

PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS BONS E MAUS PRODUTORES DE ANTICORPOS DA SELEÇÃO III. III-EVOLUÇÃO DA DOENÇA E CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA IMUNEHUMORAL E PADRÃO DE LESÕES TISSULARES NOS HÍBRIDOS F1, SEGREGANTES F2 E RETROCRUZAMENTOS

Mara Silvia Carvalhaes*

RESUMO

Camundongos bons (H/f) e maus (L/f) produtores de anticorpos da seleção III, bem como os híbridos F1, segregantes F2 e animais resultantes dos retrocruzamentos, foram infectados intraperitonealmente com 10^6 formas L viáveis de *Paracoccidoides brasiliensis* da cepa 18. A mortalidade cumulativa dos animais, acompanhados até os 150 dias de infecção, demonstrou que a resistência à paracoccidiodomicose, neste modelo, está associada a um ou poucos genes autossômicos dominantes. A avaliação dos títulos de anticorpos e histopatológicos de cortes de pulmões, indicou que ambos os caracteres estão sobre controle poligênico, e que não existe correlação entre a produção de anticorpos e formação de granulomas, neste modelo experimental.

UNITERMOS: Paracoccidiodomicose, Anticorpos, Controle Poligênico, Granuloma, Imunogenética.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de linhagens de camundongos bons e maus produtores de anticorpos constitui um modelo para o estudo da importância de imunoglobulinas específicas em várias infecções. A produção quantitativa de anticorpos está sob controle poligênico e o número de genes envolvidos depende do antígeno utilizado durante o processo de seleção dos animais (BIOZZI et al, 1979). Os alelos separados em cada linhagem durante o processo de seleção apresentam amplo efeito inespecífico, podendo estar operantes na resposta quantitativa de anticorpos contra antígenos não relacionados ao imunógeno selecionador (BLUM e CIOLI, 1978). Os animais bons (H/f) e maus (L/f) produtores de anticorpos da seleção III foram selecionados por cruzamentos bidirecionais para a resposta de anticorpos contra antígenos de *Salmonellae* sp. (SIQUEIRA et al, 1976). A principal diferença entre camundongos H/f e L/f é a capacidade de produção de anticorpos.

Em trabalhos anteriores analisamos a infecção pelo *P. brasiliensis* em animais H/f e L/f. Os camundongos bons produtores de anticorpos mostraram-se resistentes à infecção, apresentando lesões pulmonares caracterizadas por infiltrados

* Prof.^a do Depto de Imunologia e Patologia Geral do IPTSP/UFG.

CARVALHAES, M.S. Paracoccidiodomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da seleção III. III- Evolução da doença e correlação com a resposta imune-humoral e padrão de lesões tissulares nos híbridos F1, segregantes F2 e retrocruzamentos. Rev. Pat. Trop.24 (1): 21 - 29, jan/jun. 1995

inamatórios focais e/ou difusos, com pequena quantidade de fungos. Nos animais L/f detectou-se intensa presença de granulomas pulmonares contendo numerosos fungos e uma alta taxa de mortalidade. Estes camundongos apresentaram respostas segregadas de anticorpos para o antígeno protéico do *P. brasiliensis* (CARVALHAES, et al. 1985; 1986).

A transferência passiva do líquido ascítico imune obtido de animais H/f infectados, para animais L/f infectados, induziu redução do número de lesões e de fungos no pulmão e fígado destes animais; entretanto, o líquido ascítico normal também foi capaz de induzir tal efeito, embora com menor intensidade. Anticorpos IgG purificados a partir do soro de animais H/f cronicamente infectados e transferidos passivamente para animais L/f em fase inicial de infecção induziram redução da quantidade de lesões e de fungos, de maneira consideravelmente menor que aquela observada com a transferência de líquido ascítico imune (NUNES e CARVALHAES, 1992).

Com o objetivo de esclarecer a relação entre anticorpos, desenvolvimento de granulomas e mortalidade, avaliamos a infecção pelo *P. brasiliensis* nos híbridos F1, segregantes F2, retrocruzamentos e parentais H/f e L/f.

