

## **EFEITO DA TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE IMUNOGLOBULINAS NA EVOLUÇÃO DA PARACOCCIDIODOMICOSE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS MAUS PRODUTORES DE ANTICORPOS\***

*Iolanda Aparecida Nunes\*\* , Mara Sílvia Carvalhaes\*\*\**

---

### **RESUMO**

Camundongos maus produtores de anticorpos da seleção III (L/f) infectados com  $10^6$  formas viáveis de *Paracoccidiodioides brasiliensis* da cepa 18 receberam aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção, 0,5 ml de anticorpos IgM ou IgG obtidos de animais bons produtores de anticorpos (H/f) normais ou cronicamente infectados, por via endovenosa. Os camundongos foram sacrificados aos 35 dias de infecção, sendo seus órgãos submetidos à análise histopatológica. Os animais receptores de IgM não apresentaram alterações no padrão de lesões; entretanto, nos camundongos receptores de IgG imune observou-se redução significativa do número de lesões e de fungos aos níveis pulmonar e hepático.

---

**UNITERMOS:** Paracoccidiodomicose, Anticorpos, Controle Poligênico, Genética, Infecção.

### **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 (1). Os alelos separados em cada linhagem pelo processo de seleção apresentam amplo efeito inespecífico, podendo estar operantes na resposta quantitativa de anticorpos contra antígenos não relacionados ao imunógeno selecionador (1,2). Os animais

---

\*Trabalho financiado pelo CNPq (PIDE VI - Proc. 400821/85).

\*\*Bolsista (CNPq) do Depto. de Imunologia e Patologia Geral, IPTSP-UFG.

\*\*\*Profa. Assistente do Depto. de Imunologia e Patologia Geral, IPTSP-UFG.

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 flagelares de *S. typhimurium* e *S. oranienburg* (12). A principal diferença entre os camundongos H/f e L/f é a capacidade de produzir anticorpos.

Em trabalhos anteriores, analisou-se 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 caracterizadas por infiltrados inflamatórios focais e/ou difusos, com pequena quantidade de fungos. Nos animais L/f detectou-se intensa presença de granulomas contendo numerosos microrganismos (4,6). Estes camundongos apresentaram respostas segregadas de anticorpos para os antígenos protéico e polissacarídico do *P. brasiliensis* (5,6).

A transferência passiva de líquido ascítico imune obtido de animais H/f, para camundongos L/f infectados com  $10^6$  formas L viáveis de *P. brasiliensis*, induziu redução do número de granulomas 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 (6).

Com base nestes resultados, estudou-se o efeito de anticorpos IgG e IgM purificados a partir do soro de animais H/f normais ou cronicamente infectados, no desenvolvimento das lesões induzidas pelo *P. brasiliensis* em animais L/f em fase inicial de infecção.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e infecção

Camundongos H/f e L/f, obtidos por cruzamentos bidirecionais quanto ao título de anticorpos aglutinantes para antígenos flagelares de *Salmonellae sp* (12), foram utilizados no presente trabalho. Animais de geração F43, com cinco semanas de idade, foram inoculados intraperitonealmente com  $10^6$  formas L viáveis de *P. brasiliensis* da cepa 18, em volume de 0,5 ml de salina estéril.

### Suspensões de *P. brasiliensis*

A cepa de *P. brasiliensis* ICB Pb 18, isolada de um caso humano de paracoccidiodomicose no Brasil, foi mantida em meio de Fava Netto sólido a 33-36°C, sendo os repiques efetuados semanalmente. Suspensões homogêneas do fungo foram preparadas em salina estéril, a partir de culturas do fungo de sete dias, e a determinação do número de leveduras foi feita em câmara de Neubauer. O teste de viabilidade foi efetuado usando-se o brometo de etídio e diacetato de fluoresceína (3).

