UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO –
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

**Evolução da aspergilose pulmonar invasiva produzida em
camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti
GR-1/Ly-6G e infectados com amostras de *Aspergillus*
fumigatus que apresentaram distintos padrões de produção
de elastase**

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível no programa de
Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de
São Paulo (FMRP-USP).**

Raphael Luiz de Holanda e Silva

Ribeirão Preto
2012

Raphael Luiz de Holanda e Silva

Evolução da aspergilose pulmonar invasiva produzida em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti GR-1/Ly-6G e infectados com amostras de *Aspergillus fumigatus* que apresentaram distintos padrões de produção de elastase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Patologia

Curso: Patologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei

**Ribeirão Preto
2012**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

de Holanda e Silva, Raphael Luiz

Evolução da aspergilose pulmonar invasiva produzida em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti GR-1/Ly-6G e infectados com amostras de *Aspergillus fumigatus* que apresentaram distintos padrões de produção de elastase. Ribeirão Preto, 2012.

111p.: Il; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Área de Concentração: Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei.

1. Aspergilose Pulmonar Invasiva.
2. *Aspergillus fumigatus*.
3. Elastase.
4. Anticorpo anti GR-1/Ly-6G.
5. Histopatologia.

RAPHAEL LUIZ DE HOLANDA E SILVA

Evolução da aspergilose pulmonar invasiva produzida em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti GR-1/Ly-6G e infectados com amostras de *Aspergillus fumigatus* que apresentaram distintos padrões de produção de elastase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências na Área de Concentração de Patologia.

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedicatória

À minha querida amiga, Stephanie Nishiyama, cujo amor e saudade estarão sempre presentes em meu coração e em meu pensamento. Tenho sempre as mais belas recordações sobre você.

**Tenho razão de sentir saudade,
tenho razão de te acusar.
Houve um pacto implícito que rompestes
e sem te despedires foste embora.
Detonaste o pacto.
Detonaste a vida geral, a comum aquiescência
de viver e explorar os rumos de obscuridade
sem prazo sem consulta sem provocação
até o limite das folhas caídas na hora de cair.**

**Antecipaste a hora.
Teu ponteiro enlouqueceu, enlouquecendo nossas horas.
Que poderias ter feito de mais grave
do que o ato sem continuação, o ato em si,
o ato que não ousamos nem sabemos ousar
porque depois dele não há nada?**

**Tenho razão para sentir saudade de ti,
de nossa convivência em falas camaradas,
simples apertar de mãos, nem isso, voz
modulando sílabas conhecidas e banais
que eram sempre certeza e segurança.**

**Sim, tenho saudades.
Sim, acuso-te porque fizeste
o não previsto nas leis da amizade e da natureza
nem nos deixaste sequer o direito de indagar
porque o fizeste, porque te foste.**

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais e ao meu irmão Felipe por sempre me apoiarem. Saiba que estarei ao lado de vocês para o que for necessário. Amo muito vocês e sinto-me lisonjeado por fazer parte de uma família tão especial. Amo vocês; do fundo do meu coração.

Aos meus avôs, pessoas maravilhosas e exemplos de vida, obrigado por tudo.

Aos meus tios, tias, primos e primas. Agradeço cada um de vocês por serem partes essenciais e integrantes da minha vida. Saiba que esse trabalho tem uma contribuição de cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei, pela paciência e pelo constante auxílio na elaboração deste trabalho. Às inúmeras qualidades humanas e acadêmicas que me passou nesses três anos de convivência. Muito Obrigado!

À Elisabete Rosa Milani, uma pessoa com um carisma e competência indescritíveis. Saiba que sua constante ajuda foi de extrema importância para a realização e término deste trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Rafael Taglialegna pelo auxílio nos experimentos pilotos de dosagem de elastase e pela grande gentileza em emprestar o seu laboratório em Paraguaçu-MG para a realização destes.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto e Araraquara, pessoas integrantes do meu caráter que levarei por toda a minha vida. Muito Obrigado.

Aos meus irmãos de alma da República Várzea de Araraquara. Faltam-me palavras para descrever o quão importantes vocês foram não só para a elaboração deste trabalho, como ainda são para a minha vida. Muito Obrigado.

“Importante dar-se conta de que não conseguimos nada sozinho...”

Ao Prof. Dr. Dario Simões Zamboni, pela disponibilização do hibridoma RB6-8C5 para a produção do anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G e pela utilização do microscópio (Leica DMI 4000B) para documentação fotográfica.

Ao Prof. Dr. Paulo Rodrigues Coelho, por permitir o uso dos equipamentos necessários na etapa de extração de DNA.

À Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira, pela abertura do seu laboratório para uso dos equipamentos de espectrofotômetro e centrífugas, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi por permitir o uso da centrífuga do seu laboratório para as constantes etapas de purificação do anticorpo.

À Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos por ceder o seu laboratório para a realização da coloração de GMS.

À Profa. Dra. Lucila Leiko Kagohara Elias por me auxiliar na escolha dos métodos estatísticos utilizados neste trabalho.

Às (Aos) técnicas (os) de laboratório:

Sandra Maria Oliveira Thomaz, por me auxiliar na purificação do anticorpo.

Vani Maria Alves, por me auxiliar no processamento, realização de cortes histológicos e colorações de Hematoxilina-Eosina e Weigert.

Elaine Medeiros Floriano pela realização da coloração de GMS.

Carol Kabori da Fonseca por me auxiliar nas etapas de extração de DNA.

Maria Dolores Seabra Ferreira e José Augusto Maulin por me auxiliarem respectivamente nas etapas de processamento do lavado broncoalveolar para análise por microscopia eletrônica de transmissão e obtenção das imagens obtidas mostradas neste trabalho.

Domingos Soares de Souza Filho pelos cuidados com os animais de experimentação.

Maria Inês Castaneda pela esterilização de todos os materiais, soluções, meios de cultura, instrumentos cirúrgicos utilizados neste trabalho.

Lúcia Maria Lacerda da Silva pela manutenção da limpeza do laboratório e pela convivência agradável.