MATERIAL E MÉTODOS

Suspensões de *P. brasiliensis*

A cepa 18 de *P. brasiliensis* ICB.Pb.18, isolada de um caso humano de paracoccidiodomicose no Brasil, foi mantida em meio Fava Netto sólido a 33-36°C, sendo os repiques efetuados mensalmente. Suspensões homogêneas do fungo foram preparadas em salina estéril, a partir de culturas de 7 dias, e a determinação do número de leveduras foi feita em câmara de Neubauer. O teste de viabilidade foi efetuado utilizando-se brometo de etídio e diacetato de fluoresceína (CALICH et al, 1978).

Animais e infecções

Híbridos F1 foram obtidos por cruzamento entre camundongos H/f x L/f. Os segregantes foram obtidos por cruzamentos entre animais F1, e os retrocruzamentos por cruzamento dos F1 com o parental H/f (Bc.H/f) ou com o parental L/f (Bc.L/f). Grupos de camundongos de todos os cruzamentos, com 6 semanas de idade, foram

CARVALHAES, M.S. Paracoccidiodomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da seleção III. III- Evolução da doença e correlação com a resposta imune-humoral e padrão de lesões tissulares nos híbridos F1, segregantes F2 e retrocruzamentos. Rev. Pat. Trop.24 (1): 21-29, jan/jun. 1995

inoculados intraperitonealmente com 10^6 formas L viáveis de *P. brasiliensis* da cepa 18 em 0,5 ml de salina estéril. A mortalidade dos animais infectados foi acompanhada até o 150º dia pós-infecção. Amostras de sangue para dosagem de anticorpos e órgãos para avaliação histopatológica foram colhidos periodicamente.

Dosagem de anticorpos

Os anticorpos contra o fungo no soro dos animais H/f, L/f, F1, F2, Bc.H/f e Bc.L/f infectados foram titulados pelo método de ELISA utilizando-se a fração protéica do *P. brasiliensis* como antígeno e anticorpo anti-IgG de camundongo ligado à peroxidase como conjugado. A dominância da produção de anticorpos foi estimada pela relação d/a , $a=(x \text{ H/f} - x \text{ L/f})/2$ e $d=x \text{ F1} - (x\text{H/f} + x\text{L/f})/2$.

Histopatologia

Fragmentos representativos dos fígados e pulmões dos animais sacrificados foram colhidos, fixados em Bouin e processados pelos métodos habituais de inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina e eosina.

RESULTADOS

As percentagens de mortalidade apresentadas por animais infectados intraperitonealmente com 10^6 formas L viáveis de *P. brasiliensis* da cepa 18, 150 dias pós-infecção, foram de 3,8% para a linhagem H/f, 76,9% para a linhagem L/f, 7,6% para os híbridos F1, 19% para os segregantes F2, 5% para os animais Bc.H/f e 42,3% para os camundongos Bc.L/f (figura 1). Estes resultados indicam que a resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*, neste modelo experimental, possivelmente está associada a um ou poucos genes autossômicos dominantes.

A produção de anticorpos contra antígenos protéicos do *P. brasiliensis* (método de ELISA) em camundongos H/f, L/f e F1 demonstrou dominância parcial dos genes ligados a "alta produção de anticorpos", aos 70, 84 e 96 dias pós-infecção (figura 2). Os híbridos F1 apresentaram títulos de anticorpos sempre mais próximos dos encontrados para os camundongos H/f.

CARVALHAES, M.S. Paracoccidiodomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da seleção III. III- Evolução da doença e correlação com a resposta imune-humoral e padrão de lesões tissulares nos híbridos f1, segregantes f2 e retrocruzamentos. Rev. Pat. Trop.24 (1): 21 - 29, jan/jun. 1995

Figura 1: Mortalidade acumulada de animais H/f, L/f, F1, F2, BcH/f e BcL/f, infectados intraperitonealmente com 10 formas L viáveis de *P. brasiliensis* da cepa 18, após 150 dias de infecção.

