo representava "cepa" típica de *P. brasiliensis*. Os autores estudaram essas cinco amostras baseando-se na uniformidade de seus aspectos macroscópicos, colônias muitas vezes cerebriformes e de crescimento em ágar-Sabouraud. Desse trabalho, concluíram que até 1971 o *L. loboi* não tinha sido isolado e que as culturas, obtidas daqueles casos clínicos, correspondiam a fungos sem qualquer relação etiológica com a doença em estudo.

Há, contudo, uma nota prévia de SAMPAIO (1974), em que ele informa que semeou material da lesão de um paciente com micose de Lobo, em um meio contendo soro fetal bovino, penicilina, anfotericina B e fitohemaglutinina e incubado a 37°C. O autor refere que encontrou, 20 dias mais tarde, um material esbranquiçado com imensa quantidade de fungos e acreditou ter cultivado com êxito, pela primeira vez, o agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Não há referências sobre a continuação desse trabalho. Depois disso, com relação a esse assunto, somente consta na literatura um estudo experimental realizado por SILVA (1994) que colocou material obtido de biópsia, rico em parasitas, sobre lâmina escavada com soro fisiológico glicerinado a 30% e vitamina B a uma temperatura de 4°C, obtendo, segundo esse autor, crescimento acentuado do fungo, com alterações em sua morfologia, aparecimento de tubos germinativos e micélios em septação.

1.3 - Aspectos imunológicos

Os estudos abordando os aspectos imunológicos da doença de Jorge Lobo são ainda muito escassos, possivelmente pelo fato do seu agente etiológico ainda não ter sido cultivado em meios artificiais. Dos estudos realizados envolvendo a resposta imune humoral, a maioria tem empregado antígenos do *P. brasiliensis* e de outros fungos, como *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) e *Blastomyces dermatitidis* (*B. dermatitidis*).

FONSECA & LACAZ, em 1971, utilizando antígenos do *P. brasiliensis* e empregando as técnicas de imunodifusão em gel de ágar, fixação de

complemento e precipitação em meio líquido, mostraram que os agentes da doença de Jorge Lobo e paracoccidioidomicose apresentam semelhanças antigênicas. Os dados obtidos serviram de argumento para a colocação dos dois microrganismos em um só gênero (LACAZ et al., 1986).

Em 1985, PUCCIA et al., empregando o antígeno purificado do *P. brasiliensis*, a glicoproteína gp43 e a reação de imunoprecipitação, obtiveram reações cruzadas em soros de pacientes com doença de Jorge Lobo. Recentemente, VIDAL et al. (1997), utilizando várias provas imunoquímicas, demonstraram a presença da gp43 em extratos de lesões cutâneas da doença de Jorge Lobo. Segundo esses autores, a glicoproteína de 43 kDa é um dos antígenos dominantes do *P. brasiliensis*, o que permitiu a identificação dessa espécie fúngica. CAMARGO et al., em 1998, empregando o teste de ELISA, reforçaram esses achados ao demonstrarem que 70% dos soros dos pacientes portadores da doença reagem positivamente com o antígeno gp43.

A avaliação da resposta imune celular tem sido pouco investigada. AZULAY et al. (1969, 1970) avaliaram a imunidade celular de vinte indivíduos portadores de doenças diversas, incluindo um com doença de Jorge Lobo e um com paracoccidioidomicose, a partir de uma suspensão de antígeno preparado com biópsia de paciente. Os resultados foram positivos em quatro pacientes, inclusive naqueles portadores da doença de Jorge Lobo e paracoccidioidomicose. Segundo LACAZ et al. (1986), o significado de tais provas em toda sua extensão é difícil de ser avaliado e sugere o preparo de uma "lobina" semelhante à Mitsudina que possa ser empregada em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Jorge Lobo, bem como em populações normais de áreas endêmicas e não endêmicas da doença, o que seria de grande interesse clínico e epidemiológico.

Mais recentemente, PECHER & FUCHS (1988) avaliaram a resposta imune celular de doze pacientes, usando testes intradérmicos com antígenos fúngicos e bacterianos, e teste de contato com dinitroclorobenzeno (DNCB), verificaram que grande parte dos pacientes não reagia aos testes realizados, exceto ao antígeno micobacteriano derivado protéico purificado do

Mycobacterium bovis (PPD) que foi positivo em todos eles. Assim, sugeriram que, na micose de Jorge Lobo, os pacientes sofrem de uma deficiência imune celular parcial.

A caracterização da população celular das lesões cutâneas dos pacientes, pelo método imunohistoquímico, revelou predominância de macrófagos, poucos linfócitos T, geralmente do fenótipo CD4⁺ (linfócito T auxiliar/efetor), e ausência de linfócitos B (ESTERRE et al., 1991).

Apesar desses dados, até o momento, não se tem conhecimento da participação do sistema imune no controle ou no desenvolvimento da doença de Jorge Lobo.

1.4 – Clínica

No primeiro caso descrito por JORGE LOBO em 1931, todas as lesões do paciente estavam localizadas na região lombossacra. A lesão inicial localizava-se à direita da coluna vertebral e as outras, que apareceram posteriormente, formavam um conjunto na região lombossacra, de numerosos nódulos queloidiformes, de vários tamanhos, uns isolados, outros confluentes. As lesões eram salientes, vegetantes, resistentes à pressão, duras, de cor castanho-claro, com uns pontos marfim nas partes mais elevadas. Não havia, em torno das lesões, nenhuma reação inflamatória e nenhuma reação ganglionar. O paciente não apresentava comprometimento visceral.

Posteriormente, vários trabalhos, avaliando os aspectos clínicos de novos casos da doença, foram publicados.

As lesões clínicas na micose de Jorge Lobo são muito polimorfas. Pode haver máculas, pápulas, placas, nódulos, gomas e também lesões verrucosas, cicatriciais e ulceradas. Estas últimas, muitas vezes, estão relacionadas a traumas; normalmente as lesões da doença de Jorge Lobo não ulceram espontaneamente.

Algumas classificações têm sido propostas para as formas clínicas dessa micose. SILVA (1972) as classifica em: a) infiltrativas; b)

queloidiformes; c) gomosas; d) ulceradas; e) verruciformes. Em um mesmo paciente, pode haver vários tipos de lesões, daí a dificuldade em classificar esses casos. O comprometimento do pavilhão auricular é o mais freqüente em algumas casuísticas e, em outras, os membros inferiores.

Formas clínicas, não usuais da micose de Jorge Lobo, foram descritas por vários autores. SILVA & BRITO (1994) publicaram um caso com forma insólita da enfermidade no lábio superior. Em 1995, SILVA & NEVES relataram mais dois casos da doença de Jorge Lobo e um deles apresentava, na região infra-orbitária direita, lesões nodulares chegando a invadir a mucosa ocular. SILVA et al. (1996) descreveram um caso extremamente raro da micose de Jorge Lobo em que as lesões nodulares evoluíam com as características das gomas, sem a compatibilidade histopatológica com esse quadro, e se dispunham ao longo da rede linfática do braço direito simulando esporotricose.

É raro o comprometimento ganglionar nessa micose segundo alguns autores, e há poucos casos com descrição histopatológica das lesões nos linfonodos. As vísceras não estão envolvidas nessa micose, mas há relato de um caso com lesão testicular descrito por TREJOS & ROMERO (1950) na Costa Rica.

OPROMOLLA et al. (1999) publicaram quarenta casos da doença de Jorge Lobo procedentes do estado do Acre. As lesões observadas foram formas infiltrativas, verrucosas e queloidianas. Em vários casos, as lesões eram queloidiformes, lisas, exibindo finas teleangectasias e pequenas áreas de aspecto xantomatoso na superfície. Havia também lesões de aspecto involutivo, mais aplanadas do que o restante das lesões em torno, que podiam apresentar pregueamento, mostrando diminuição do infiltrado inflamatório naquele local, como nos casos descritos por LACAZ et al. (1986). Os autores dividiram essas lesões apresentadas pelos pacientes em monomórficas e polimórficas, de acordo com a predominância de um só tipo de lesão ou a concomitância de vários tipos no mesmo doente. Com relação à sua distribuição, as lesões e os casos foram classificados como aqueles com lesões localizadas, aqueles com lesões multifocais (em um membro ou segmento de membro) e casos com lesões

disseminadas (envolvendo regiões anatômicas distintas). As lesões monomórficas localizadas foram observadas na maior parte dos quarenta casos e a localização mais freqüente foi o pavilhão auricular e, em um paciente, ambos os pavilhões auriculares estavam comprometidos, fato que ainda não havia sido observado por outros autores. Outros aspectos peculiares também foram observados. Um paciente apresentou lesões verrucosas plantares que não são muito freqüentes. Outro paciente apresentou lesões multifocais na coxa esquerda, com disposição linear ascendente, terminando junto a um linfonodo na região inguinal, sugerindo disseminação do fungo por via linfática. As cicatrizes evidentes, por vezes observadas, relacionavam-se geralmente à realização de freqüentes tentativas de tratamento cirúrgico a que alguns desses pacientes foram submetidos. Devido a isso, foi assinalado que o aspecto das lesões, em seu conjunto, diferiam entre as que foram manipuladas e as que nunca sofreram intervenção cirúrgica. Não foi verificado, nesse grupo de pacientes, anestesia ou hipoestesia das lesões cutâneas, como referem alguns autores.

1.5 - Aspectos histopatológicos

JORGE LOBO (1933) fez a primeira descrição da histopatologia da moléstia que leva o seu nome. Notou que o processo estava localizado na derme e que sua estrutura normal estava substituída por um processo de granulação, caracterizado pela presença de células plasmáticas, macrófagos, células gigantes e fibroblastos, constituindo o que ele chamou de granuloma inflamatório. Relatou, também, que havia absoluta integridade da epiderme, porém, em alguns pontos, ela estava adelgada e sem papilas devido à compressão do granuloma. Chamou atenção para o reduzido número de células gigantes, em contraste com o que, segundo ele, observa-se nas blastomicoses, nas quais são numerosíssimas. Os parasitas abundavam esparsos nos interstícios celulares e no interior de alguns gigantócitos. Havia evidente presença de fibroblastos e o autor destacou a presença de um tecido hialinizado, distribuído irregularmente na derme e que os granulomas achavam-se em torno dos vasos.

Em 1938, FIALHO, descrevendo um novo caso da doença de Jorge Lobo, notou, no exame histopatológico, que a epiderme estava adelgada; abaixo do extrato papilar encontrava-se intensa reação histiocitária, apresentando-se os histiócitos bem individualizados, com citoplasma bem corado, assim como o núcleo, em geral central. Ao lado das células histiocitárias, observou numerosas fibras colágenas e de reticulina. Ele também verificou, pela coloração do Sudan III, em cortes obtidos por congelação, grande quantidade de gotículas de lipoídes e ésteres colestéricos, com sua birrefringência habitual. Notou também que os histiócitos constituíam uma verdadeira "cultura" e que a quantidade de parasitas era tal que, no pequeno aumento, os cortes tomavam aspecto particular, como que finamente vacuolado. Fialho achou que muitos desses parasitas estavam mortos. As células gigantes estavam presentes e em grande número.