Além da ajuda técnica gostaria de salientar as qualidades humanas dessas pessoas, fundamentais para a elaboração deste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação

Aos pós-graduandos dos respectivos laboratórios, pela gentileza e boa vontade para me auxiliar na utilização dos equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho, e também na elucidação de frequentes dúvidas surgidas no manuseamento destes. Um agradecimento especial ao pós-graduando Jonilson Berlink Lima, pela fundamental ajuda nas etapas de cultivo celular do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly.6G, amplamente utilizado em todas as etapas deste trabalho. Muito Obrigado.

À pós-graduanda Priscilla Aparecida Tartari Pereira por me auxiliar nas técnicas de cirurgia intratraqueal e coleta do lavado broncoalveolar, amplamente efetuadas neste trabalho.

À pós-graduanda Mariângela Ottoboni Brunaldi pelo fundamental auxílio nas análises histopatológicas realizadas neste trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Apoio Administrativo

À secretária do Departamento de Patologia e Medicina Legal Camila de Luca Zambonini Gimenes pelo grande auxílio na parte burocrática deste trabalho, e também por estar sempre disposta a tirar inúmeras dúvidas que existiram no decorrer dos anos. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Às secretárias do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos pela valiosa contribuição e atenção dispensada.

À agência de fomento FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa (Processo nº 2009/07889-8) e concessão de bolsa de mestrado (Processo nº 2009/04667-4).

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA) pelo auxílio financeiro disponibilizado para apresentações de trabalho em congressos, com resultados obtidos neste trabalho.

RESUMO

SILVA, R.L.H. **Evolução da aspergilose pulmonar invasiva produzida em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti GR-1/Ly-6G e infectados com amostras de *Aspergillus fumigatus* que apresentaram distintos padrões de produção de elastase**: 2012. 111p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Aspergilose Pulmonar Invasiva é uma doença fúngica oportunista, causada principalmente por *Aspergillus fumigatus*, que acomete pacientes imunodeprimidos. Para melhor compreensão dessa micose inicialmente estabelecemos em camundongos C57BL/6 um modelo experimental de depleção de neutrófilos por inoculação intraperitoneal de anticorpos anti-GR-1/Ly-6G, confirmado por contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos. A seguir, avaliamos a evolução da infecção pulmonar experimental utilizando duas amostras de *A. fumigatus*, caracterizadas previamente em fraca (amostra 699) e forte (amostra 1753) produtoras de elastase. Nenhum dos animais imunocompetentes e infectados evoluiu para o óbito, no período de 7 dias de observação. Os animais neutropênicos, infectados por ambas as amostras, apresentaram 100% de mortalidade após 5 dias, com curvas de sobrevivência praticamente sobrepostas, sugerindo que a maior contribuição para a virulência foi a condição imunológica e não a atividade de elastase da amostra fúngica. Para análise do comprometimento pulmonar, os animais foram sacrificados nos tempos 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Durante a evolução da infecção experimental foi observada uma redução da carga fúngica nos pulmões dos animais, para ambas as amostras de *A. fumigatus*, mas não foi observada uma redução da carga fúngica, diferenciada e estatisticamente significativa, entre os grupos de animais neutropênicos e imunocompetentes. O padrão celular do infiltrado inflamatório observado nos pulmões dos animais neutropênicos, infectados por qualquer uma das amostras de *A. fumigatus*, mostrou predominância de células mononucleares, em infiltrados difusos, indícios de angioinvasão e invasão brônquica com ruptura de fibras elásticas em ambas as estruturas, além de exuberância de filamentação dos conídios para ambas as amostras fúngicas, desde os tempos iniciais da infecção experimental. O processo inflamatório observado nos pulmões dos animais imunocompetentes, infectados por ambas as amostras de fungos, foi constituído nos tempos iniciais por neutrófilos e se tornou exuberante após 72 horas, com predomínio de macrófagos. Foi observada integridade de vasos

sanguíneos e discreta ruptura de parede brônquica no parênquima pulmonar. Para estes animais, salienta-se a ausência de transformação dos conídios de *A. fumigatus* em hifas para a amostra 699, em todos os períodos de observação. A contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) foi significativamente maior, 72 horas pós-infecção, para os animais neutropênicos e imunocompetentes, infectados por ambas as amostras do fungo. A contagem diferencial revelou a presença de macrófagos e neutrófilos, com a primeira célula sempre em maior quantidade no LBA dos animais neutropênicos em comparação com os animais imunocompetentes, independentemente do período da infecção e da amostra fúngica infectante. Ao contrário, o número de neutrófilos foi sempre mais relevante nos animais imunocompetentes. Por microscopia eletrônica de transmissão foi observado que a interação do fungo (conídios ou hifas) com as células de defesa do LBA envolveu íntima adesão e fusão entre os componentes de superfície de ambas as células. A presença de hemoglobina no LBA foi oriunda de lesão alvéolo-capilar causada pelo crescimento e invasão provocados pelas amostras fúngicas ou por lesão determinada pela própria reação inflamatória. Concluímos que os neutrófilos são essenciais na defesa contra *A. fumigatus*, pois na ausência dessa população celular os fungos rapidamente invadem e lesam o parênquima pulmonar. No entanto, deve-se considerar que a simples presença do fungo em animais imunocompetentes induz a migração de neutrófilos para o sítio da infecção, os quais também causam dano tecidual. As amostras de *A. fumigatus* com perfis distintos de produção de elastase não refletiram em diferenças significantes para a mortalidade ou gênese das lesões pulmonares observadas em camundongos neutropênicos, sugerindo que embora a elastase contribua para a ruptura das fibras elásticas observadas no tecido pulmonar, outros fatores de virulência, como a morfogênese, podem assumir um papel mais relevante para a patogênese da API experimental.

Palavras-chave: Aspergilose Pulmonar Invasiva, *Aspergillus fumigatus*, elastase, anticorpos anti GR-1/Ly-6G, histopatologia.