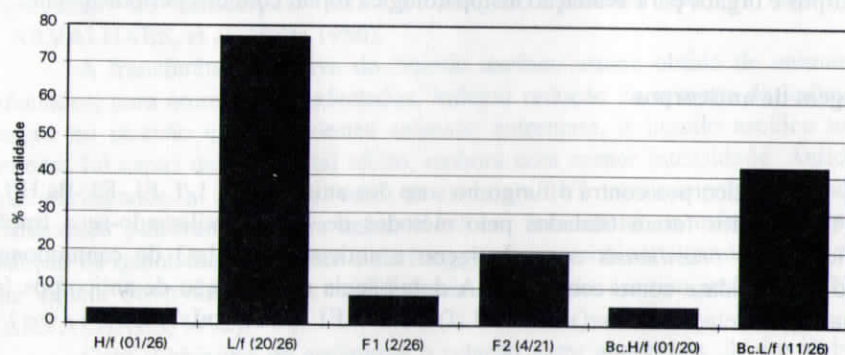
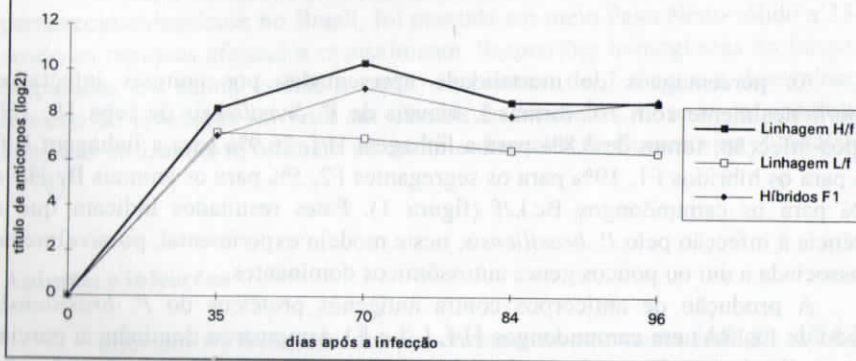


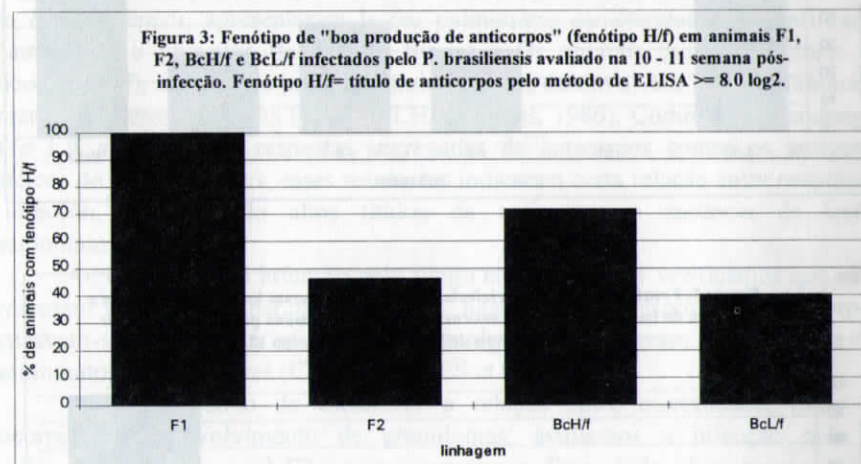
Figura 2: Cinética da produção de anticorpos contra antígenos proteicos de *P. brasiliensis* em animais H/f, L/f e F1, infectados intraperitonealmente com 10 formas L viáveis de *P. brasiliensis* da cepa 18.