### Soroimune

Animais H/f infectados com  $10^6$  formas L viáveis de *P. brasiliensis* foram sangrados aos 70 dias de infecção, e o "pool" de soros foi destinado ao fracionamento de anticorpos IgM e IgG, apresentando título de 1:16 pelo micrométodo de fixação do complemento (9). Como controle, utilizou-se anticorpos fracionados a partir de um "pool" de soros oriundos de animais H/f normais.

### Fracionamento dos anticorpos

Os anticorpos IgG foram obtidos por fracionamento em colunas de proteína A-Sepharose 4B(Sigma), sendo adsorvidos à coluna previamente equilibrada com tampão tris-HCl pH=8,6  $\mu=0,15$  e eluídos com tampão glicina-HCl salina pH=2,8  $\mu=0,15(7)$ . Os efluentes eluídos foram reunidos e concentrados para o volume original de soro não fracionado.

Uma parte dos soros, após precipitação com sulfato de amônio e posterior diálise contra salina tamponada, foi cromatografada em coluna de Sephadex G-200(Sigma), objetivando a obtenção de anticorpos IgM. O material eluído no primeiro pico foi concentrado para o volume original de soro não fracionado(13).

Verificou-se a presença de apenas uma linha de precipitação após imunoelutroforese do material cromatografado, utilizando-se na canaleta central, soro de coelho antigamaglobulina de camundongo.

### Transferência passiva de anticorpos

Animais L/f infectados intraperitonealmente com  $10^6$  formas L viáveis de *P. brasiliensis*, receberam por via endovenosa, após 7, 14, 21 e 28 dias de infecção, 0,5 ml de anticorpos IgM ou IgG originários de camundongos H/f normais ou cronicamente infectados. Aos 35 dias de infecção, os animais foram sacrificados, sendo os órgãos colhidos e destinados ao estudo histopatológico. Um grupo controle adicional foi constituído por animais L/f infectados, que não receberam tratamento algum.

### Histopatologia

Fragmentos representativos de fígado 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.

NUNES, I.A. & CARVALHAES, M.S. Efeito da transferência passiva de imunoglobulinas na evolução da paracoccidiodomicose experimental em camundongos maus produtores de anticorpos. Rev. Pat. Trop., 21(1):13-20, jan./jul. 1992

## RESULTADOS

### Transferência passiva de anticorpos IgM

Os animais L/f receptores de IgM originária de camundongos H/f cronicamente infectados apresentaram ligeira redução do número de lesões e de fungos no fígado e nos pulmões, quando comparados aos animais L/f infectados que não receberam tratamento algum, ou a camundongos L/f infectados receptores de IgM normal. Esta diferença entretanto, não foi estatisticamente significativa (tabela 1).

**TABELA 1** - Análise quantitativa do número de lesões e de fungos presentes no fígado e pulmões de animais L/f infectados ip. com  $10^6$  formas L viáveis de *P. brasiliensis* da cepa 18, submetidos ao tratamento com IgM proveniente de animais H/f normais (IgM-N) ou cronicamente infectados (IgM-I).

Tratamento	Nº de Granulomas (X ± S) (10 campos, aumento de 100 X)		Nº de Fungos (X ± S) (10 campos, aumento de 400 X)	
	Pulmão	Fígado	Pulmão	Fígado
Nenhum <sup>(5)</sup>	36,2 ± 13,7	22,4 ± 07,1	81,1 ± 15,8	69,2 ± 14,2
IgM-N <sup>(5)</sup>	32,6 ± 13,3	23,6 ± 13,2	61,2 ± 18,0	60,0 ± 18,2
IgM-I <sup>(8)</sup>	20,0 ± 05,8	14,0 ± 03,4	41,2 ± 09,3	51,3 ± 05,0

entre parêntesis: nº de animais examinados

### Transferência passiva de anticorpos IgG

Animais L/f receptores de IgG obtida de camundongos H/f cronicamente infectados mostraram redução significativa do número de lesões e de fun-