Uma descrição muito minuciosa dos aspectos histológicos da doença de Jorge Lobo foi feita por NERY-GUIMARÃES & MACEDO em seu caso publicado em 1950. Microscopicamente, observaram que a epiderme é delgada, reduzida a quatro ou cinco camadas de células achatadas, com queratinização insuficiente. Na proximidade de zona possivelmente ulcerada, a julgar pelo aparecimento de alguns piócitos no derma, nota-se ligeira acantose. Alguns núcleos de células malpighianas apresentam-se vesiculosos, sendo ausentes ou irregulares as tonofibrilas. Há completo desaparecimento das papilas dérmicas e uma nítida e leve ondulação da limitante basal. No derma, onde se localiza o parasito, ocorrem as principais lesões, delas resultando o aspecto tumoral da dermatose. Em geral, o processo infiltrativo, intenso e extenso, leva a epiderme ao adelgaçamento e à atrofia. As lesões dérmicas são celulares e fibrosas. De uma maneira geral, domina o campo um processo histiocitário difuso; células epitelióides e gigantes acumulam-se em todas as direções. Os gigantócitos ora tipo corpo estranho ora tipo Langhans são predominantes em certos trechos. Frequentemente, esses gigantócitos mostram-se como verdadeiros sincícios, claramente resultantes da divisão nuclear e coalescência das células epitelióides, as quais, por sua vez, resultam dos histiócitos. Notável, em alguns pontos do preparado, é a acidofilia dessas células, às vezes binucleadas. Quando os núcleos

dos gigantócitos são perifericamente localizados, os parasitos ocupam o centro da célula. Muitas vezes, essas células gigantes são desabitadas, seus contornos, nem sempre nítidos nos processos comuns de coloração, são postos em franca evidência pela impregnação argêntea. De distribuição irregular, semeados entre as células acima citadas, encontram-se polimorfonucleares, linfócitos e plasmócitos, estando, às vezes, estes últimos, reunidos em grande número. No derma profundo e hipoderma, aparecem os elementos que mais caracterizam histopatologicamente essa blastomicose. A princípio, em pequenos grupos, porém aumentando de número à medida que se afastam da epiderme, ocupando, por fim, extensas zonas e figuram lado a lado, sem nenhum outro tipo celular de permeio. São grandes células poligonais, de plasma vacuolar, espumoso e de núcleo compacto (*foamy cells*). Segundo os autores, essas células são elementos histiocitários e seus vacúolos, na verdade, imagens negativas de gotículas lipóides, carregadas pelos reativos da técnica histológica. Devido à compressão dessas gotículas, os núcleos desses histiócitos apresentam-se grosseiramente asteróides. Os autores citam FIALHO (1938) que evidenciou essas gotículas plasmáticas pelo Sudan III em cortes de congelação.

LEITE (1954) estudou três casos, dois com lesões localizadas no pavilhão auricular e um com lesões no nariz. Segundo LACAZ et al. (1986), esse autor estabeleceu algumas conclusões que são válidas até hoje, a saber: a) muito embora a principal característica histológica da doença de Jorge Lobo seja a reação histiocitária difusa, em alguns casos, pode-se observar a formação de autênticos granulomas; b) nos casos envolvidos, são freqüentes a fibrose, com lobulação do infiltrado e formação de pseudotubérculos; c) a invasão do derma, pelo infiltrado, pode culminar na destruição dos anexos cutâneos e das terminações nervosas da pele; d) o quadro histológico da doença de Jorge Lobo é bastante típico para permitir sua distinção de qualquer outra lesão blastomicótica; e) o número considerável dos parasitas e das gêmulas que formam, sua "imobilidade" e a ausência de exsudatos que possam deslocá-los são os principais fatores responsáveis pela doença; f) a ausência de inflamação aguda ou necrose, o

caráter permanentemente produtivo das lesões e sua localização indicam ser esta doença produzida por parasito de baixa virulência.

REYES et al., em 1960/1961, fizeram uma comunicação prévia de um caso observado na Venezuela. A descrição do quadro histopatológico nada acrescenta ao que foi referido por outros autores, mas há uma observação que é interessante salientar, o uso da coloração pelo Sudan III que demonstrou a presença de lipídios no granuloma e as estruturas parasitárias com gotas de lipídios, pequenas e grandes, no seu interior.

DESTOMBES & RAVISSE, em 1964, fizeram um estudo histológico de mais dois casos da doença de Jorge Lobo na Guiana Francesa. Eles também observaram os mesmos aspectos vistos em outras publicações. Contudo, destacam o comprometimento da hipoderme, com tendência a se expandir para a profundidade, e a lesão do linfonodo. Neste, eles descrevem um infiltrado que substitui quase todo o tecido ganglionar. As células gigantes, tipo corpo estranho e ricas em parasitas, formavam nódulos rodeados por histiócitos mononucleares xantomatosos que não apresentavam fungos, mas seu estado espumoso está ligado a uma grande quantidade de mucopolissacarídeos neutros. Outros autores descreveram aspectos semelhantes nos linfonodos de seus casos.

Em 1983, GADELHA & BANDEIRA destacaram que, na doença de Jorge Lobo, as características mais importantes para o diagnóstico histopatológico são as seguintes: a) epiderme atrófica e retificada; b) faixa de Unna; c) infiltrado granulomatoso em geral difuso e freqüentemente com várias células tipo corpo estranho e Langhans; d) histiócitos xantomizados; e) corpos asteróides; f) a coloração pelo Sudan III, em cortes de congelação, permite, às vezes, demonstrar, em algumas áreas, lipídeos sob a forma de grânulos e glóbulos.

Em 1990, FUCHS et al. apresentaram cinco casos da micose. Referem, além do que foi descrito por outros pesquisadores, que o quadro histopatológico é típico e que o *L. loboi* é um fungo que vive na derme mais profunda e no tecido subcutâneo. Comentam que, em alguns casos, é relatado o comprometimento do tecido muscular, mas a cartilagem não é afetada. Observam

ainda que a proliferação de fibras reticulares pode ser pronunciada ou moderada e os anexos cutâneos e nervos podem ser destruídos pela infiltração celular maciça.

Em uma outra revisão sobre a doença de Jorge Lobo, realizada por PRADINAUD & TALHARI, em 1996, além dos aspectos histológicos observados pela maioria dos autores, é referido o fato de que o interior das células fúngicas, às vezes, é praticamente vazio, mas, freqüentemente, contém inclusões vacuolares sudanófilas, nitidamente birrefringentes à luz polarizada. Os linfócitos T CD4⁺ são raramente observados, mas nenhum linfócito B.

Em 2000, OPRIMOLLA et al., procurando correlacionar clínico-patologicamente quarenta casos novos de lobomycose, verificaram que, apesar do freqüente acometimento do pavilhão auricular, histopatologicamente não se demonstrou invasão de cartilagem por infiltrados inflamatórios ou células fúngicas. Havia alterações epidérmicas em 65% dos casos. Pontilhados enegrecidos nas lesões correlacionavam-se à eliminação transepitelial de fungos. Vasos, nervos e anexos permaneciam inalterados no interior dos granulomas. O tecido celular subcutâneo exibia, em alguns casos, infiltrado inflamatório perilobular com fungos. Classificaram-se cinco tipos de células histiocitárias: histiócitos isolados contendo fungos; histiócitos agrupados em sincício, albergando até mais de treze células fúngicas muitas vezes catenuladas (92,5%); células gigantes tipo corpo estranho (100%); células gigantes tipo Langhans (57,5%); e células epitelióides rendilhadas. No interior das células gigantes de corpo estranho, ao contrário das de Langhans, os fungos eram numerosos. Tais células, com o Sudan negro, não evidenciaram lipídios, mesmo nas áreas clinicamente xantomizadas, como relatados por alguns autores. Os lipídios foram detectados somente no interior das células fúngicas. A coloração pela PM detectava uma poeira argentófila nas células epitelióides, correspondendo a restos de células fúngicas.

1.6- Inoculações experimentais

JORGE LOBO tentou reproduzir a doença experimentalmente, inoculando triturado de pele parasitada do seu paciente em cobaias, ratos e macaco Rhesus (*Macaca mulata*), não obtendo êxito (LOBO, 1933). A partir daí, muitas tentativas de reproduzir a doença em animais foram realizadas com a utilização de espécies, as mais variadas.

1.6.1 - Quelônios

SAMPAIO et al., em 1971, reproduziram a doença em quelônios da Amazônia que apresentaram lesões nodulares e isoladas. As lesões produzidas nos quelônios ("jabotís" - *Geochelone denticulata*, *Geochelone carbonaria*, e "muçuãs" - *Kinosternon scorpioides*) eram semelhantes às lesões humanas, formadas basicamente por granulomas histiocitários contendo fungos. Um desses animais (*Geochelone denticulata*) apresentou lesões após cinco meses de inoculação e elas exibiam uma grande quantidade de fungos.

1.6.2 – Tatus

Um tatu (*Euphractus sexcinctus*) foi inoculado por SAMPAIO & DIAS (1977) pela via subcutânea na região pélvica, apresentando lesão nodular após onze meses, riquíssima em parasitas e com intensa área de necrose. O tatu era proveniente do estado de Pernambuco. Na opinião dos autores, esta espécie de tatu parece ser adequada para o estudo experimental da doença.

1.6.3 - Cobaias, hamsters, camundongos e coelhos.

AZULAY (1963) utilizou o material do quarto caso publicado da doença de Jorge Lobo e observado por FONSECA FILHO, em 1943, e inoculou cobaias e ratos brancos, sem obter resultados positivos. Posteriormente,

CERRUTI & ZAMITH (1948) inocularam dez cobaias pelas vias testicular, peritoneal e subcutânea com resultados negativos. Ainda em 1948, ARÊA-LEÃO et al. realizaram inoculações em testículos de cobaias e camundongos, com material de cultura isolada do primeiro caso descrito por Jorge Lobo e que estava sendo mantida em repiques no Laboratório de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, e obtiveram a produção de uma orquite com formas parasitárias, apresentando cripto-esporulação, como se fora produzida pelo *P. brasiliensis*. Daí a impressão geral de que esses autores inocularam realmente esse fungo e não o *L. loboi* (CARNEIRO et al., 1968).

TREJOS & ROMERO, em 1950, tentaram reproduzir a doença em cobaias, realizando cinco inoculações por via intratesticular, com intervalos semanais, sem êxito. Em 1957, AZULAY & MIRANDA, com o triturado de pele parasitada de um paciente, realizaram inoculações em ratos brancos, cobaias, camundongos e hamsters, pelas vias intratesticular, intraperitoneal, subcutânea e intradérmica, sem obterem nenhum sucesso. Em 1958, CAMPO-AASEN inoculou material de lesões cutâneas em trinta e quatro camundongos, utilizando as vias peritoneal e cutânea. Nove animais receberam prednisona previamente e quatro animais foram irradiados, porém, os resultados foram negativos. A pesquisadora venezuelana inoculou também catorze ratos por via peritoneal, testicular, nasal e na cauda, com resultados negativos.

WIERSEMA & NIEMEL, em 1965, também realizaram exaustivas inoculações no coxim plantar de camundongos, obtendo a formação de granuloma, porém, os parasitas não apresentavam gemulação. No coxim plantar de dois hamsters, eles obtiveram granuloma idêntico ao humano com parasitas em gemulação.