CARVALHAES, M.S. Paracoccidiodomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da seleção III. III- Evolução da doença e correlação com a resposta imune-humoral e padrão de lesões tissulares nos híbridos f1, segregantes f2 e retrocruzamentos. Rev. Pat. Trop.24 (1): 21-29, jan/jun. 1995

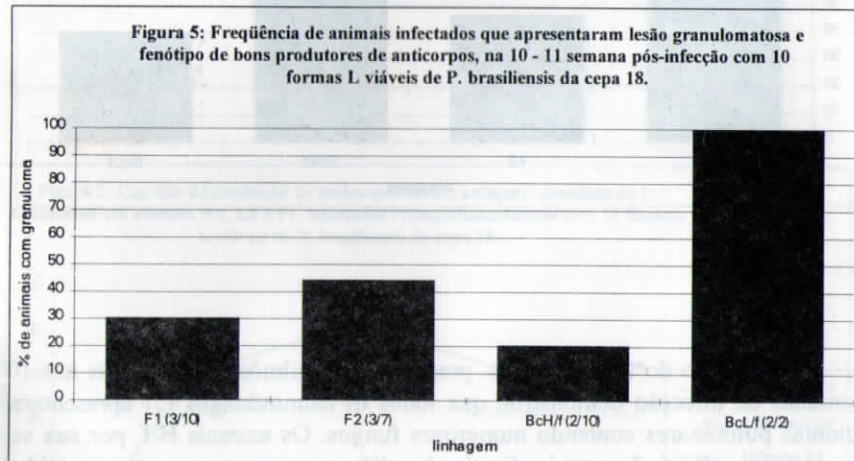
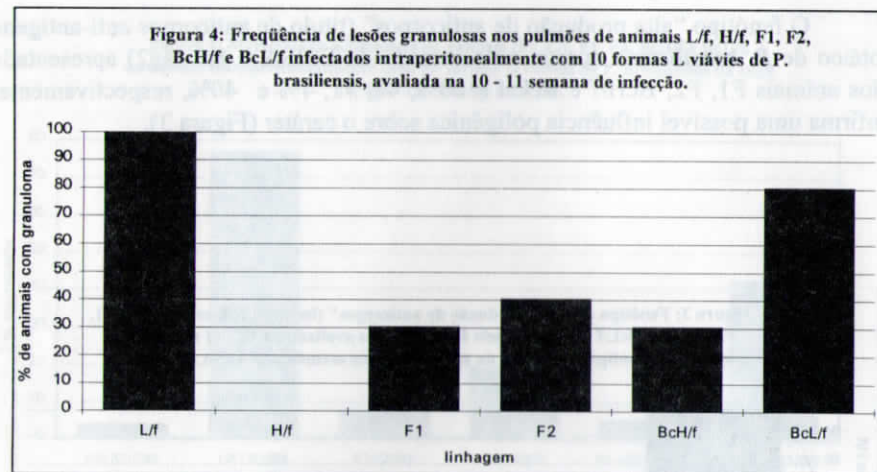
O fenótipo "alta produção de anticorpos" (título de anticorpos anti-antígeno protéico de *P. brasiliensis* dosado pelo método de ELISA $> 8,0 \log_2$) apresentado pelos animais F1, F2, BcH/f e BcL/f (100%, 46, 71, 4% e 40%, respectivamente) confirma uma possível influência poligênica sobre o caráter (Figura 3).

Figura 3: Fenótipo de "boa produção de anticorpos" (fenótipo H/f) em animais F1, F2, BcH/f e BcL/f infectados pelo *P. brasiliensis* avaliado na 10 - 11 semana pós-infecção. Fenótipo H/f= título de anticorpos pelo método de ELISA $\geq 8,0 \log_2$.



A avaliação do tipo de lesões presentes nos pulmões dos animais nas 10^a-11^a semanas de infecção demonstrou que todos os camundongos L/f apresentaram granulomas pulmonares contendo numerosos fungos. Os animais H/f, por sua vez, apresentaram reações inflamatórias focais e/ou difusas com uma pequena quantidade de fungos. Nos híbridos F1, segregantes F2, BcH/f e BcL/f detectamos granulomas pulmonares em 30%, 40%, 30% e 80% dos animais, respectivamente. Estes resultados indicam que o potencial de desenvolver reações granulomatosas em resposta ao *P. brasiliensis* nos camundongos H/f e L/f também está, como esperado, sob o controle poligênico (figura 4).