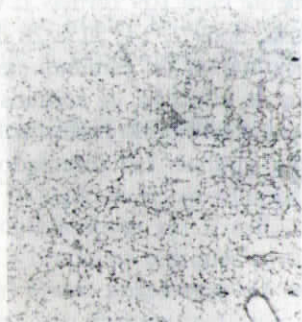


Fig. 1a- Corte de pulmão de animal L/f recipiente de IgG obtida de camundongos H/f imunes (aumento 10X)



Fig. 1b- Corte de pulmão de animal L/f recipiente de IgG obtida de camundongos H/f normais (aumento 10X)

NUNES, I.A. & CARVALHAES, M.S. Efeito da transferência passiva de imunoglobulinas na evolução da paracoccidiodomicose experimental em camundongos maus produtores de anticorpos. Rev. Pat. Trop., 21(1):13-20, jan./jul. 1992

gos no fígado e pulmões (fig. 1a), quando comparados aos controles infectados tratados (fig. 1b) ou não com IgG normal. A redução do número de lesões e de fungos foi mais acentuada a nível pulmonar que a nível hepático (tabela 2).

**TABELA 2** - Análise quantitativa do número de lesões e de fungos presentes no fígado e pulmões de animais L/f infectados ip. com  $10^6$  formas L viáveis de *P. brasiliensis* da cepa 18, submetidos ao tratamento com IgG proveniente de animais H/f normais (IgG-N) ou cronicamente infectados (IgG-I).

Tratamento	Nº de Granulomas (X ± S) (10 campos, aumento de 100 X)		Nº de Fungos (X ± S) (10 campos, aumento de 400 X)	
	Pulmão	Fígado	Pulmão	Fígado
Nenhum <sup>(5)</sup>	36,2 ± 13,7	22,4 ± 07,1	81,5 ± 15,8	69,2 ± 14,2
IgG-N <sup>(5)</sup>	35,4 ± 12,5	19,2 ± 04,5	71,3 ± 08,3	70,6 ± 25,0
IgG-I <sup>(9)</sup>	09,4 ± 06,2	06,6 ± 02,7	16,6 ± 11,7	20,4 ± 14,3

entre parêntesis: nº de animais examinados

## DISCUSSÃO

A resposta imune-humoral tem sido bem estudada na paracoccidiodomicose humana e parece estar normal; entretanto, a imunidade celular está geralmente comprometida (10).

As reações sorológicas na doença humana são utilizadas para fins diagnósticos, acompanhar a evolução da doença durante a terapia e no controle de cura. Os títulos de anticorpos apresentados por pacientes com paracoccidiodomicose estão diretamente relacionados à gravidade da doença; entretanto, não é rara a ocorrência de indivíduos com formas graves disseminadas, que apresentam sorologia negativa (8). Os testes sorológicos têm sido exaustivamente estudados, e alguns de seus parâmetros de análise estão bem determinados; porém, a ação dos anticorpos sobre o fungo permanece obscura.

Com o objetivo de avaliar a participação de imunoglobulinas específicas na paracoccidiodomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos da Seleção III, resolveu-se estudar o efeito da transferência passiva de anticorpos IgM e IgG obtidos de animais H/f cronicamente infectados, no desenvolvimento da doença induzida por  $10^6$  fungos viáveis, em camundongos L/f. Com a transferência passiva de anticorpos IgM específicos para o fungo houve uma redução insignificante da quantidade de lesões e microrganismos no fígado e pulmões de camundongos L/f em fase inicial de infecção (35 dias). A transferência passiva de anticorpos IgG específicos para o *P. brasiliensis* induziu redução significativa do número de lesões e de fungos em animais L/f, principalmente ao nível pulmonar. Comparando os resultados da

transferência passiva de líquido ascítico imune com os resultados da transferência de anticorpos IgG específicos para o fungo, verificou-se que os primeiros foram mais eficientes na redução do número de lesões e, principalmente da quantidade de leveduras, nos pulmões e fígado de animais *L/f* infectados. De fato, o líquido ascítico pode conter outros moduladores da resposta imune (INF, TNF, IL-1, etc.) além, dos anticorpos, os quais devem participar na modulação do crescimento e das lesões induzidas pelo *P. brasiliensis*.