AZULAY et al., em 1968, inocularam trinta e seis animais (dezenove ratos brancos, treze cobaias, dois camundongos e dois coelhos) pelas vias intratesticular, intradérmica (coxim plantar e orelha) e intraperitoneal; os inóculos foram de pele parasitada de pacientes. No testículo de um rato, eles observaram a formação de granuloma com parasitas em gemulação. Depois disso, esses autores realizaram mais sessenta inoculações a partir de biópsias retiradas de

pacientes portadores da micose. Os animais (cobaias, ratos, coelhos e camundongos) foram inoculados pelas vias intradérmica e intratesticular, tendo sido observadas alterações microscópicas, semelhantes àsquelas presentes na doença humana, em um camundongo, após treze meses e vinte e quatro dias de inoculação no coxim plantar, com a formação de um pequeno granuloma rico em formas arredondadas, com membranas de duplo contorno; um rato, inoculado intratesticularmente, apresentou vários granulomas de tamanhos variáveis e localizados entre os tubos seminíferos, após sete ou oito meses de inoculação. Nesses granulomas, observaram-se algumas células gigantes, histiócitos e uma grande quantidade de células redondas com membranas de duplo contorno, tal como acontece na doença humana. Foi constatada a presença de formas vazias, cheias, em limão, em crescente, com brotamento e em pequenas cadeias. Nos granulomas maiores, predominavam as cápsulas vazias e, nos menores, formas cheias ou jovens. Alterações macroscópicas também foram observadas no testículo esquerdo de outro rato, após oito meses de inoculação. No exame a fresco, foram observadas formas do *L. loboi*. Nos coelhos e cobaias não foram verificadas alterações microscópicas.

SAMPAIO & DIAS, em 1970, inocularam a bolsa jugal de vinte e dois hamsters *Mesocricetus auratus*, obtendo nódulos de 1,5 a 5,0 mm de diâmetro, constituídos de histiócitos e células gigantes contendo parasitas; inoculações subcutâneas nas patas e orelhas não produziram quaisquer lesões. Foi verificada a presença do fungo até cento e oitenta dias após a primeira inoculação. Material infectado, obtido da bolsa jugal, foi submetido à passagem em outros hamsters, produzindo lesões idênticas.

Em 1986, LACAZ et al. revisaram vários trabalhos realizados até então, relacionados a inoculações experimentais do fungo causador da doença de Jorge Lobo. Havia vários resultados positivos dessas inoculações, mas o número de animais de cada série que apresentavam lesões era pequeno e na maioria isolados. Somente um tatu apresentou a doença e dos inúmeros animais inoculados por AZULAY et al. (1968), apenas apresentaram algum resultado as inoculações realizadas no testículo de um rato e no coxim plantar de um

camundongo. WIERSEMA & NIEMEL (1965) conseguiram granulomas idênticos ao humano no coxim plantar de somente dois hamsters.

Os resultados interessantes obtidos por SAMPAIO & DIAS (1970), inoculando o fungo em bolsa jugal do hamster, não puderam ser reproduzidos por OPROMOLLA & NOGUEIRA, em 2000, que inocularam, via bolsa jugal de cento e cinquenta hamsters, número conhecido de fungos com seu índice de viabilidade determinado pela técnica do DF-BE.

OPROMOLLA et al. (1999) obtiveram êxito ao conseguirem manter a infecção em sessenta e quatro camundongos Suíços inoculados por via intradérmica em ambos coxins plantares traseiros. Contudo, não ocorreram alterações macroscópicas e o número de fungos recuperados sempre foi muito próximo do inoculado. Os mesmos autores, inoculando camundongos da linhagem BALB/c, observaram a presença de alterações macroscópicas consideráveis nas patas desses animais a partir do sétimo mês da inoculação, com granulomas semelhantes àqueles observados na doença humana e com uma enorme quantidade de fungos (MADEIRA et al., 2000).

1.6.4 - Golfinhos

Um dos fatos mais curiosos no estudo da doença de Jorge Lobo é o encontro espontâneo dessa doença em golfinhos, sob a forma de lesões geralmente úlcero-crostosas, localizadas mais comumente na cauda ou dorso desses animais, não sendo descritas lesões viscerais. É difícil conhecer a história natural da doença entre esses animais, bem como eles se infectam, mas é provável que um dos reservatórios do fungo na natureza seja a água ou coleções líquidas (LACAZ et al., 1986). O primeiro caso foi descrito por MIGAKI et al. (1971) em um golfinho (*Tursiops truncatus*) capturado na costa oeste da Flórida. Um segundo caso, também na Flórida, foi objeto de estudo de WOODWARD (1972). DE VRIES & LAARMAN (1973) descreveram um novo caso da doença em um animal (*Sotalia guianensis*) capturado no estuário do rio Surinam. Em 1970, um animal foi capturado na Baía de Biscaia, ao norte do Golfo de Gasconha (Europa).

O diagnóstico inicial foi de sarcoma e constituiu-se no primeiro caso de golfinho com Doença de Jorge Lobo capturado em águas europeias, sugerindo eventual locomoção desses animais através do Atlântico (SYMMERS, 1983).

2. Objetivos

Avaliar a susceptibilidade de camundongos isogênicos das linhagens BALB/c e B10.A à infecção pelo fungo *L. loboi*, comparando-se o aspecto histopatológico das lesões produzidas, número de células fúngicas e índice de viabilidade obtidos nos diferentes períodos de sacrifício.

Verificar se o padrão de resposta aos parâmetros avaliados nos animais isogênicos é homogêneo, de modo a permitir correlação dos resultados entre si.

3. Material e Métodos

3.1 - Instituição envolvida

O presente estudo foi realizado nos laboratórios das Equipes Técnicas de Microbiologia e de Patologia do Instituto “Lauro de Souza Lima” (ILSL) - Bauru / São Paulo.

3.2 – Paciente

Foi selecionado, para este estudo, um paciente do sexo masculino, portador da doença de Jorge Lobo, proveniente do Estado do Acre e que apresentava lesões localizadas em membro inferior.

O paciente foi esclarecido quanto ao objetivo do estudo e assinou o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelos Comitês de Ética Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e de Ética em Pesquisa do ILSL.

3.3 - Métodos

3.3.1 – Biópsia

Foi retirada, em condições assépticas, uma lesão de 2,5cm de comprimento por 1,5cm de largura, localizada em membro inferior. Uma pequena amostra da lesão foi enviada ao setor de Anatomia Patológica do ILSL, para realização dos exames histopatológicos e o restante imediatamente enviado ao laboratório da Equipe Técnica de Microbiologia do ILSL.

Dentro de uma placa de Petri, o fragmento foi lavado com soro fisiológico, para remoção do excesso de sangue, sendo, em seguida, transferido

MATERIAL E MÉTODOS

para uma nova placa. Com auxílio de uma tesoura de ponta curva, a biópsia foi cortada em pedaços bem pequenos que foram transferidos para um homogeneizador de tecidos, contendo 7ml de solução salina (SS) 0,85%. Após cinco minutos de homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso por um minuto para precipitação dos aglomerados de tecido. Em seguida, o sobrenadante foi transferido, com auxílio de uma pipeta, para um tubo de ensaio. Todo esse procedimento foi realizado com material estéril e no interior de uma câmara de fluxo laminar.

3.3.2 - Suspensão fúngica (biópsia)

Determinação do número total de células fúngicas: 10 μ l da suspensão foram depositados em câmara hemocitométrica de Neubauer, com 0,1mm de profundidade e 0,0025mm² de área. O valor obtido com a contagem dos fungos foi expresso em número absoluto. A suspensão possuía 9×10^5 fungos/ml ou $2,7 \times 10^4$ fungos/0,03ml.

Determinação do índice de viabilidade: foi utilizada a coloração vital com DF-BE (CALICH et al., 1978), padronizada para o *L. loboi* por VILANI-MORENO & OPROMOLLA (1997). Uma solução estoque de DF foi preparada em acetona na concentração de 5,0mg/ml e mantida a -20°C; a solução de BE foi preparada em SS na concentração de 5,0mg/ml e mantida a 4°C. Para uso, as soluções DF e BE foram diluídas 1:100 em SS. Volumes iguais de DF (100 μ l) e BE (100 μ l) e da suspensão fúngica (200 μ l) foram misturados e incubados a 37°C por quinze minutos. Uma amostra de 10 μ l desta mistura foi examinada em microscópio de fluorescência e foram considerados fungos viáveis aqueles que apresentaram coloração verde fluorescente. O valor obtido foi expresso em porcentagem. O índice de viabilidade obtido na suspensão foi de 45%.

MATERIAL E MÉTODOS

3.3.3 – Inoculação

A inoculação foi realizada imediatamente após os procedimentos de determinação do número de células fúngicas e índice de viabilidade.

Animais: foram utilizados quarenta e quatro camundongos da linhagem BALB/c (vinte e seis fêmeas e dezoito machos) e quarenta e quatro da linhagem B10.A (vinte e três fêmeas e vinte e um machos) com dois meses de idade. Os camundongos BALB/c foram adquiridos no setor de Biotério do ILSL e os B10.A foram comprados do Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo.

Via de inoculação: utilizando-se uma seringa de 1ml, os animais foram infectados por via intradérmica em ambos coxins plantares traseiros, com 0,03ml da suspensão fúngica.

Tempo de inoculação: quatro camundongos BALB/c e 4 B10.A foram aleatoriamente sacrificados nos seguintes intervalos de tempo: vinte e quatro e setenta e duas horas (h), sete e quinze dias (d), um, quatro, sete, dez, treze, dezesseis e dezoito meses (m) pós-inoculação (p.i.). Os animais foram anestesiados com éter e, em seguida, mortos por deslocamento cervical.

3.3.4 - Análise histopatológica

Com auxílio de uma lâmina de bisturi, ambos coxins plantares foram excisados, sendo um deles encaminhado ao Setor de Anatomia Patológica do ILSL, onde foram recortados e os fragmentos preparados pela técnica habitual para inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram corados pelos métodos de HE e PM.

As lâminas foram avaliadas e descritas quanto ao tamanho dos infiltrados inflamatórios, predominância de células (histiócito, histiócito com citoplasma de aspecto rendilhado, linfócito, plasmócito, mastócito,

MATERIAL E MÉTODOS

polimorfonuclear, fibroblasto, célula gigante tipo Langhans e corpo estranho) e número de células fúngicas nas lesões.

3.3.5 – Determinação do número de células fúngicas e índice de viabilidade na suspensão obtida do coxim plantar.

O coxim plantar foi removido com uma lâmina de bisturi e macerado em 1ml de SS. O procedimento foi o mesmo utilizado para a biópsia obtida do paciente. A determinação do número de fungos foi realizada em câmara de Neubauer e o resultado expresso em valor absoluto.

A determinação do índice de viabilidade foi realizada imediatamente após a obtenção da suspensão, utilizando-se a técnica de coloração vital com DF-BE e os resultados quantificados da mesma maneira que para a biópsia obtida do paciente.

3.3.6 – Documentação fotográfica

As lâminas com os cortes histológicos foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss®, modelo Axiolab MC 80, e as fotos dos camundongos foram obtidas em câmara Pentax® MZ-M, auto-exposição TTL multimodo 35mm SLR.

Todas as fotos obtidas foram submetidas a *scanning* no sistema Scanner Nikon® Scantouch AX 210 e arquivadas no programa Adobe Photoshop 4.0. A impressão foi realizada em impressora laser Tektronic® 780 Phaser.

3.3.7 - Análise estatística

As análises do número de células fúngicas e índice de viabilidade, segundo grupo experimental (linhagens BALB/c e B10.A) e tempo de sacrifício, foram realizadas pelo teste não-paramétrico, para o modelo com dois fatores (grupo experimental e tempo de sacrifício), complementado com

MATERIAL E MÉTODOS

respectivo teste de comparações múltiplas (STREINER & NORMAN, 1994). Todas as análises foram realizadas com 5% de significância.

A análise de associação entre as variáveis índice de viabilidade, número de células fúngicas e tempo de evolução das lesões macroscópicas foi realizada utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman (STREINER & NORMAN, 1994).