ABSTRACT

SILVA, R.L.H. **Evolution of invasive pulmonary aspergillosis produced in mice treated with monoclonal antibodies anti GR-1/Ly-6G and infected with *Aspergillus fumigatus* strains which presented distincts patterns of production of elastase.** 2012 111p. Dissertation. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

Invasive Pulmonary Aspergillosis (IPA) is an opportunistic fungal disease, caused mainly by *Aspergillus fumigatus*, that affects immunocompromised patients. To better understand this mycoses, we originally established in C57BL/6 mice an experimental model of neutrophils depletion by intraperitoneal inoculation of antibodies anti GR-1/Ly-6G, confirmed by total and differential leukocyte counts from blood. Next, we evaluated the evolution of experimental pulmonary infection using two strains of *A. fumigatus*, previously characterized as weak (strain 699) and strong (strain 1753) elastase producers. None of immunocompetent infected mice died with 7 days of observation, while neutropenic mice, infected with both strains, showed 100% mortality after 5 days, with survival curves nearly overlap, suggesting that the major contribution to the virulence was the immune status instead of elastase activity of each fungal strain. For analysis of lung parenchyma, mice were sacrificed 24, 48 and 72 hours post-infection. During the course of experimental infection it was observed a reduction of fungal burden in the lungs, for both strains of *A. fumigatus*, but this reduction was not statistically significant between the infected groups (neutropenic and immunocompetent). The cellular pattern of the inflammatory infiltrate observed in lungs from neutropenic mice, infected with both strains of *A. fumigatus*, revealed a predominance of mononuclear cells, a diffuse pattern and clear evidences of angioinvasion, bronchial disruption with break of elastic fibers in both structures, besides exuberance of conidia filamentation for both fungal strains, since the early period of experimental infection. The inflammatory process observed in lungs from immunocompetent mice, infected with both fungal strains, was composed on early times by neutrophils and became exuberant after 72 hours, with predominance of macrophages. It was observed integrity of blood vessels and moderate bronchial wall disruption in lung parenchyma. A relevant observation was the lack of transformation of conidia in hyphae for 699 *A. fumigatus* strain, in all periods of observation. Total leukocytes count in bronchoalveolar lavage (BAL) was significantly higher at 72 hours post-infection for both groups infected with both strains. The differential count revealed the presence of macrophages

and neutrophils, with the former always in greater percentage in BAL from neutropenic mice and the latter always more elevated in immunocompetent group. Analysis by transmission electron microscopy demonstrated that the interaction of fungal structures (conidia or hyphae) with the defense cells (neutrophils or macrophages) of BAL involved an intimate adhesion and fusion between the surface components from both cells. The presence of hemoglobin in BAL was a result of alveolar injury caused by the fungal development and invasion, but also by injuries determined by the inflammatory process itself. We concluded that neutrophils have a critical role against *A. fumigatus* since the pathogen quickly invades and damages the lung parenchyma in its absence. However, we must consider that the mere presence of *A. fumigatus* in immunocompetent mice induces the neutrophils migration to the infection site, which can also cause a tissue injury. Strains of *A. fumigatus* with distinct patterns of elastase production did not reflect in significant differences in mortality or origin of pulmonary lesions observed in neutropenic mice, suggesting that although elastase contributes to elastic disruptions observed in pulmonary tissue, another virulence factors, such as morphogenesis, can assume a more relevant role for pathogenesis of experimental IPA.

Keywords: Invasive Pulmonary Aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, elastase, anti GR-1/Ly-6G antibodies, histopathology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ágar Czapek
ASDC	Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol
ABPA	Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
APCN	Aspergilose Pulmonar Crônica Necrotizante
API	Aspergilose Pulmonar Invasiva
BSA	Albumina Sérica Bovina
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GMS	Gomori Metenamina Prata
HE	Hematoxilina - Eosina
Hb	Hemoglobina
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LBA	Lavado Broncoalveolar
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SERPAT	Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamino
TMO	Transplante de Medula Óssea
UETDI	Unidade Especial de Tratamento em Doenças Infecciosas
UFC	Unidade Formadora de Colônias
USP	Universidade de São Paulo
W	Coloração de Weigert

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Origem dos isolados clínicos de <i>Aspergillus fumigatus</i> utilizados neste estudo.....	38
Tabela 2. Classificação e atividade média de elastase produzida por amostras de <i>A. fumigatus</i> , de acordo com o período de incubação. Em destaque as amostras selecionadas para os experimentos subsequentes de infecção experimental.....	52
Tabela 3. Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue periférico de animais controles e animais tratados por via intraperitoneal com 150µL de PBS contendo 50µg do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G purificado, nos tempos 0 e 48 horas. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo, de 2 experimentos independentes.....	56
Tabela 4. Análise qualitativa e semi-quantitativa do padrão histológico observado nos pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, infectados com as amostras 699 e 1753 de <i>A. fumigatus</i> , de acordo com a evolução da infecção experimental (24, 48 e 72 hs). Os resultados representam médias das observações encontradas para tecidos de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes	69

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cultura pura e isolada da amostra 699 de <i>Aspergillus fumigatus</i> cultivada em Ágar-Czapek por 7 dias, à temperatura ambiente. Colônia algodonosa, coberta por grânulos que dão a tonalidade ao fungo (tons de verde oliva)	39
Figura 2. Inoculação intratraqueal de <i>A. fumigatus</i> em camundongos machos C57BL/6.....	46
Figura 3. Coleta do LBA em camundongos machos C57BL/6.....	47
Figura 4. Gel de agarose a 1,5%, após eletroforese convencional e coloração com brometo de etídio, evidenciando os produtos da PCR de 300pb resultantes da amplificação das regiões do DNA de amostras de <i>A. fumigatus</i> quando do uso de oligonucleotídeos específicos. M = marcador de peso molecular (pb), 699 = amostra 699 de <i>A. fumigatus</i> , 1753 = amostra 1753 de <i>A. fumigatus</i> , Af = amostra de <i>Aspergillus flavus</i> , Pen = amostras de <i>Penicillium</i> sp, C- = controle negativo (reação sem DNA genômico).....	53
Figura 5. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10%, corado por prata. 1, 2 e 3 = Alíquotas dos anticorpos monoclonais anti-GR-1/Ly-6G purificados obtidos a partir do hibridoma RB6-8C5 e PM = marcador de peso molecular em Kda	54
Figura 6. Imunofluorescência indireta de células inflamatórias coletadas do lavado peritoneal de camundongos desafiados com tioglicolato de sódio. Com filtro azul observam-se núcleos das células coradas inespecificamente com DAPI. Com filtro vermelho observa-se a superfície de neutrófilos reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G, em 3 diferentes diluições, e revelada com anticorpo secundário conjugado a Alexa-fluor 594®. Na sobreposição de filtros observa-se a dupla marcação. As setas brancas apontam os neutrófilos	55
Figura 7. Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de <i>A. fumigatus</i> . Os resultados apresentados são representativos de 2 experimentos independentes....	57
Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a interação de conídios (A-D) e hifas (E-F) com células coletadas do LBA de camundongos C57BL/6 infectados com amostras de <i>A. fumigatus</i> . Salienta-se a íntima adesão com fusão entre os constituintes de superfície dos macrófagos e dos fungos. Aumentos de 8000X, 20.000X, 40.000X, 67.000X, 6700X e 10.000X, respectivamente de A a F	58
Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a interação de conídios (A-F) e hifas (G-I) com células coletadas do LBA de camundongos C57BL/6 infectados com amostras de <i>A. fumigatus</i> . Salienta-se a internalização das estruturas fúngicas em macrófagos (A-F) e neutrófilos (G-I), as quais são circundadas por membrana vacuolar. Aumentos de 10.000X, 27.000X, 40.000X, 10.000X, 27.000X e 100.000X, respectivamente de A a I.....	59