CARVALHAES, M.S. Paracoccidiodomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da seleção III. III- Evolução da doença e correlação com a resposta imune-humoral e padrão de lesões tissulares nos híbridos F1, segregantes F2 e retrocruzamentos. Rev. Pat. Trop.24 (1): 21 - 29, jan/jun. 1995



Como nossos resultados sugeriam uma relação entre baixos títulos de anticorpos e desenvolvimento de lesões granulomatosas, resolvemos avaliar os resultados individualmente, e verificamos que existiam animais F1, F2, BcH/f e BcL/f com fenótipo de bons produtores de anticorpos (título > 8,0) que apresentavam lesões granulomatosas (figura 5), assim como camundongos com fenótipo de maus

CARVALHAES, M.S. Paracoccidiodomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da seleção III. III- Evolução da doença e correlação com a resposta imune-humoral e padrão de lesões tissulares nos híbridos F1, segregantes F2 e retrocruzamentos. Rev. Pat. Trop.24 (1): 21-29, jan/jun. 1995

produtores de anticorpos (título < 7,0) sem granulomas. Estes resultados indicam que título de anticorpos e desenvolvimento de granulomas são caracteres que segregam independentemente, neste modelo experimental.

DISCUSSÃO

Camundongos bons produtores de anticorpos (H/f), resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis*, apresentaram lesões pulmonares caracterizadas por infiltrados inflamatórios e presença de poucos fungos. Os animais maus produtores de anticorpos (L/f), sensíveis à paracoccidiodomicose, desenvolvem lesões pulmonares contendo numerosos fungos (CARVALHAES et al, 1986). Como os camundongos H/f e L/f apresentaram respostas segregadas de anticorpos contra os antígenos protéicos do *P. brasiliensis*, esses resultados indicaram certa relação entre resistência à infecção, presença de altos títulos de anticorpos e ausência de lesões granulomatosas.

Ao estudarmos a infecção pelo fungo em híbridos F1 verificamos que estes apresentam dominância parcial dos genes ligados à alta resposta de anticorpos, mostravam-se resistentes à infecção, mas em alguns animais eram observadas lesões granulomatosas pulmonares (CARVALHAES et al, 1985).

Com o objetivo de esclarecer a relação entre mortalidade, título de anticorpos e desenvolvimento de granulomas, avaliamos a infecção pelo *P. brasiliensis* nos segregantes F2 e retrocruzamentos. Estes dados demonstram que: a resistência à infecção neste modelo experimental está sob controle de um ou poucos genes; a produção de anticorpos e desenvolvimento de reações granulomatosas estão sob controle poligênico; e, que não existe correlação entre produção de anticorpos e formação de granulomas, pois entre os segregantes F2 e retrocruzamentos encontramos animais com fenótipo de bons produtores de anticorpos com reações granulomatosas, e vice-versa.

Podemos sugerir que genes distintos podem controlar a produção de anticorpos e a formação de granulomas, neste modelo experimental. De fato, o granuloma presente nos híbridos F1 e alguns segregantes F2 com fenótipo H/f é histologicamente diferente do encontrado nos parentais L/f. Polimorfonucleares são as células predominantes e os fungos são raros nas lesões. Os polimorfonucleares podem ser mais eficientes no controle da proliferação do fungo que as células mononucleares, as quais são características dos granulomas desenvolvidas por camundongos L/f.

Sabemos também que em animais H/f existe um claro aumento de IgG2a após imunização com o antígeno selecionador, e uma constante ausência deste

CARVALHAES, M.S. Paracoccidioidomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da seleção III. III- Evolução da doença e correlação com a resposta imune-humoral e padrão de lesões tissulares nos híbridos F1, segregantes F2 e retrocruzamentos. Rev. Pat. Trop. 24 (1): 21 - 29, jan/jun. 1995

isótipo na linhagem L/f (SANT'ANNA et al, 1985); portanto, podemos supor que anticorpos desta classe participem na destruição ou bloqueio da multiplicação do fungo, por exemplo, por facilitar a fagocitose por macrófagos e polimorfonucleares, ou por inibir a interação do fungo com moléculas de laminina, regulando assim a invasão tissular.