4. Resultados

4.1 – Linhagem BALB/c

4.1.1 – Análise histopatológica.

Na análise histopatológica do coxim plantar de camundongos da linhagem BALB/c, sacrificados em diferentes períodos de tempo, sempre se observaram infiltrados inflamatórios, localizados entre ou sobre os feixes de fibras musculares, envolvendo nervos e vasos.

Após vinte e quatro horas da inoculação, notaram-se um pequeno infiltrado histiocitário rico em polimorfonucleares (PMN) e áreas de necrose em alguns pontos. Linfócitos e fibroblastos foram vistos em pequena quantidade, difusamente espalhados pelo infiltrado. Na coloração pela PM, verificou-se que o número de fungos era pequeno e muitos deles isolados.

Com setenta e duas horas, o infiltrado era um pouco maior do que o anterior, com um número maior de células histiocitárias e linfocitárias. Áreas de necrose foram vistas, apesar de a quantidade de PMN ser menor. Fibroblastos e fibras colágenas estavam esparsas, permeando o infiltrado e o número de fungos; o seu aspecto não diferiu do observado anteriormente.

Após sete dias, os histiócitos eram predominantes no infiltrado, com células contendo ou não fungos em seu interior. Entre os histiócitos, foram vistos poucos linfócitos, PMN e fibroblastos. O número de fungos ainda era pequeno e, na coloração pela PM, muitos deles apresentavam aspecto de cápsulas vazias e, as demais formas, bem coradas e íntegras.

Aos quinze dias, o infiltrado era maior, com predomínio de células histiocitárias, a maioria delas apresentando citoplasma de aspecto rendilhado. Linfócitos e PMN eram poucos e estavam difusamente distribuídos pelo infiltrado. Fibroblastos estavam presentes em várias áreas do infiltrado e, na

RESULTADOS

coloração pela PM, o aspecto dos fungos era semelhante ao observado em tempos anteriores.

Um mês após a inoculação, o infiltrado era essencialmente macrofágico, formando blocos de células, separados entre si por fendas contornadas por alguns fibroblastos. Numerosas células histiocitárias continham fungo em seu interior, mas a maioria não os continha e eram essas que apresentavam citoplasma de aspecto rendilhado. Linfócitos, fibroblastos e PMN foram vistos em pequenas quantidades, difusamente espalhados pelo infiltrado (Figuras 1 e 2). Na coloração pela PM, os fungos ainda eram poucos, alguns bem corados, isolados e outros com aspecto degenerado (Figura 3).

No quarto mês p.i., foi observado um nítido aumento no tamanho do infiltrado, que era constituído por histiócitos, contendo ou não fungo, e células gigantes tipo corpo estranho. Havia uma pequena quantidade de plasmócitos, linfócitos e PMN e, em algumas áreas, o infiltrado assumia aspecto sincicial, com muitos núcleos envolvidos por material citoplasmático, sem limites precisos. Os fibroblastos foram vistos com maior frequência e o número de fungos era nitidamente maior do que o observado anteriormente (Figura 4). Na coloração pela PM, observaram-se muitos deles com gemulação única ou formando figuras tipo “Mickey Mouse” ou ainda exibindo formas catenuladas com cadeias de três a quatro fungos.

Após sete meses, o infiltrado era moderado, separado em blocos por fendas que apresentavam fibroblastos e finas fibras colágenas em sua periferia. Esses infiltrados continham numerosas células gigantes, do tipo corpo estranho e tipo Langhans, e histiócitos contendo fungos. Linfócitos, plasmócitos, PMN e histiócitos, com citoplasma de aspecto rendilhado, foram vistos em pequena quantidade, permeando o infiltrado (Figura 5). O número de fungos foi maior do que o observado anteriormente e muitos deles exibiam sinais de viabilidade, ou seja, apresentavam algumas formações no interior de seu citoplasma. Na coloração pela PM, esse aspecto tornou-se bem evidente, com numerosas células fúngicas bem coradas, exibindo muitas formas em brotamento ou formando cadeias com três ou quatro células.

No décimo mês pós-inoculação, o infiltrado era grande, compacto, semelhante ao observado no sétimo mês, com muitos fibroblastos e fibras colágenas. A quantidade de células gigantes era grande, porém os histiócitos com citoplasma rendilhado foram menos frequentes do que observado anteriormente. O número observado de fungos foi maior e muitos deles apresentavam aspecto de viabilidade. Na coloração pela PM, o aspecto do fungo era o mesmo que aos sete meses.

O infiltrado apresentou-se mais compacto após treze meses, com predomínio de células gigantes, e grande número de fungos. Na coloração pela PM, porém, as formas mal coradas aumentaram sensivelmente em relação ao período anterior.

Aos dezesseis meses, o aspecto do infiltrado continuava o mesmo, contudo, com maior quantidade de fungos. Na coloração pela PM, esse aspecto foi mais evidente e muitos deles apresentavam-se bem corados e, os demais, com aspecto degenerativo.

Dezoito meses depois da inoculação, o infiltrado era intenso, separado em blocos por fendas contornadas por fibras colágenas e fibroblastos, e constituído predominantemente por células gigantes tipo corpo estranho e tipo Langhans, algumas delas contendo até vinte núcleos e com grande número de fungos em seu citoplasma (Figuras 6 e 7). Plasmócitos, linfócitos e fibroblastos em quantidade moderada estavam distribuídos difusamente pelo infiltrado. Áreas de necrose foram vistas em alguns blocos, com numerosos PMN. Na coloração pela PM, notou-se um imenso número de células fúngicas, porém, muitas delas estavam mal coradas e em processo degenerativo (Figura 8).

4.1.2. Lesões macroscópicas

Foram observadas alterações macroscópicas em quinze (34%) animais avaliados, sendo que nove (60%) apresentaram essas manifestações em ambos coxins plantares e seis (40%), em apenas um deles.

As primeiras alterações foram observadas em dois animais após sete meses de inoculação e o tempo de aparecimento variou entre sete a quinze meses p.i. Essas alterações caracterizaram-se pelo aparecimento de nódulos e pelo aumento do volume das patas, tiveram início na região dorsal ou superfície plantar (Figura 9), evoluindo rapidamente em tamanho, deformando o coxim plantar em alguns casos (Figuras 10 e 11). Os nódulos eram de consistência firme e com superfície lisa. Na superfície das lesões maiores e com mais tempo de evolução, foram observados alguns vasos sanguíneos dilatados na sua superfície. (Figura 12).

Todos os animais que possuíam lesões macroscópicas estavam aparentemente em bom estado físico no momento em que foram sacrificados. O número de animais com lesões macroscópicas, o tempo de evolução das lesões e o índice de viabilidade dos fungos, nos diferentes períodos de sacrifício, estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

A medida de associação entre as variáveis tempo de evolução da lesão, índice de viabilidade e número de células fúngicas está expressa na tabela 3. Não foi observada correlação entre as variáveis índice de viabilidade e número de células fúngicas ($r = -0,25$; $p > 0,05$). Entre as variáveis índice de viabilidade e tempo de evolução da lesão observou-se correlação negativa ($r = -0,66$; $P < 0,01$) e correlação positiva entre número de células fúngicas e tempo de evolução da lesão ($r = 0,71$; $P < 0,01$).

4.1.3 – Quantidade obtida de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício

A quantidade obtida de células fúngicas, nos diferentes períodos de sacrifício, está expressa na tabela 4 e foi calculada pela mediana dos 4 animais sacrificados em cada período de tempo. Foi observado um aumento progressivo nos valores obtidos no decorrer do experimento, superando aquele do inóculo, a partir de quatro meses.

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas ao serem comparadas as quantidades de células fúngicas obtidas entre os tempos de vinte e quatro horas, setenta e duas horas, sete dias, quinze dias, um mês, quatro meses, sete meses, dez meses, treze meses e dezesseis meses. O tempo de dezoito meses foi estatisticamente diferente de todos os demais tempos ($P < 0,05$). (Tabela 4)

Em todos os animais (100%) avaliados no decorrer do experimento, foram observadas células fúngicas.

4.1.4. Índice de viabilidade obtido nos diferentes períodos de sacrifício.

O índice de viabilidade obtido nos diferentes períodos de sacrifício está expresso na tabela 5 e foi calculado pela mediana dos quatro animais sacrificados em cada período de tempo.

Não houve diferença significativa entre os índices obtidos nos diferentes períodos de sacrifício ($P > 0,05$) (Tabela 5).

Não foram vistos fungos viáveis em quatro animais (9%) dos quarenta e quatro avaliados.

4.2. – Linhagem B10.A

4.2.1. Análise histopatológica

A análise histopatológica do coxim plantar nos camundongos da linhagem B10.A, sacrificados em diferentes períodos de tempo p.i., demonstrou a presença de infiltrados inflamatórios localizados entre ou sobre os feixes de fibras musculares, envolvendo nervos e vasos.

Após vinte e quatro horas, havia um pequeno infiltrado inflamatório constituído por histiócitos e muitos PMNs difusamente distribuídos, formando agrupamentos em algumas áreas onde havia necrose. Foram vistos

RESULTADOS

poucos fungos e alguns deles estavam fagocitados por células histiocitárias contendo um ou dois núcleos. Os linfócitos e fibroblastos estavam presentes em pequeno número e esparsos, permeando o infiltrado. Na coloração pela PM, foram vistos poucos fungos, em sua maioria mal corados e isolados.

Depois de setenta e duas horas, o infiltrado apresentava o mesmo aspecto observado anteriormente, com células histiocitárias, contendo ou não fungos em seu interior, e PMN. Na coloração pela PM, o aspecto dos fungos não havia se alterado.

A lesão sete dias p.i. apresentou um infiltrado compacto, maior do que aqueles já observados, constituído basicamente por PMN e também histiócitos distribuídos por todo o infiltrado. Entre as células histiocitárias, foram vistas muitas células com citoplasma de aspecto rendilhado, células endoteliais, fibroblastos e poucos linfócitos. Havia fungos circundados por dois ou três núcleos e também histiócitos isolados com uma única célula fúngica em seu interior. O número de fungos ainda era pequeno, muitos fungos apresentando o aspecto de cápsulas vazias. Na coloração pela PM, esse aspecto era mais evidente.

Após quinze dias, o infiltrado era predominantemente histiocitário, difuso e com áreas onde se observavam algumas células com citoplasma de aspecto rendilhado. O número de PMN era menor, porém ainda bem evidente e as células estavam espalhadas por todo o infiltrado. Foram vistos poucos linfócitos, raros plasmócitos e uma moderada quantidade de fibroblastos envolvendo o infiltrado. Havia fungos em pequena quantidade, alguns se apresentavam bem corados pela PM.

Após um mês, observou-se a presença de um infiltrado moderado, constituído por células histiocitárias com ou sem fungos em seu interior. PMN sempre em maior número do que os linfócitos e os fibroblastos foram vistos em quantidades moderadas permeando o infiltrado. Em alguns pontos foram vistas algumas células mal delimitadas, com mais de um núcleo, sugerindo a formação de uma célula gigante (Figuras 13 e 14). O número de fungos era pequeno e a maioria apresentava o aspecto de cápsulas vazias. Na

coloração pela PM, observaram-se algumas formas bem coradas e poucos fungos, na maioria isolados (Figura 15).