- Figura 10.** Concentração de hemoglobina ($\mu\text{g/mL}$) no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da dosagem de Hb de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. $p < 0,05$ sendo ● = entre 24 e 48h; ●● = entre 24 e 72h; ●●● = entre 48 e 72h, segundo teste estatístico utilizado: two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni..... 60
- Figura 11.** Contagem total de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem do LBA de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. $p < 0,01$ sendo ★ = entre N e IC e ● = entre 24 e 72h; $p < 0,001$ para π = entre 24 e 72h segundo o teste estatístico utilizado: two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni..... 61
- Figura 12** Contagem diferencial de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem do LBA de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. $p < 0,001$ sendo ★ = entre N e IC, $\phi\phi$ = entre 24 e 72h; $p < 0,01$ sendo π = entre 24 e 48h, $\pi\pi$ = entre 24 e 72h; $p < 0,05$ sendo ●●● = entre 48 e 72h, segundo o teste estatístico utilizado: two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni 62
- Figura 13.** Contagem total de leucócitos ($\times 10^6/\text{mL}$) presentes no sangue de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem do sangue de animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. ★ e ● com $p < 0,05$ para cada período quando comparado ao grupo controle (-24h); ★★ e ●● com $p < 0,01$ para cada período quando comparados ao grupo controle (-24h), segundo o teste estatístico utilizado: one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett..... 63
- Figura 14.** Contagem diferencial de leucócitos presentes no sangue de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem do sangue de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. ● com $p < 0,01$ para cada período quando comparados ao grupo controle (-24h); ★ com $p < 0,05$ para cada período quando comparados ao grupo controle (-24h); Teste estatístico utilizado: one-way ANOVA com pós teste de Dunnett 64
- Figura 15.** Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs), corados por HE. As figuras são representativas do processo inflamatório gerado por cada amostra de fungo durante a evolução da API experimental. Seta cheia evidencia um infarto hemorrágico e seta tracejada mostra área de necrose inflamatória. Aumentos (A-L respectivamente): 100x, 100x, 100x, 200x, 40x, 100x, 100x, 200x, 200x, 100x, 100x e 100x..... 66

- Figura 16.** Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs), corados por GMS. As figuras são representativas da morfologia (conídios ou hifas), carga fúngica e da invasividade gerada por cada amostra de fungo durante a evolução da API experimental. Setas evidenciam angioinvasão. Aumentos (A-L respectivamente): 200x, 100x, 400x, 200x, 400x, 100x, 100x, 200x, 100x, 200x, 100x e 200x..... 67
- Figura 17.** Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs), corados por Weigert (W). As figuras são representativas da ruptura ou não das fibras elásticas de vasos sanguíneos e ramos brônquicos gerados por cada amostra de fungo durante a evolução da API experimental. Setas vermelhas evidenciam disrupção vascular enquanto que setas azuis evidenciam disrupção brônquica. Aumentos (A-L respectivamente): 100x, 100x, 100x, 200x, 100x, 100x, 100x, 200x, 100x, 100x, 100x e 100x..... 68
- Figura 18.** Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, indicando o mesmo campo corado por HE e GMS, infectados com a amostra 699 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs). Seta cheia evidencia exuberante filamentação. Seta tracejada mostra conídios sem filamentação. Todas as imagens foram obtidas em aumento de 100x..... 70
- Figura 19.** Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, indicando o mesmo campo corado por HE e GMS, infectados com a amostra 1753 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs). Seta azul indica área de infarto hemorrágico. Seta vermelha evidencia intensa filamentação. Todas as imagens foram obtidas em aumento de 100x..... 70
- Figura 20.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem de UFC de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. $p < 0,05$ para ● = entre 24 e 48h e ●● = entre 24 e 72h; $\pi\pi = p < 0,01$ entre 48 e 72h, segundo teste estatístico utilizado: two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni..... 71
- Figura 21.** Unidades formadoras de colônias de *A. fumigatus* em meio ASDC obtidas a partir do homogeneizado de tecido pulmonar murino, após 48 horas de incubação à temperatura ambiente. Imagens representativas de pulmão homogeneizado e diluído 10X, proveniente de animal neutropênico após 24 e 48 horas da infecção experimental com a amostra 699 de *A. fumigatus* 71