SUMMARY

Experimental paracoccidioidomycosis in mice - good and bad producers of antibodies of selection III. III - Evolution of the disease and correlation with the immunohumoral response and the tissue pattern.

High (H/f) and low (L/f) antibody producer mice of selection III, F1 hybrids, interline F2 hybrids and back crosses were infected intraperitoneally with 10^6 viable L forms of *Paracoccidioides brasiliensis*, strain 18. The mortality ratio 150 days after infection demonstrated that the resistance to paracoccidioidomycosis, in this model, was controlled by one or few autosomal dominant genes. Results of antibody titers and histopathological analysis of lungs cuts denoted that both caracteres are under polygenic control and that it has no correlation between antibody production and granuloma development, in this experimental model.

KEYWORDS: paracoccidioidomycosis, Antibody, Control Polygenic, Granuloma, Immunogenetic

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Wilmar Dias da Silva e Thereza Liberman Kipnis, pela ajuda e incentivo à publicação deste trabalho. Ao Prof. Raul Chavarria e equipe, pela execução dos histopatológicos. Ao professor Oswaldo Sant'Anna, pelo fornecimento dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIOZZI, G. ; MOUTON, D. ; SANT'ANNA, O.A. ; PASSOS, H.C. ; GENARI, M. ; FERREIRA, V.C. ; HEUMMAN, A.M. ; BOUTHILLIER, Y. ; IBANEZ, O.M. ; STIFFEL, C. AND SIQUEIRA, M. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in mouse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol 85, p.: 31-98. Springer-Verlag Belin Heidelberg, New York, 1979.

CARVALHAES, M.S. Paracoccidioidomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da seleção III. III- Evolução da doença e correlação com a resposta imune-humoral e padrão de lesões tissulares nos híbridos F1, segregantes F2 e retrocruzamentos. Rev. Pat. Trop. 24 (1): 21-29, jan/jun. 1995

2. BLEIM, K. AND CIOLI, D. Behavior of Biozzi high and low responder mice upon infection with *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.*, 8: 52-56, 1978.

3. CALICH, V.L.G. ; PURCHIO, A. AND PAULA, C.A. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*, 66: 175-177, 1978.

4. CARVALHAES, M.S. ; DIAS DA SILVA, W. ; BIRMAN, E.G. ; SANT'ANNA, O.A. ; ABRAHAMSOHN, P. ; KIPNIS, T.L. Experimental Paracoccidioidomycosis in high and low antibody producers mice: II- The infection in F1 generation. In: Genetic Control of Host Resistance to Infection and Malignancy, Allan R. Liss, Snc, p. 421-428, 1985.

5. CARVALHAES, M.S. ; DA SILVA, W.D. ; BIRMAN, E.G. ; SANT' ANNA, O.A.; ABRAHAMSOHN, P.; KIPNIS, T.L. Experimental paracoccidioidomycosis in high and low antibody producer mice: I- Evolution of the disease, its correlation with the humoral immune response and the patterns of tissue lesions. *Ann. Inst. Pasteur / Immunol.*, 137 C: 127-141, 1986.

6. NUNES, I.A. ; CARVALHAES, M.S. Efeito da transferência passiva de imunoglobulinas na evolução da paracoccidioidomicose experimental em camundongos maus produtores de anticorpos. *Rev. Patol. Trop.*, 21(1): 13-20, 1992.

7. SANT' ANNA, O.A. ; MOUTON, D. ; IBANEZ, O.M. ; BOUTHILLIER, Y. ; MEVEL, J.C. ; REIS, M.H. ; BIOZZI, G. Basal immunoglobulin serum concentration and isotype distribution in relation to the polygenic control of antibody responsiveness in mice. *Immunogenetics*, 22: 131-139, 1985.

8. SIQUEIRA, M. ; BANDIERI, A. ; REIS, M.S. ; SANT' ANNA, O.A. ; BIOZZI, G. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens off *Salmonellae*. *Eur. J. Immunol.*, 6: 241-249, 1976.