Aos quatro meses, observou-se um nítido aumento no volume do infiltrado que estava dividido em vários blocos de tamanhos diferentes, separados por fendas emolduradas por fibras colágenas e fibroblastos. Numerosas células, com citoplasma de aspecto rendilhado, e células gigantes tipo corpo estranho, com citoplasma mal delimitado e contendo fungos no seu interior, foram vistas (Figura 16). Em alguns pontos, essas células estavam agrupadas, dando a impressão de estarem fundidas umas às outras. Fibroblastos, em quantidade moderada, poucos linfócitos, mastócitos e PMN foram vistos distribuídos difusamente pelo infiltrado. O número de fungos observados na lesão foi maior do que o observado nos tempos anteriores e, na coloração pela PM, havia muitas formas bem coradas, em halteres e catenuladas.

Após sete meses, observou-se um predomínio de células gigantes mal delimitadas e histiócitos isolados, contendo fungo em seu interior (Figura 17). Os linfócitos foram vistos em número um pouco maior do que nos tempos anteriores, porém ainda eram poucos. Foram observados, também, um aumento no número de PMN, algumas áreas necróticas e um pequeno número de mastócitos. A quantidade de fungos foi semelhante à observada no quarto mês e, pela PM, muitos deles apresentavam formas em brotamento e também bem coradas.

Aos dez meses p.i., o infiltrado era grande, dividido em blocos constituídos por muitas células com citoplasma de aspecto rendilhado, histiócitos e células gigantes mal delimitadas. Mastócitos e linfócitos estavam presentes em pequeno número. A quantidade de PMN era nitidamente maior, formando pequenos abscessos em alguns pontos. O número de fungos era grande, muitos deles com aspecto de cápsulas vazias, porém, na coloração pela PM, observaram-se formas bem coradas e em processo de brotamento.

Após treze meses, o aspecto do infiltrado foi semelhante, com muitas células histiocitárias isoladas ou formando células gigantes. Numerosos PMN estavam presentes em áreas de necrose. O número de fungos foi semelhante

ao visto no décimo mês e, na coloração pela PM, o aspecto dos fungos também não diferiu.

Após dezesseis meses, a lesão era semelhante à observada anteriormente, com infiltrado grande, dividido em blocos, contendo em seu interior maior quantidade de fibroblastos. O número de células fúngicas e as características morfológicas não diferiram das observações nos quatro e sete meses.

Aos dezoito meses, o infiltrado era intenso, bastante celular, compacto, também dividido em blocos de tamanhos variados, separados por fendas, apresentando, na periferia, alguns fibroblastos (Figura 18). No interior de alguns blocos, notava-se moderada quantidade de fibras colágenas e as células com citoplasma de aspecto rendilhado eram predominantes. Células gigantes mal delimitadas estavam presentes, sendo a maioria do tipo corpo estranho, mas havia células com os núcleos dispostos na periferia do citoplasma, sugerindo a formação de células gigantes tipo Langhans (Figura 19). As células mononucleares eram esparsas e os PMN, embora em pequeno número, chegavam a formar grupamentos em algumas áreas. Mastócitos eram evidentes, porém em pequena quantidade. Muitos fungos foram observados e, na coloração pela PM, observava-se que o número de células fúngicas era grande, algumas mal coradas, apresentando formas catenuladas e em halteres e algumas com aspecto de cápsulas vazias (Figura 20).

4.2.2. Alterações macroscópicas

Não foram observadas alterações macroscópicas em nenhum dos animais avaliados (Figura 21).

4.2.3 – Quantidade obtida de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício

A quantidade obtida de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício está expressa na tabela 4 e foi calculada pela mediana dos 4 animais sacrificados em cada período. Os valores obtidos, a partir de quatro meses, foram superiores ao do inóculo.

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas ao se comparar a quantidade obtida de células fúngicas entre os tempos de vinte e quatro horas, setenta e duas horas, sete dias, quinze dias, um mês, quatro meses, sete meses, dez meses, treze meses e dezesseis meses. ($P < 0,05$). O tempo de dezoito meses foi estatisticamente diferente de todos os demais ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Em todos os animais (100%) avaliados, no decorrer do experimento, foram observadas células fúngicas.

4.2.4 - Índice de viabilidade obtido nos diferentes períodos de sacrifício.

O índice de viabilidade obtido nos diferentes períodos de sacrifício está expresso na tabela 5 e foi calculado pela mediana dos 4 animais sacrificados em cada período de tempo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os índices obtidos nos diferentes períodos de sacrifício ($P > 0,05$).

Não foram vistos fungos viáveis em dezessete (38%) dos animais avaliados.

4.2.4.1 Número de células fúngicas e índice de viabilidade obtidos nos diferentes períodos de sacrifício entre as linhagens BALB/c e B10.A

RESULTADOS

Comparando-se a quantidade obtida de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício entre as linhagens BALB/c e B10.A, foram observadas diferenças estatisticamente significativas somente entre os tempos de treze meses, dezesseis meses e dezoito meses p.i. ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Os índices de viabilidade apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de vinte e quatro horas, sete dias, sete meses e dezesseis meses p.i. ($P < 0,05$) (Tabela 5).

RESULTADOS

Tabela 1. - Número de camundongos BALB/c com lesões macroscópicas nos diferentes períodos de sacrifício.

Período de sacrifício	Nº de animais (n=44)
24h	0
72h	0
7d	0
15d	0
1m	0
4m	0
7m	2
10m	2
13m	3
16m	4
18m	4
TOTAL	15 (34%)

5. Discussão

Estudos experimentais envolvendo animais são muito importantes para se adquirir, em profundidade, conhecimentos sobre as mais diversas doenças humanas. Embora nem sempre seja possível reproduzir, nos modelos animais, as mesmas condições humanas, o objetivo principal desse tipo de estudo é proporcionar respostas a questões específicas sobre a doença em estudo. De modo geral, a experimentação animal tem gerado importantes informações relacionadas às pesquisas básica e aplicada, sendo, esta última, de grande valor na medicina humana.

Os mecanismos patogênicos da tuberculose, por exemplo, tornaram-se conhecidos a partir de observações do desenvolvimento da infecção em animais.

Em 1960, SHEPARD iniciou uma nova era na pesquisa da hanseníase, ao demonstrar que o *Mycobacterium leprae*, que não é cultivável em meios artificiais, multiplicava-se de forma limitada em coxim plantar de camundongos imunologicamente normais. O êxito obtido por Shepard permitiu que fossem conhecidos o tempo de multiplicação do bacilo, as linhagens mais susceptíveis à infecção e o fato de que o número de bacilos presentes no inóculo influencia no padrão de resposta do animal (SHEPARD et al., 1967; LEVY, 1975; KAWAGUCHI, 1972). Além desses aspectos, a padronização do modelo experimental tornou possível a realização de estudos terapêuticos a partir do estabelecimento de uma metodologia para a inoculação do *Mycobacterium leprae* nesses roedores (LEVY, 1987).

Na paracoccidiodomicose, os modelos experimentais utilizados têm permitido confirmar os achados clínicos e laboratoriais dos pacientes e também fornecer subsídios para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na depressão da resposta imune celular observada na doença humana; os modelos murinos têm sido muito utilizados para estudar esses aspectos. Por exemplo, em 1985, CALICH et al. inocularam intraperitonealmente, com *P.*

brasiliensis, nove diferentes linhagens “inbred” de camundongos e verificaram que a linhagem A/Sn era mais resistente, enquanto as linhagens B10D2/nSn, B10.A e B10D2/0Sn eram mais susceptíveis à infecção. Observaram também que essas diferenças de susceptibilidade não dependiam da concentração do inóculo e nem do sexo dos animais.

O fungo *L. loboi* não é cultivável em meios de cultura 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. A existência desse modelo tornaria possível compreender melhor os mecanismos de patogenicidade do fungo e também estudar os aspectos microbiológicos, imunológicos, bioquímicos e terapêuticos. Estudos experimentais, com o *L. loboi*, realizados em animais de laboratório, até há alguns anos, produziram resultados limitados e isolados.

Um dos mais importantes desses trabalhos foi realizado por SAMPAIO & DIAS (1970). Os autores implantaram pequenos fragmentos da lesão obtida de paciente portador da doença na bolsa jugal de hamsters. No início, a infecção era exudativa, com área de necrose contendo muitos PMN e na periferia da lesão havia histiócitos e fungos eram vistos em toda a área. Após cento e oitenta dias de inoculação, a lesão era formada por nódulos, constituídos de histiócitos e células gigantes contendo fungos, tendo sido, esses achados histopatológicos, considerados semelhantes ao que era observado na infecção humana. Esses achados, porém, não foram reproduzidos por outros autores.

Outro trabalho importante, também realizado por SAMPAIO et al. (1971). Esses autores implantaram pequenos fragmentos obtidos de biópsias de um paciente portador de doença de Jorge sob a região dorsal e ventral da cloaca e na porção frontal da perna de três espécies diferentes de quelônios da região amazônica brasileira. As lesões obtidas eram semelhantes à lesão humana e constituídas basicamente de granulomas com histiócitos contendo um ou mais fungos. Fibroblastos e células gigantes com fungos em seu interior também estavam presentes. A lesão mais notável foi observada em um animal cinco meses

após o implante, no qual formas incomuns do fungo foram observadas. Esses achados também não foram reproduzidos por outros autores.

Em 1977, SAMPAIO & DIAS inocularam um tatu *Euphractus sexcinctus*, na região pélvica, com 0,5ml de uma suspensão rica em fungos. Após cinco meses, os autores observaram a formação de um nódulo palpável no local da inoculação que evoluiu rapidamente em tamanho. Aos onze meses da inoculação, o animal foi sacrificado e a lesão removida. O exame histopatológico da lesão revelou a presença de extensas áreas de infiltrado granulomatoso, composto por células gigantes com muitos fungos em seu citoplasma, circundadas por histiócitos. Alguns linfócitos e raros plasmócitos e eosinófilos foram vistos entre os histiócitos. Grande quantidade de fungos foi vista, muitos deles em brotamento ou formando cadeias de cinco ou seis células fúngicas. O que chamou a atenção dos autores foi a presença de áreas de necrose acompanhadas de infiltração neutrofílica, fato que geralmente não se observa na doença humana. Embora os achados histopatológicos encontrados na lesão tenham sido, em parte, diferentes do que são observados no homem, eles concluíram que o tatu era mais susceptível ao fungo do que o homem e que esse animal poderia ser adequado para o estudo experimental da doença de Jorge Lobo. Apesar de os autores considerarem o tatu um animal adequado para o estudo da doença, mesmo utilizando apenas um único animal, nenhum outro trabalho experimental foi realizado com essa espécie.

Analisando-se os trabalhos experimentais, realizados no passado, pode-se observar que não existia uma metodologia padronizada para a inoculação do *L. loboi*. A análise dos resultados sempre foi realizada com base nos achados histopatológicos e, em nenhum deles, foi referida a quantidade de células fúngicas inoculadas e recuperadas após o sacrifício. Técnicas que pudessem avaliar a viabilidade dos fungos presentes nas suspensões e as linhagens de animais utilizadas, especialmente de camundongos, também não foram mencionadas.