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. O Gênero <i>Aspergillus</i>	24
1.2. Fatores de virulência de <i>Aspergillus fumigatus</i>	25
1.3. Aspergilose pulmonar	26
1.4. Resposta imune pulmonar contra <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
1.4.1. Neutrófilos – Polimorfonucleares	30
1.5. Diagnóstico laboratorial da aspergilose pulmonar invasiva (API)	31
1.6. Tratamento da aspergilose pulmonar invasiva (API)	32
1.7. Modelos animais para o estudo da aspergilose pulmonar invasiva (API)	33
2. OBJETIVO	36
2.1. Objetivo geral	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Amostras de <i>Aspergillus fumigatus</i>	38
3.2. Determinação quantitativa da atividade de elastase de amostras de <i>Aspergillus fumigatus</i>	39
3.3. Confirmação da identificação da espécie das amostras de <i>Aspergillus</i> escolhidas para este estudo, por biologia molecular	40
3.4. Obtenção e purificação do anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G	41
3.4.1. Avaliação da purificação do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G	43
3.4.2. Avaliação da especificidade do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G	43
3.5. Preparo do inóculo para infecção experimental	44
3.6. Animais de experimentação	45
3.6.1. Depleção de neutrófilos com anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G – estabelecimento do modelo experimental de neutropenia	45
3.6.2. Determinação da virulência das amostras de <i>Aspergillus fumigatus</i> por curva de sobrevivência	45
3.6.3. Evolução da aspergilose pulmonar invasiva (API) experimental	46
3.6.3.1. Determinação da concentração de hemoglobina (Hb) no LBA	47
3.6.3.2. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA	48
3.6.3.3. Interação fungo/célula do hospedeiro por Microscopia Eletrônica de Transmissão	48

3.6.3.4. Análise histopatológica do pulmão infectado.....	49
3.6.3.5. Quantificação de fungos do tecido pulmonar	49
3.7. Análise Estatística	50
4. RESULTADOS	52
4.1. Determinação quantitativa da atividade de elastase de amostras de <i>Aspergillus fumigatus</i>	52
4.2. Confirmação da identificação de espécie de <i>Aspergillus</i> por PCR	53
4.3. Obtenção e purificação do anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G	54
4.3.1. Purificação do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G produzido.....	54
4.3.2. Especificidade do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G produzido	55
4.4. Depleção de neutrófilos com anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G - Estabelecimento do modelo experimental de neutropenia	56
4.5. Determinação da virulência das amostras de <i>Aspergillus fumigatus</i> por curva de sobrevivência.....	56
4.6. Análise da interação fungo/célula do hospedeiro por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	57
4.7. Evolução da aspergilose pulmonar invasiva (API) experimental.....	59
4.7.1. Determinação da concentração de hemoglobina (Hb) no LBA.....	59
4.7.2. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA.....	60
4.7.3. Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico	63
4.7.4. Análise histopatológica do pulmão infectado com <i>A. fumigatus</i>	65
4.7.5. Quantificação de fungos do tecido pulmonar	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8. APÊNDICE	99
9. ANEXO.....	111

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento do número de pacientes imunodeprimidos, está ocorrendo um aumento significativo na frequência das infecções fúngicas oportunistas. Tais infecções apresentam diferentes padrões de incidências e, por conseguinte, podem assumir distintas características epidemiológicas, dependendo da região geográfica (Nucci et al, 2010). Entre elas, a aspergilose pulmonar invasiva (API) está se tornando um sério problema para a medicina contemporânea, já que sua incidência vem aumentando nas últimas décadas (Groll et al, 1996; Kontoyiannis et al, 2002).

Epidemiologicamente, dados relativos à aspergilose pulmonar geralmente são bastante escassos. Vários países em desenvolvimento, tais como: Brasil, Argentina, Tailândia, Paquistão, dentre outros, vêm relatando aumento de casos relacionados à Aspergilose Invasiva (Nucci et al, 2010; Chakrabarti et al, 2011). Este dado pode ser atribuído a várias causas como: alta concentração de esporos de *Aspergillus spp* no ambiente em locais próximos a hospitais e práticas hospitalares inadequadas no cuidado com os pacientes imunocomprometidos (Chakrabarti et al, 2011).

Enquanto um indivíduo com aparente mecanismo de defesa normal é raramente infectado por *Aspergillus*, indivíduos que apresentam resistência secundariamente diminuída como resultado de doença debilitante grave, especialmente: leucemia e outras neoplasias hematológicas, transplante de medula óssea, transplante renal ou de outros órgãos sólidos, portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), ou que usam corticosteroides, imunossupressores, e antibióticos de largo espectro, são particularmente predispostos a terem aspergilose pulmonar, com possibilidade de disseminação sistêmica. O pulmão é o sítio mais comumente afetado porque o trato respiratório é a porta de entrada da infecção. Neutropenia e uso de altas doses de corticosteroides são os dois maiores fatores de risco para o desenvolvimento dessa micose oportunista, mas outros fatores importantes e também predisponentes são doença pulmonar obstrutiva crônica, falência hepática crônica, tuberculose e diabetes (Kwong-Chung & Bennett, 1992; Shibuya et al, 1997 e 2004; McNeil et al, 2002; Latgé, 1999 e 2001; Chakrabarti et al, 2011).

Nucci et al em 2008, em um estudo envolvendo 8 centros de Hematologia no Brasil, observaram que de 460 pacientes submetidos à transplante de células tronco hematopoiéticas ou com alguma desordem neoplásica (leucemia mieloide aguda ou síndromes

mielodisplásicas) sob tratamento com quimioterápico, 30(6,5%) desenvolveram Aspergilose Invasiva.

Nas infecções oportunistas causadas por fungos invasivos, a resposta do tecido contra os fungos é determinada pelo tipo e grau de diminuição da função dos mecanismos de defesa, que variam de paciente para paciente. A resultante reação observada nas lesões dos tecidos pode ser compreendida como uma representação fenotípica da interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e a virulência do fungo invasor (Shibuya et al, 1999).

1.1. O Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* engloba mais de 200 espécies reconhecidas, todas amplamente distribuídas em todas as regiões do mundo, uma vez que por sua reduzida necessidade nutricional pode ser isolado do solo, água, vegetação, material em decomposição e ar atmosférico, desempenhando um importante papel na reciclagem de compostos orgânicos (Lacaz et al, 2002, Latgé, 1999).

Este gênero pode apresentar reprodução sexuada (meiose) estando filogeneticamente alinhado ao filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales*, família *Trichocomaceae*. No entanto, a maioria das espécies apresenta reprodução assexuada (mitose) por meio de conídios, o que permite a inclusão desse fungo no Reino *Fungi*, divisão *Eucomycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* (Gugnani, 2003; Geiser, 2009).