É importante ressaltar que em camundongos *H/f* existe um claro aumento de IgG2a após imunização com o antígeno selecionador, e uma constante ausência deste isótopo na linhagem *L/f* (11). Não é sabido se os anticorpos IgG2a estão envolvidos no controle da infecção, mas pode-se sugerir que os mesmos participem na destruição ou bloqueio da multiplicação do fungo.

#### SUMMARY

#### Role of the passive transfer of immunoglobulins in the evolution of experimental paracoccidiodomycosis in low antibody-producer mice

*L/f* mice infected with  $10^6$  viable L forms of *Paracoccidioides brasiliensis* strain 18 were injected endovenously with 0.5 ml of IgM or IgG obtained from non-immune or immune *H/f* mice, until the 28th day of infection (7th, 14th, 21st and 28th day). Animals were sacrificed 35 days after infection and thin slices of lung and liver were collected and routinely processed for histopathology. Passive transfer of IgM to *L/f* infected mice had no effects: however, the passive transfer of IgG containing specific antibodies, to *L/f* infected mice, reduced the number of granulomas and the amount of fungi inside them.

#### 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 e fotografias. Ao Prof. Oswaldo Sant'Anna, pelo fornecimento de animais.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIOZZI, G.; MOUTON, D.; SANT'ANNA, O. A.; PASSOS, H. C.; GENNARI, M.; FERREIRA, V. C.; HEUMAN, A. M.; BOUTHILLIER, Y.; IBANEZ, O. M.; STIFFEL, C. & SIQUEIRA, M. Genetics

- of immunoresponsiveness to natural antigens in mouse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 85:31-98, 1979.
- BLUM, K. & CIOLI, D. Behavior of Biozzi high and low responder mice upon infection with *Shistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 8:52-56, 1978.
- CALICH, V. L. G.; PURCHIO, A. & PAULA, C. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia* 66:175-177, 1978.
- CARVALHAES, M. S. Paracoccidiodomicose experimental em camundongos bons e maus produtores de anticorpos. Tese de Mestrado, ICB-USP, 1984.
- CARVALHAES, M.S.; DIAS DA SILVA, W.; BIRMAN, E. G.; SANT'ANNA, O. A.; ABRAHAMSON, P. & KIPNIS, T. L. Experimental Paracoccidiodomycosis in high and in low antibody producers mice: II. The infection in F1 generation. In: Genetic Control of Host Resistance to Infection and Malignancy p.421-428, Alan R. Liss, Inc., 1985.
- CARVALHAES, M. S.; DIAS DA SILVA, W.; BIRMAN, E. G.; SANT'ANNA, O. A.; ABRAHAMSON, P. & KIPNIS, T. L. Experimental Paracoccidiodomycosis 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.* 137C: 127-141, 1986.
- EY, P. L.; PROWAE, S. J. & JENKIN, C. R. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein-A-sepharose. *Immunochemistry* 15:429-436, 1978.
- FAVA NETTO, C. Imunologia da paracoccidiodomicose. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 18:42-53, 1976.
- KAUFFMANN, L.; HUPPERT, M.; FAVA NETTO, C.; POLLAK, L. & RESTREPO, A. Manual of standardized serodiagnostic procedures for systemic mycosis. Complement fixation tests. Part III. Pan American Health Organization, Washington, 1974.
- MUSATTI, C. C.; RESKALLAH, M. T.; MENDES, E. & MENDES, N. F. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidiodomycosis. *Cell. Immunol.* 24:265-378, 1976.
- SANT'ANNA, O. A.; MOPUTON, 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.
- SIQUEIRA, M.; BANDIERI, A.; REIS, M. H.; SANT'ANNA, O. A. & BIOZZI, G. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to

flagellar and somatic antigens of *Salmonellae*. **Eur.J.Immunol.**, 66:241-249, 1976.

13. WEIR, D. M. Immunochimistry. Vol. 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne, 3rd Edition, Chapter 8, p. 8.11-8.15, 1978.