Em 1999, OPROMOLLA et al. estabeleceram pela primeira vez uma metodologia de inoculação, a partir da contagem do número de células fúngicas em câmara de Neubauer e determinação do índice de viabilidade pela

técnica do DF-BE, antes e após inoculação. Utilizando camundongos Suíços, os autores conseguiram bons resultados ao manter a infecção por um ano e seis meses nesses animais. Um infiltrado celular, constituído essencialmente por macrófagos com fungos no seu interior, foi aumentando progressivamente até o final da experimentação, sem alterações macroscópicas dos coxins plantares inoculados. No final do experimento, obteve-se um número considerável de fungos, mas somente alguns deles estavam viáveis. Com esses achados, os autores concluíram que, apesar da manutenção da infecção, os camundongos Suíços não poderiam ser considerados um modelo ideal para o estudo da doença de Jorge Lobo. Seguindo a mesma metodologia, MADEIRA et al. (2000) conseguiram reproduzir a doença em camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, obtendo, no final do experimento, uma grande quantidade de fungos, muitos deles viáveis, e a manifestação clínica da doença com formação de lesões macroscópicas de aspecto nodular nos coxins plantares inoculados.

Considerando-se os resultados diferentes obtidos entre as duas linhagens, foi proposta a realização do presente estudo, com o objetivo de comparar a evolução da infecção entre BALB/c e outra linhagem isogênica.

Na paracoccidiodomicose experimental, foi verificado que diferentes espécies animais exibem diferentes padrões de susceptibilidade ao *P. brasiliensis*. Esse padrão de susceptibilidade pode variar também dentro de uma mesma espécie de acordo com idade, sexo e linhagem do animal, bem como o inóculo, virulência do fungo e até mesmo a via de inoculação (COELHO, K.I.R. et al., 1994). Isso é importante por que, quando todas essas variáveis são adequadamente controladas, os estudos experimentais permitem, entre outras coisas, determinar a interação entre parasita-hospedeiro, característica das lesões em sua fase progressiva, forma e via de disseminação do fungo, morfologia do agente no tecido, o papel da imunoestimulação no desenvolvimento da doença, a susceptibilidade de diferentes órgãos ao ataque do fungo, bem como o papel das células inflamatórias na modulação da resposta imune e curso da doença. Em 1995, SINGER-VERMES et al. obtiveram diferentes padrões de sensibilidade à

infecção pelo *P. brasiliensis*, sendo a linhagem B10.A considerada sensível e a BALB/c intermediária.

Estudos realizados para avaliar a resistência natural de camundongos isogênicos aos fungos *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Cryptococcus neoformans* demonstraram que a susceptibilidade não estava relacionada ao complexo de histocompatibilidade (H-2) e que não existia um padrão genético que pudesse conferir resistência a todas as infecções fúngicas (CHICK & ROBERTS, 1979; MOROZUMI et al., 1981b; KIRKLAND & FIERER, 1983; RHODES et al., 1980).

5.1 Análise histopatológica

A fase inicial do processo infeccioso (vinte e quatro e setenta e duas horas) observada neste estudo com as duas linhagens, a exemplo do que acontece em outras doenças infecciosas granulomatosas, caracterizou-se pela presença de uma reação inflamatória aguda, rica em PMN, com células histiocitárias isoladas ou contendo fungos em seu interior e poucos linfócitos difusamente espalhados pelo infiltrado. Em alguns pontos do infiltrado foram vistas áreas de necrose. Essas áreas necróticas podem ser decorrentes da ação de enzimas produzidas pelos PMN para lisar os organismos fagocitados e que, quando ativados ou desintegrados, liberam essas enzimas no interstício, agredindo os tecidos inflamados; ou a necrose tissular, devida à inoculação, estimularia a migração dos PMN que, mediante suas enzimas, aumentariam a destruição celular, estimulando a vinda de outros PMNs. De acordo com FECCHIO & MONTENEGRO (1999), no processo de inflamação aguda, a migração das células da luz do vaso ao foco inflamatório não se faz aleatoriamente; os PMNs são as células dominantes nas primeiras vinte e quatro a quarenta e oito horas após a agressão; a seguir, começam a migrar monócitos do sangue que, ativados nos tecidos, recebem a denominação de macrófagos; seguem-se os eosinófilos e as células imunologicamente ativas como os linfócitos. O número observado de

fungos era pequeno e muitos estavam isolados, ou seja, não exibiam formas em brotamento, características do processo de reprodução.

Após sete dias, notou-se um aumento no tamanho dos infiltrados que eram constituídos basicamente por histiócitos. Entre as células histiocitárias, muitas apresentavam citoplasma de aspecto rendilhado. Essas células, que são observadas nas lesões humanas, segundo alguns autores, seriam “células xantomizadas”, porém, OPROMOLLA et al. (2000), utilizando a coloração pelo sudão III, verificaram que os lipídeos evidenciados nos cortes histológicos pareciam ser de origem fúngica. O aspecto rendilhado, ao que parece, está relacionado a fragmentos dos fungos digeridos por essas células.

Após quinze dias e um mês, a constituição celular dos infiltrados foi praticamente a mesma entre as linhagens, à exceção da presença de raros plasmócitos observados na linhagem B10.A., sugerindo a participação da resposta imune humoral com produção de anticorpos. Linfócitos, fibroblastos e PMN estavam presentes em pequeno número, espalhados pelo infiltrado.

No quarto mês, ocorreu um nítido aumento no tamanho dos infiltrados, que se apresentavam divididos em blocos de tamanhos variados, constituídos por histiócitos, PMN e linfócitos. O número de células fúngicas foi nitidamente maior, em concordância com o que foi obtido na contagem realizada a partir da suspensão. As formas em brotamento foram freqüentes, sugerindo que os fungos estavam se multiplicando de fato. Na linhagem BALB/c, mastócitos foram vistos em número não muito grande, mas que chamaram atenção. A ligação cruzada dos receptores, causada pela interação do antígeno com anticorpos específicos da classe IgE a receptores especiais na superfície dos mastócitos, dá origem à liberação de mediadores que induzem um aumento na permeabilidade vascular, atraindo os PMN, isto é, provocam uma reação inflamatória aguda no local onde se encontra o antígeno. Nesta fase, porém, não se notou aumento de PMN e não se consegue explicar a presença dessas células.

No sétimo mês, o infiltrado foi maior, constituído basicamente por células gigantes. Na linhagem BALB/c, havia uma pequena quantidade de linfócitos, plasmócitos, PMN, fibroblastos, histiócitos de citoplasma com aspecto

rendilhado e grande quantidade de fungos. Na linhagem B10.A, o número de linfócitos e PMN era um pouco maior, com algumas áreas necróticas e pequeno número de mastócitos. O aumento no número de linfócitos observado na linhagem B10.A sugere uma maior resposta do sistema imune na tentativa de controlar o processo infeccioso, embora a quantidade de fungos tenha sido maior do que no quarto mês. O número de PMN, nesta fase, pode ter aumentado em função da liberação de mediadores produzidos pelos mastócitos que induzem um aumento na permeabilidade vascular atraindo aquelas células para o local da infecção.

Aos dez meses, em ambas as linhagens, o infiltrado observado foi maior, assim como a quantidade de fungos. Na linhagem B10.A, o número de PMN havia aumentado, chegando a formar abscessos em algumas áreas.

Após treze meses, no infiltrado apresentado pela linhagem BALB/c, houve predomínio de células gigantes e grande número de fungos. Na linhagem B10.A, as células histiocitárias, isoladas ou formando células gigantes, foram vistas com maior frequência e o número de fungos era grande. É relevante o grande número de PMN em áreas de necrose.

Aos dezesseis meses, o aspecto do infiltrado continuava o mesmo, à exceção do número de fungos que foi sempre maior na linhagem BALB/c.

No final do experimento, dezoito meses p.i., a linhagem BALB/c apresentou um extenso infiltrado granulomatoso, dividido em blocos, bem delimitado, septado por feixes de fibroblastos com predomínio de células gigantes com muitos fungos em seu interior. Esparsos plasmócitos, linfócitos e fibroblastos em quantidade moderada permeavam o infiltrado. Destaca-se a presença de áreas de necrose e o aumento no número de PMN. Provavelmente, a necrose nos infiltrados, que atuaria como fator de estímulo à migração dos PMN, pode ser devida à destruição de células gigantes. Observam-se, com frequência, células gigantes enormes, contendo em seu interior um enorme número de fungos com aspecto de cápsulas vazias, sugerindo que estas células estão prestes a se romper. Nessa fase final da infecção, essa poderia ser uma causa da necrose. Na linhagem B10.A, houve predomínio de células histiocitárias com citoplasma de

aspecto rendilhado. Células gigantes mal delimitadas estavam presentes, sendo a maioria de corpo estranho. Células mononucleares foram esparsas, PMN e mastócitos foram vistos, mas não em grande quantidade. O número de fungos foi grande, porém nitidamente menor do que o observado na linhagem BALB/c.

5.2 Número obtido de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício

O número obtido de células fúngicas nos diferentes períodos de sacrifício entre as linhagens BALB/c e B10.A foi expresso pela mediana. Todos os animais foram inoculados intradermicamente com inóculo proveniente de uma mesma suspensão fúngica. A contagem foi realizada com o objetivo de se verificarem possíveis diferenças entre o número de fungos inoculados e o obtidos após os diferentes períodos de sacrifício.

Na linhagem BALB/c, observou-se um aumento progressivo no número de células fúngicas, sugerindo um processo de constante multiplicação. A partir de quatro meses p.i., verificou-se que os valores obtidos eram superiores ao inoculado, atingindo o máximo de $1,3 \times 10^7$ fungos/ml em um animal sacrificado aos dezoito meses. Analisando-se a evolução dos resultados no decorrer do experimento, entre os tempos de vinte e quatro horas até sete meses, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao número de células fúngicas obtidas. Porém, quando foram comparados esses resultados com os obtidos nos demais tempos (dez a dezoito meses), observaram-se diferenças estatísticas significativas.

Com relação às primeiras alterações macroscópicas foram verificadas a partir de sete meses e, provavelmente, elas estejam relacionadas ao aumento significativo no número obtido de células fúngicas que ocorreu a partir desse tempo. Dos quarenta e quatro animais avaliados, quinze desenvolveram lesão macroscópica. Embora os animais sejam isogênicos e tenham recebido inóculo proveniente de uma mesma suspensão fúngica, o tempo de aparecimento das lesões variou de sete meses a dezessete meses após a inoculação. Quando se realizou a contagem do número de fungos presentes na suspensão obtida da lesão

do paciente, observou-se que muitos se apresentavam na forma de brotamento, formando cadeias com até cinco fungos, porém apenas 45% das células estavam viáveis. Essa tendência de os fungos formarem grupamentos pode ter causado uma distribuição heterogênea deles na suspensão e, como consequência, nem todos animais teriam recebido exatamente o mesmo número de células fúngicas viáveis. Outro fator pode ter sido a homogeneização inadequada da suspensão no momento da inoculação. Esses fatores poderiam explicar as variações ocorridas no tempo de aparecimento das lesões.

A análise de associação entre o índice de viabilidade e número obtido de células fúngicas dos animais com lesão macroscópica não revelou correlação entre essas duas variáveis. Ao correlacionar o número de células fúngicas com o tempo de evolução da lesão obteve-se correlação positiva, indicando que, quanto maior o tempo de evolução da lesão, maior é o número de fungos. Possivelmente, a eliminação dos fungos mortos ocorra lentamente, fazendo com que haja uma mistura com os que ainda estão vivos e se reproduzindo. Por isso, como o número de células fúngicas é grande e, à medida que esse número cresce, as lesões também aumentam de tamanho e o índice de viabilidade ficaria diluído entre o número de fungos vivos e mortos.

Os resultados da análise de correlação entre essas variáveis poderão ser de grande importância, por exemplo, em estudos de tentativa de cultivo do fungo em meios artificiais ou em passagem para outros animais.