A diferenciação das espécies de *Aspergillus* é realizada a partir da macro e micromorfologia do fungo. Na avaliação macroscópica, as colônias deste gênero apresentam diferentes colorações do verso e reverso, textura e topografia, conforme a espécie. Todas as espécies do gênero *Aspergillus* apresentam microscopicamente hifas regulares medindo aproximadamente 4µm de diâmetro, septadas, com bifurcações em ângulo agudo, e estrutura de esporulação caracterizada por conidióforos com extremidade dilatada formando a vesícula (columela), de onde se originam métulas ou fiálides (uni ou bisseriadas) que dão origem a grande quantidade de conídios, que facilmente são dispersos pelos ventos (Raper & Fennell, 1965; Sidrim & Rocha, 2004; Bennett, 2009). O nome desse gênero teve origem há aproximadamente 300 anos, quando Antonio Micheli observou a semelhança entre a estrutura morfológica produtora de conídios com o objeto litúrgico utilizado pela Igreja Católica para borrifar água benta. (“*aspergillum*” em latim).

Aspergillus fumigatus é responsável por 90-95% dos casos de aspergilose. No entanto existem outras espécies com potencial patogênico que também são comumente relacionadas com o desenvolvimento da micose, como é o caso de *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, entre outras espécies.

1.2. Fatores de virulência de *Aspergillus fumigatus*

Entre os fatores de patogenicidade relacionados ao fungo destacam-se: pequeno tamanho dos conídios (2 a 3µm), que permite que sejam inalados podendo causar infecção nos pulmões (alvéolos) e nos seios paranasais; capacidade de crescer a 37°C, possibilitando afetar o ser humano; capacidade de aderência a superfícies epiteliais e endoteliais, com grande tendência para invadir os vasos sanguíneos; produção de grande número de produtos extracelulares tóxicos para as células do hospedeiro (Latgé, 2001).

Diversos estudos (Rementeria et al, 2005; Abad et al, 2010) apontam para a compreensão de que a virulência de *A. fumigatus* é poligênica. Entre as moléculas e os genes que têm sido relacionados com a virulência desse fungo já foram relacionados:

- 1) Componentes da parede celular como β (1-3)-glucana, galactomanana e galactomanoproteínas (*Afmp1* e *Afmp2*);
- 2) enzimas de síntese de parede como quitina sintetases (*chsE* e *chsG*);
- 3) componentes de superfície “rodlets” (gen *rodA/hyp1*) e melanina-DHN (*pksP/alb1*) dos conídios, relacionados com a evasão da resposta imune;
- 4) catalases (Cat1p e Cat2p) e superóxido-dismutases (MnSOD e ZnSOD) participantes dos sistemas de detoxificação de compostos derivados do oxigênio;
- 5) toxinas como: fumigaclavina C, aurasperona C, ácido helvólico, fumagilina, Asp-hemolisina, a ribotoxina Asp fl/mitogilina F/restrictocina e gliotoxina, sendo esta última a principal toxina produzida por *A. fumigatus*, capaz de inibir os cílios da árvore respiratória além de propriedades imunossupressivas que atuam diretamente sobre as células do hospedeiro;
- 6) sideróforos do tipo hidroxamato (ornitina monooxigenase/SidA) para obtenção de ferro e fósforo (*fos1*, *fos2* y *fos3*) que permitem a adaptação às distintas condições tróficas;
- 7) quinases, *rasA*, *rasB*, *rhbA*, AMPc-Pka que por uma cascata de transdução de sinais regulam a morfogênese e/ou a utilização de nutrientes como o nitrogênio;
- 8) Hsp1/Asp fl2, *cgrA* ativados a 37°C, *cpcA* e homoaconitase/*lysF* envolvidos na biosíntese de aminoácidos, que mantêm a viabilidade celular de *A. fumigatus*;

9) proteínas enzimáticas como elastases, serina proteases alcalinas (Alp e Alp2), metaloproteases (Mep), aspártico proteases (Pep e Pep2), dipeptidilpeptidases (DppIV e DppV), fosfolipase C e fosfolipase B (Plb1 e Plb2) que favorecem a penetração do microrganismo durante a infecção.

A produção de elastases é considerada particularmente relevante porque a elastina é um constituinte que se encontra em proporção significativa nos pulmões, principal sítio de infecção por *A. fumigatus*.

Kothary et al (1984) mostraram que embora em quantidades variáveis, cerca de 75 amostras desse fungo apresentaram atividade de elastase em meios com presença de elastina como única fonte de nitrogênio. Seis amostras produtoras de elastase, quando inoculadas em camundongos, conduziram estes ao óbito entre 48 a 96 horas pós-infecção, e na necropsia, os pulmões desses animais mostravam inúmeras hifas e necrose dos alvéolos, enquanto os pulmões dos camundongos infectados com amostras não produtoras de elastases apresentaram poucos esporos em germinação e nenhuma destruição alveolar, indicando um papel importante das elastases no processo de invasão pulmonar.

Corroborando com essa hipótese, Blanco et al (2002) mostraram que amostras com alta atividade de elastase eram provenientes de amostras isoladas de casos clínicos disseminados com alta invasividade, em contraste com amostras provenientes de lesões localizadas que mostraram pouca ou nenhuma atividade de elastases, e García et al (2006) mostraram que amostras não produtoras de elastases, após sucessivas passagens em camundongos, passaram a apresentar atividade dessa enzima, indicando que *A. fumigatus* na dependência do meio em que se encontra é capaz de induzir a produção da enzima, visando sua sobrevivência.

A produção de mutantes com deleção do gene deste e dos demais fatores de virulência citados, por inserção de cassetes, uso de transposons ou RNA de interferência com posterior reconstituição do mutante, tem sido empregada em modelos animais, mas o avanço no conhecimento significativo da virulência desse fungo só será obtido com o sequenciamento do genoma de *A. fumigatus* e com estudos de expressão gênica durante o processo infeccioso (Rementeria et al, 2005).

1.3. Aspergilose pulmonar

Embora fungos do gênero *Aspergillus* possam causar diversas patologias como: otite, oculomicrose, onicomicoses, nódulos subcutâneos, o acometimento pulmonar, com ou sem

disseminação sistêmica para outros órgãos internos (rins, fígado, ossos, cérebro) é a forma clínica mais frequente e preocupante. Atualmente é aceita a classificação da aspergilose pulmonar em três tipos clínicos (Latgé, 1999; Shibuya et al, 1997 e 2004):

- 1) Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA): observada em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica ou com fibrose cística, que uma vez colonizados pelo fungo, desenvolvem resposta alérgica, caracterizada pela presença de numerosos eosinófilos. As características patológicas da ABPA incluem: distensão e preenchimento do lúmen bronquial por muco e células inflamatórias (sobretudo eosinófilos), bronquiolite crônica ou exsudativa e granulomatose broncocêntrica. Geralmente não há invasão da parede brônquica pelo fungo (Katzenstein et al, 1975; Bosken, et al, 1988; Sulavik, 1988). O tratamento contra ABPA é feito com o uso de corticosteroides, principalmente prednisona, e itraconazol como adjuvante, com resultados bastante favoráveis como: aumento da capacidade pulmonar e diminuições significativas dos níveis de IgE e IgG contra *A. fumigatus* (Wark et al, 2003; Knutsen et al, 2011).
- 2) Aspergiloma ou aspergilose localizada do tipo bola fúngica: observada em pacientes com cavidades pulmonares pré-existentes decorrentes de tuberculose prévia ou doenças císticas. Nesse caso, as hifas do fungo se alinham compactamente em padrão radial dentro da “massa” (bola) que se desenvolve na cavidade, cuja parede torna-se coberta com epitélio metaplásico do trato respiratório. Não ocorre invasão das hifas para além da cavidade quando o paciente é imunocompetente, no entanto, quando ocorre uma queda da imunidade e/ou uma erosão da parede da cavidade, pode haver infiltração das hifas quando então é formado um infiltrado inflamatório (com componentes agudos e crônicos) em associação com fibrose e necrose, além de possível oclusão de vasos sangüíneos. A manifestação clínica mais comum em casos de aspergiloma é a hemoptise em associação com tosse e formação de secreção. Esta pode ser progressiva podendo resultar em uma perda diária de até 150mL de sangue. O principal tratamento contra o aspergiloma continua sendo a retirada da “bola fúngica” por meio de procedimento cirúrgico (Lee et al, 2004).
- 3) Aspergilose pulmonar invasiva (API): Dois padrões patológicos são observados de acordo com as defesas do hospedeiro acometido. Em pacientes com agranulocitose ou com supressão de medula óssea (principalmente pacientes com leucemia mielóide aguda ou transplantados de medula óssea) é observada a formação de nódulos grandes de necrose de coagulação, bem demarcados, de forma arredondada, envolvidos por

área de hemorragia, e constituídos por numerosas hifas alinhadas de forma radial, sem infiltrado inflamatório. O outro padrão corresponde a uma broncopneumonia com consolidação lobular, caracterizada pela presença de intenso exsudato inflamatório agudo, com proliferação fúngica nos alvéolos e necrose de liquefação, observada em pacientes que apresentam pouco comprometimento da resposta imune mediada por neutrófilos, como pacientes em uso de corticoides por terem sido submetidos a transplante renal ou de outros órgãos sólidos, portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), ou submetidos à quimioterapia e antibióticos de largo espectro (Shibuya et al, 1997). Frequentemente a API tem sido definida somente na autópsia devido à dificuldade em diagnosticar a doença durante seu curso, pois esta tem uma rápida progressão, requer a realização de procedimentos invasivos (como biópsia de pulmão) para o exame laboratorial e as opções de antifúngicos efetivos são restritas. Além disso, API é caracterizada como uma doença que possui pouca sintomatologia clínica e a taxa de isolamento do agente etiológico em amostras do trato respiratório é bastante baixa (Denning et al, 1996; Lin et al, 2001).

A literatura ainda aponta uma outra subclassificação denominada aspergilose pulmonar crônica necrotizante (APCN). Caracteriza-se como sendo uma forma subaguda de infecção por *Aspergillus*, bastante incomum. Ocorre tipicamente em indivíduos imunocomprometidos e naqueles que apresentam alguma doença pulmonar de base (Soubani & Chandrasekar, 2002). Esta patologia apresenta uma característica diferente do aspergiloma já que não requer uma cavidade pré-existente para sua manutenção, embora uma massa micelial fúngica possa se desenvolver no pulmão como uma consequência secundária, devido à destruição promovida pelo patógeno (Saraceno et al, 1997). APCN também é diferente da API já que a primeira envolve um processo crônico que progride lentamente por meses e anos e não envolve angioinvasão ou disseminação hematogênica (Binder et al, 1982).

A defesa pulmonar contra *A. fumigatus* é mediada por células fagocitárias do sistema imune inato. Macrófagos alveolares residentes eliminam conídios por fagocitose, enquanto neutrófilos - polimorfonucleares (PMN) recrutados para o sítio da infecção destroem as formas germinativas (hifas) pela produção de espécies reativas do oxigênio (Waldorf, 1989; Tomee & Van der Werf, 2001, Philippe et al, 2003). Se o sistema imune de defesa do pulmão está enfraquecido, o conídio germina e produz hifas que invadem os tecidos pulmonares adjacentes, levando ao desenvolvimento da API.

1.4. Resposta imune pulmonar contra *Aspergillus fumigatus*

Microrganismos ambientais como *A. fumigatus* são constantemente inalados e a primeira linha de defesa recrutada contra eles são as células epiteliais das vias respiratórias superiores e inferiores. Os esporos fúngicos inalados se aderem ao muco produzido por estas células e por batimento ciliar são transportados facilitando sua expectoração. Essas barreiras físicas, auxiliadas por defesas mecânicas, como o ato de tossir ou espirrar, contribuem para a remoção dos esporos (Balloy & Chignard, 2009).

Embora esses mecanismos removam grande parte dos esporos inalados, os esporos remanescentes liberam substâncias como gliotoxina, ácido helvólico e fumagilina que danificam as células epiteliais e diminuem o batimento ciliar, facilitando o tráfego destas estruturas até as vias inferiores (Amitani et al, 1995).

Quando os esporos de *A. fumigatus* chegam aos espaços alveolares, macrófagos residentes realizam a primeira linha de defesa fagocitando-os evitando assim a germinação e transformação em hifas. A ação destas células é bastante eficaz e estudos de Hope e colaboradores (2010) mostraram que, em coelhos imunossuprimidos, 4 horas após a infecção macrófagos alveolares já estavam presentes no lavado broncoalveolar destes animais fagocitando os esporos presentes.