Na linhagem B10.A, também foi verificado um aumento no número de células fúngicas. Os resultados mostraram, porém, que esses valores foram menores que os obtidos na linhagem BALB/c. A partir do quarto mês p.i., esse valor foi maior do que o inoculado, atingindo o máximo de $3,4 \times 10^5$ fungos/ml após treze meses de inoculação.

Ao analisar a evolução desses valores no decorrer do experimento, verifica-se que, entre os tempos de vinte e quatro horas e um mês, não ocorreram diferenças significativas, porém ao serem comparados esses mesmos períodos com os demais, observam-se diferenças estatisticamente significativas.

Analisando-se e comparando-se a variável número de fungos entre as duas linhagens em estudo, foram verificadas diferenças significativas somente a partir de treze meses. É provável que a linhagem B10.A seja mais competente para conter o processo infeccioso, pois, ao mesmo tempo em que as células fúngicas estariam se reproduzindo elas seriam destruídas continuamente pelas células macrofágicas. Apesar de que a eliminação dos fungos mortos seja lenta, as células viáveis poderiam manter o processo infeccioso ativo.

A contagem dos fungos é importante não apenas para se ter uma idéia do número de células fúngicas, como também para estimar uma possível multiplicação do microrganismo. Na paracoccidiodomicose (CALICH et al., 1985; CALICH et al., 1987; SINGER-VERMES, et al., 1995; XIDIEH et al., 1999) e hanseníase experimentais (LEVY, 1986), o procedimento de contagem do organismo infectante é importante, entre outros fatores, para o desenvolvimento da infecção, ajuste da dose mínima infectiva e multiplicação do parasita.

5.3 Índice de viabilidade obtido nos diferentes períodos de sacrifício

O índice de viabilidade foi calculado com o objetivo de se estimar a porcentagem de células vivas obtidas nos diferentes períodos de sacrifício. Os índices/grupo foram calculados pela mediana.

Na linhagem BALB/c, foram vistas células viáveis em todos os períodos de sacrifício, porém não ocorreram diferenças estatísticas significativas entre esses valores no decorrer do experimento. Entre as variáveis índice de viabilidade e tempo de evolução da lesão, verificou-se correlação negativa, indicando que, quanto maior o tempo de evolução da lesão, menor é o índice de viabilidade.

Na linhagem B10.A, não foram vistas células viáveis em nenhum dos quatro animais sacrificados sete meses p.i. e também não foi verificada diferença estatística entre os valores no decorrer do experimento.

Quando foram comparados os índices entre as linhagens, observaram-se diferenças estatísticas somente nos tempos de 24h, 7d, 7m e 16m p.i.

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 vital com DF-BE é um dos mais comumente utilizados. Em 1978, CALICH et al. utilizaram esse método para detecção da viabilidade de células fúngicas leveduriformes como *Candida sp.*, *Cryptococcus neoformans* e *P. brasiliensis*. A comparação desses resultados com os da técnica de contagem de colônias em placa possibilitou aos pesquisadores suprir a sugerirem o emprego dessa técnica por sua rapidez, sensibilidade e simplicidade.

VILANI-MORENO et al. (1997) realizaram vários testes com os corantes azul-algodão, azul-tripan, verde-janus e DF-BE, com o objetivo de determinar qual a melhor técnica a ser utilizada na detecção da viabilidade do *L. loboi*. No estudo, os autores verificaram que a técnica com DF-BE demonstrou ser mais sensível, quando comparada às demais colorações, uma vez que nem sempre foi possível fazer, com segurança, a distinção entre os fungos viáveis e não viáveis. Estudo comparativo entre testes de viabilidade do *L. loboi* com corantes e o crescimento de colônias em placa não é possível, uma vez que esse fungo ainda não foi cultivado em meios artificiais. Hoje, porém, com a grande susceptibilidade da linhagem BALB/c ao *L. loboi*, comparações de viabilidade já podem se realizadas.

A viabilidade está de acordo com o aspecto morfológico do fungo nos tecidos parasitados. Nos cortes histológicos corados pelo HE, observa-se grande quantidade de células fúngicas que não apresentam nenhuma estrutura no seu interior, parecendo cápsulas vazias. Provavelmente esse aspecto corresponda a células inviáveis. As demais células apresentam formações arredondadas, únicas ou múltiplas, violáceas ou eosinófilas, ocupando a maior parte do hialoplasma (VILANI-MORENO et al., 1997). Em 1938, FIALHO já havia observado essas diferenças na morfologia do fungo.

5.4 Considerações finais

Os achados histopatológicos, número de células fúngicas e o índice de viabilidade obtidos nos diferentes períodos de sacrifício foram variáveis entre as linhagens, sugerindo diferenças de susceptibilidade à infecção pelo *L. loboi*. Essas diferenças provavelmente sejam decorrentes de diferenças genotípicas entre as linhagens estudadas. A linhagem BALB/c demonstrou ser mais susceptível à infecção do que a B10.A sugerindo, a exemplo do que ocorre na paracoccidioidomicose, a existência de fatores genéticos que determine o padrão de resistência. No entanto, haveria necessidade de se estudarem outros fatores como imunidade celular e humoral, concentração do inóculo, sexo, idade, via de inoculação, para se soubessem quais variáveis são determinantes nas diferenças de susceptibilidade.

A passagem sucessiva do fungo para outros camundongos, com o objetivo de se verificarem alterações no comportamento da infecção, também, seria de grande importância para o estudo do aspecto experimental da doença.

6. Conclusões

A análise dos resultados permitiu elaborar as seguintes conclusões:

1 - Do de ponto de vista histopatológico, observou-se que a evolução das alterações foi semelhante nas duas linhagens, sendo mais exuberante no BALB/c. No final do experimento, verificou-se que no grupo de B10.A predominaram histiócitos com citoplasma rendilhado, enquanto que, no grupo de BALB/c, as células gigantes eram predominantes.

2 - O número obtido de células fúngicas no final do experimento foi maior na linhagem BALB/c.

3 - O índice de viabilidade não foi superior ao inoculado em nenhum dos animais avaliados. Na linhagem BALB/c, os índices foram, de maneira geral, maiores do que os obtidos no grupo de B10.A.

4 - Somente a linhagem BALB/c apresentou alterações macroscópicas nos coxins plantares inoculados.

5 - Entre os animais com alterações macroscópicas, verificou-se correlação positiva entre número de fungos e o tempo de evolução da lesão macroscópica e correlação negativa entre índice de viabilidade e tempo de evolução da lesão macroscópica.

Considerando-se as diferenças observadas entre as duas linhagens estudadas, pode-se afirmar que os camundongos da linhagem BALB/c são mais susceptíveis à infecção pelo fungo *Lacazia loboi* do que os da linhagem B10.A.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas*

ABREU, M.W. & MIRANDA, J.L. Microscopia eletrônica *scanning*: agente da micose de Jorge Lobo. **An. brasil. Dermatol.**, v.47, p. 115-24, 1972.

ÂREA-LEÃO, A.E., GOTTO, M., CURY, A. Infecção experimental de animais pela **Glenosporella lobo**. FONSECA & LEÃO, 1940. **Hospital**, v. 33, p. 273-78, 1948.

AZULAY, R. D., ANDRADE, L. C., CARNEIRO, J. A. Micose de Jorge Lobo. **Hospital**, v.73, n. 4, p. 167-74, 1968.

AZULAY, R.D., ANDRADE, L.C., SILVA, D., CARNEIRO, J. A. Reprodução experimental da blastomicose de Jorge Lobo. **An. bras. Dermatol.**, v. 43, p. 261-266, 1968.

AZULAY, R.D., CARNEIRO, J.A., ANDRADE, L.C. Blastomicose de Jorge Lobo. Contribuição ao estudo da etiologia, inoculação experimental, imunologia e patologia da doença. **An. bras. Dermatol.**, v. 45, p. 47-66, 1970.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZULAY, R.D., CARNEIRO, J.A., ANDRADE, L.M.C. Lobo's blastomycosis: new experiments on culture, immunology and inoculation. **Derm. int.**, v. 8, p. 3-35, 1969.
- AZULAY, R.D., MIRANDA, J. Doença de Jorge Lobo (15º caso da literatura). **Hospital**, v. 51, p. 685-91, 1957.
- CALICH, V.L.G., PURCHIO, A. PAULA, C.R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v. 66, p. 175-7, 1978.
- CALICH, V.L.G.; BURGER, E.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; SINGER-VERMES, L.M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect. Immun.** v.55, p. 1919-23, 1987.
- CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGER E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. exp. Path.**, v. 66, p. 585-94, 1985.
- CAMARGO, Z.P., BARUZZI, R.G., MAEDA, S.M., FLORIANO, M.C. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. **Medical Mycology**, v. 36, p. 413-7, 1998.
- CAMPO-AASEN, I. Blastomycosis queloidiana o enfermedad de Jorge Lobo en Venezuela. **Derm. Venez.** , v. 1, p. 215-40, 1958.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARNEIRO, J.A., AZULAY, R.D., ANDRADE, L.C. Micose de Jorge Lobo. Isolamento do parasito em cultura artificial. **Hospital.** v. 73, p. 1151-63, 1968.
- CERRUTI, H., ZAMITH, V.A. Doença de Jorge Lobo. (Comunicação à Sociedade Paulista de Medicina em 1948).
- CHANDLER, F.W., KAPLAN, W., AJELLO, L. **A Color atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases.** 1st ed. Chicago:Year Book Medical Publishers, 1980:73-5.
- CHICK, E.W. & ROBERTS, G.D. The varying susceptibility of different genetic strains of laboratory mice to *Histoplasma capsulatum*. **Mycopathol. Mycol. Appl.** v. 52, p. 251-53, 1979.
- COELHO, K. I. R., DEFAVERI J., REZKALLAH-IWASSO, M. T., PERAÇOLI, M. T. S. Experimental Paracoccidioidomycosis, cap. 6. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G., CCR **Paracoccidioidomycosis.** Boca Raton: CRC Press, 1994. cap.6, p. 87-102
- DE VRIES, G.A. & LAARMAN, J.J. A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. **J. Aquat. Mammals**, v. 1 n. 3, p. 26-33, 1973.
- DESTOMBES, P., RAVISSE, P. Étude histologique de 2 cas guyanais de blastomycose chéloidienne (maladie de J. Lobo). **Bull. Soc. Path. exot.**, v. 57, p. 1018-24, 1964.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESTERRE, P., PRADINAUD, R., RAVISSE P. Étude immunohistochimique de la lésion cutanée de lobomycose. **J. Mycol. Med.**, v. 1, p. 276-83, 1991.
- FIALHO, A.S. Blastomicose tipo "Jorge Lobo". **Rev. Assoc. med. argent.**, v. 52, p. 299-306, 1938.
- FONSECA FILHO, O. *Glenosporella lobo*. In: FONSECA FILHO, O.- **Parasitologia Médica. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 703- 25, 1943.
- FONSECA, O.J.M., LACAZ, C.S. Estudo de culturas isoladas de blastomicose queloidiforme (doença de Jorge Lobo). Denominação ao seu agente etiológico. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 13, p. 225-51, 1971.
- FUCHS, J., MILBRADT, R., PECHER, S.A. Lobomycosis (Keloidal Blastomycosis): case reports and overview. **Cutis**, v. 46, p. 227-34, 1990.
- GADELHA, A.R., BANDEIRA, V. Micoses profundas. In: SILVA, I.M. **Dermatopatologia**. Rio de Janeiro, Atheneu, p. 125-34, 1983.
- HERR, R.A., TARCHA, E.J., TABORDA, P.R., TAYLOR, J.W., AJELLO, L., MENDOZA, L. Phylogenetic analysis of *Lacazia lobo* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic onygenales. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 309-14, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KAWAGUCHI, Y. Superinfection with leprosy bacilli in mice.

Int. J. Lepr., v. 40, p. 91-97, 1972.

KIRKLAND, T.N. & FIERER J. Inbred mouse strains differ in resistance to lethal *Coccidioides immitis* infection. **Infect.**

Immun. v. 40, p. 912-16, 1983.

LACAZ, C.S., BARUZZI, R.G., ROSA, M.C.B. **Doença de Jorge Lobo**. São Paulo: Editora da USP-IPIS, 1986, 92p.

LEITE, J.M. **Doença de Jorge Lobo. Contribuição ao seu estudo anátomo-patológico**. Belém, 1954. (Tese de cátedra - Faculdade de Medicina e Cirurgia do Pará).

LEVY, L. & SHEPARD, C.C. The number of *Mycobacterium leprae* in the pretreatment biopsy specimen does not determine the rate of response of patients with lepromatous leprosy to chemotherapy with acedapsone. **Lepr. Rev.** v. 57, p.27-32, 1986.

LEVY, L. Application of the mouse foot-pad technique in immunologically normal mice in support of clinical drug trials, and a review of earlier clinical drug trials in lepromatous leprosy. **Int. J. Lepr.**, v. 55, n. 4, p. 823-29, 1987.

LEVY, L. Superinfection in mice previously infected with *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.**, v. 11, p. 1094-99, 1975.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LOBO, J. Contribuição ao estudo das blastomicoses. **An. Bras. Derm. Sif.**, v. 8, p. 43-57, 1933.

LOBO, J. Um caso de blastomicose, produzido por uma espécie nova, encontrada em Recife. **Rev. med. Pernambuco**, v. 1, p. 763-75, 1931.

MADEIRA, S., OPROMOLLA, D.V.A., BELONE, A.F.F. *Paracoccidioides loboi* inoculation in BALB/c mice. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 42, n. 5, p. 239-243, 2000.

MONTENEGRO, M.R. & FECCHIO. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. Cap. 6 **In: MONTENEGRO, M.R. & FRANCO, M. Patologia Processos Gerais.** Atheneu, 4^a ed. São Paulo, p. 320, 1999.

MOROZUMI, P. A.; HALPERN, J.W.; STEVENS, D.A. Susceptibility differences of inbred strains of mice to blastomycosis. **Infect. Immun.** v. 32, p. 160-68, 1981(b).

NERY-GUIMARÃES, F., MACEDO, D.G. Contribuição ao estudo das blastomicoses na Amazônia (blastomicose queloidiana e blastomicose sul-americana). **Hospital**, v. 38, p. 223-53, 1950.

OPROMOLLA, D.V.A., BELONE, A.F.F., TABORDA, P.R.O. Correlação clínico-patológica em 40 casos novos de lobomicose. **An. bras. Dermatol.**, v. 75, n. 4, p. 425-34, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OPROMOLLA, D.V.A., MADEIRA, S., BELONE, A.F.F., VILANI-MORENO, F.R. Jorge Lobo's disease: experimental inoculation in Swiss mice. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 41, p. 359-64, 1999.

OPROMOLLA, D.V.A., NOGUEIRA, M.E.S. Inoculation of *Paracoccidioides loboi* into the subcutaneous tissue of the hamster cheek pouch. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 42, p. 119-23. 2000.

OPROMOLLA, D.V.A., VILANI-MORENO, F.R., BELONE, A.F.F. A doença de Jorge Lobo e a coloração pela prata metenamina. **An. bras. Dermatol.**, v. 74, p. 345-9, 1999.

OPROMOLLA, D.V.A.; TABORDA, P.R.; TABORDA, V.B.A.; VIANA, S.; FURTADO, J.F. Lobomycose: relato de 40 casos novos. **An. bras. Dermatol.**, v.74, p. 135-41, 1999(b).

PECHER, S.A., FUCHS, J. Cellular immunity in Lobomycosis (Keloidal blastomycosis). **Allergol. Immunopathol.**, v. 16, p. 413-5, 1988.

PRADINAUD, R., TALHARI, S. Lobomycose. **ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE**, Paris, (Maladies infectieuses), 8608 A10, 5p, 1996.

PUCCIA, R., SHENKMAN, S., GORIN, P.A.J., TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 199-206, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REYES, O., GOIHMAN, M. GOLDSTEIN, C. Blastomycosis queloidiana o enfermedad de Jorge Lobo. Comunicación previa sobre un caso observado. **Derm. venez.**, v. 2. p. 245-55, 1960/1961.

RHODES, J.C.; WICKER, L.S.; URBA, W.J. Genetic control of susceptibility of *Cryptococcus neoformans* in mice. **Infect. Immun.** v. 29, p. 494-99, 1980.

SAMPAIO, M.M. A note on the cultivation of the aetiological agent of Jorge Lobo's disease in 199 T.C. medium containing phytohaemagglutinin. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 16, p. 121-2, 1974.

SAMPAIO, M.M., DIAS, L.B. Experimental infection of Jorge Lobo's disease in the cheek-pouch of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 12, p. 115-20, 1970.

SAMPAIO, M.M., DIAS, L.B. The armadillo *Euphractus sexcintus* as a suitable animal for experimental studies of Jorge Lobo's disease. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 19, p. 215-20, 1977.

SAMPAIO, M.M., DIAS, L.B., SCAFF, L. Bizarre forms of the aetiologic agent in experimental Jorge Lobo's disease in tortoises. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 13, p. 191-3, 1971.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SESSO, A. BARUZZI, R.G. Observações ao microscópio eletrônico das lesões cutâneas da blastomicose de Jorge Lobo. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 19º, Rio de Janeiro. **Resumos**, p. 131-32, 1983.

SESSO, A., BARUZZI, R.G. Interaction between macrophage and parasite cells in lobomycosis. The thickened cell wall of *Paracoccidioides loboi* exhibits apertures to the extracellular milieu. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 20, p. 537-48, 1988.

SESSO, A., BRITO, T., BARUZZI, R. Estudo microestrutural das células fagocíticas na blastomicose Jorge Lobo. In: JORNADA CIENTÍFICA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO, 2ª, São Paulo, 1983. **Resumos**. p. 49.

SHEPARD, C.C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. **J. Exper. Med.** v. 112, p. 445-54, 1960.

SHEPARD, C.C.; & McRae, D.H. *Mycobacterium leprae* in mice: minimal infectious dose, relationship between staining quality and infectivity, and effect of cortisone. **J. Bact.**, v. 89, p. 365-72, 1965.

SILVA, D. Estudo experimental da micose de Lobo. **An. bras. Dermatol.**, v. 69, p. 88-91, 1994.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SILVA, D. Micose de Lobo. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, v. 6, p. 85-98, 1972.
- SILVA, D., BRITO, A. Formas clínicas não usuais da micose de Lobo. **An. bras. Dermatol.**, v. 69, p. 133-6, 1994.
- SILVA, D., MACEDO, C., OLIVEIRA, C., UNGER, D. Micose de Lobo simulando forma gomosa: um caso raro. **An. bras. Dermatol.**, v. 7, p. 211-3, 1996.
- SILVA, D., NEVES, C. Dois casos novos da micose de lobo: atualização estatística. **An. bras. Dermatol.**, v. 70, p. 127-9, 1995.
- SINGER-VERMES, L.M.; SAKAMOTO, T.N.; VAZ, C.A.C.; CALICH, V.L.G. Influence of the genetic pattern and Sex of mice in experimental paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 101, p. 114-20, 1995.
- STREINER, D. L., NORMAN, G. R. **Biostatistics – The bare essentials**. Mosby – year Book, St. Louis, 260p. 1994.
- TABORDA, P.R., TABORDA, V.A., MCGINNIS, M.R. *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent Lobomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2031-3, 1999.
- TREJOS, A., ROMERO, A. Contribuição ao estudo das blastomicoses em Costa Rica. In: **Congresso Internacional de Microbiologia**, 5º, Rio de Janeiro, resumos, p. 127, 1950.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VIDAL, M.S.M., PALACIOS, S.A., TAKAHASHI DE MELO, N., LACAZ, C.S. 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**, v. 39, p. 35-7, 1997.
- VILANI-MORENO, F. R., OPROMOLLA, D. V. A. Determinação da viabilidade do *Paracoccidioides lobo* em biópsias de pacientes portadores de doença de Jorge Lobo. **An. bras. dermatol.**, v. 72, p. 433-7, 1997.
- WIERSEMA, J.P. Lobo's diseases (Keloidal blastomycosis). In: BAKER, R.D. ed. - THE PATHOLOGIC ANATOMY OF MYCOSES. HUMAN INFECTION WITH FUNGI, ACNOMYCETES AND ALGAE. Berlin: Springer Verlag, 1971, p. 577-88.
- WIERSEMA, J.P.; NIEMEL, P.L. Lobo's disease in Surinam patients. **Trop. Geogr. Med.**, v. 17, p. 89-111, 1965.
- WOODARD, J.C. Electron microscopic study of lobomycosis (*Loboa lobo*). **Lab. Invest.**, v. 27, p. 606-12, 1972.
- XIDIEH, C.F.; LENZI, H.L.; CALICH, V.L.G.; BURGER, E. Influence of the genetic background on the pattern of lesion developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Microbiol. Immunol.** v. 188, p. 41-49, 1999.

8. Abstract

The objectives of the present study were to evaluate the susceptibility of the inbred mice strains BALB/c and B10.A to the infection by the fungus *Lacazia loboi* (*L. loboi*) studying the histopathological aspects of lesions produced, number of fungi and viability index at each time of sacrifice, and also verify if the pattern of response among the isogenic strains is homogeneous, allowing a correlation of the results.

Both hind foot pads of 44 BALB/c and 44 B10.A mice were intradermically inoculated with 0,03 ml of a fungal suspension. The fungal suspension was obtained from a single lesion fragment of a Jorge Lobo's disease patient. The biopsy was macerated in 0.85% saline and the suspension was immediately submitted to viability determination through the ethidium bromide-fluorescein diacetate vital staining. The fungal concentration was estimated in Neubauer chamber and the results expressed in absolute numbers. The suspension contained 9×10^5 fungi/ml ($2,7 \times 10^4$ fungos/0,03ml) and 45% of viable fungi. The animals were sacrificed at 24 and 72 hours, 7 and 15 days, 1, 4, 7, 10, 13, 16 and 18 months after inoculation. Both foot pads were excised, being one submitted to histopathological examination and the other macerated for fungal counting and viability index determination.

The BALB/c strain presented an extensive granulomatous infiltrate, very similar to the observed in human lesions, that evolved progressively at the different periods of sacrifice. The number of fungi recovered also increased progressively throughout the experiment and after the 7th month, macroscopic changes were observed on the foot pad of 2 animals. At the end of the experimental period 34% of the animals presented macroscopic changes. The viability indexes varied from 0 to 43%.

The B10.A strain has also presented an extensive granulomatous infiltrate, however, no macroscopic changes were observed in any of the animals.

ABSTRACT

There was a discrete increase of the number of fungi recovered, remaining close to the inoculated. The viability indexes were lower, varying from 0 to 26%.

Considering the histopathological findings, the presence of macroscopic changes, and the great amount of fungi recovered, we may conclude that the BALB/c strain is more susceptible than the B10.A strain to the infection by fungus *L. loboi*.