A ação de macrófagos é auxiliada por pneumócitos do tipo I e II presentes nos espaços alveolares, que também desempenham funções importantes contra *A. fumigatus*. Os pneumócitos tipo II, além de secretarem um surfactante pulmonar, cuja principal função é facilitar a expansão da rede alveolar durante a inspiração, também contêm duas proteínas (SP-A e SP-D) que por estudos *in vitro*, confirmados *in vivo*, aumentam a capacidade fagocítica e os efeitos microbicidas de macrófagos alveolares e neutrófilos. (Madan et al, 2001 e 2005),

Outros fagócitos essenciais contra *A. fumigatus* são os neutrófilos. Estas células, presentes em grande quantidade nos capilares alveolares, são prontamente recrutadas durante a infecção, atuando na remoção de esporos, bem como na destruição das hifas por meio da liberação de enzimas do citoplasma para o meio extracelular (Balloy & Chignard, 2009).

A inativação e destruição do patógeno envolvem a participação de vários receptores de reconhecimento padrão (PRR) tais como: pentraxinas 3, receptores solúveis que se ligam na superfície dos conídios, auxiliando no reconhecimento destes por macrófagos alveolares e células dendríticas (Garlanda et al, 2002); componentes do sistema complemento, como C3 e C5, envolvidos na opsonização e atividade microbicida contra o patógeno (Behnsen et al, 2008); lectinas-1, um receptor transmembrana presente em macrófagos, neutrófilos e células

dendríticas que reconhecem β -1,3 glucanas - principal componente de parede celular de *A. fumigatus* (Taylor et al, 2007); além de quimiocinas e citocinas, cujo perfil de secreção pelas células do sistema imune inato depende do “*status*” imune do hospedeiro (Balloy et al, 2005).

1.4.1. Neutrófilos – Polimorfonucleares

Neutrófilos são granulócitos que são produzidos e armazenados na medula óssea, e liberados para o sangue periférico, onde têm uma meia vida na circulação de apenas 6 a 7 horas. Essas células representam cerca de 50 a 70% do total de leucócitos no sangue periférico humano, são esféricas e possuem tamanho de 10 a 20 μ m de diâmetro, com núcleo segmentado constituído de cromatina purpúrea escura e densa e com 3 a 5 lóbulos interligados. Os grânulos intracelulares são classificados em primários (ou azurófilos), secundários (ou específicos), terciários (ou de gelatinase) e vesículas secretórias, cujos componentes estão relacionados à fagocitose e à morte intracelular de microrganismos (Zago et al, 2004).

Estas células são fagócitos profissionais e participam da primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de microrganismos. A resposta inicial do hospedeiro à infecção ou à lesão tecidual inclui a adesão dos leucócitos ao endotélio e a sua migração direcionada através do tecido extracelular. A migração destas células para o sítio inflamatório depende basicamente da montagem de substâncias atraentes, direcionadores da migração celular, e de interações adesivas, mediadoras do reconhecimento célula-célula e célula-matriz extracelular (Stoolman, 1989). Na migração, os neutrófilos fazem seu processo de rolamento endotelial por mediação das moléculas da família das selectinas, as quais possuem baixa afinidade e em seguida ocorre o processo de adesão, o qual é mediado por moléculas de alta afinidade, as integrinas (CD11 e CD18). Após a adesão ocorre um processo chamado de diapedese que é mediado por moléculas de adesão endotélio-plaquetário do tipo-1 (Zago et al, 2004). Uma vez no local da inflamação, estas células atuam na defesa do organismo por meio de mecanismos dependentes de oxigênio, que compreendem a fagocitose, degranulação, produção de mediadores anti e pró-inflamatórios, além de poderem atuar como apresentadoras de antígenos para linfócitos T.

O processo de fagocitose inclui a ingestão de material patogênico por estas células e digestão do mesmo por ação de oxidantes e enzimas líticas, da produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL-6 e IL-8, ativador de plasminogênio, TNF- α), que contribuem para o

recrutamento de novas células para o foco inflamatório. Além disso, os neutrófilos auxiliam na remoção de células mortas, de corpos celulares, e na remoção de tecidos. Os neutrófilos secretam enzimas, tais como a elastase, a mieloperoxidase e a lactoferrina, que promovem lesão endotelial. A detecção dessas enzimas indica significativa ativação dos neutrófilos, que resulta em degranulação (Weiss, 1989).

A fagocitose é acompanhada de um conjunto de alterações metabólicas nas células fagocíticas, denominado “burst”, ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa. O metabolismo oxidativo dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático associado à membrana dos grânulos específicos, chamado NADPH-oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida-oxidase). A ativação da NADPH-oxidase causa produção massiva de superóxido e peróxido de hidrogênio, que atuam com potentes agentes fungicidas (Babior, 2000).

1.5. Diagnóstico laboratorial da aspergilose pulmonar invasiva (API)

Embora a história e os sintomas clínicos aliados aos achados radiológicos sejam essenciais para o diagnóstico, a aspergilose pulmonar invasiva deve ser estabelecida mediante a combinação dos dados histológicos (visualização de hifas compatíveis com as de *Aspergillus*) e microbiológicos (visualização de hifas em exame direto e isolamento de *Aspergillus* em meio de cultivo), pois isoladamente nenhum deles pode assegurar o diagnóstico. É importante recordar que com frequência as amostras para exame laboratorial são obtidas mediante técnicas agressivas para o paciente (fibrobroncoscopias, biopsias, punções, etc.) que restringem a sua repetição e, portanto, os exames devem ser realizados com rapidez e atenção por micologista e/ou patologista experiente, dado que a informação que dele emana pode ser de vital importância para o paciente (Lacaz et al, 2002; Sidrim & Rocha, 2004).

As colorações histológicas mais utilizadas são: Hematoxilina-Eosina (HE) e Gomori-Metenamina-Prata (GMS). A visualização em histologia deve ser confirmada pelo isolamento em cultivo, pois as hifas de *Aspergillus* são indistinguíveis das de outros fungos oportunistas como *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp e *Penicillium* spp que também apresentam bifurcação dicotômica em ângulo de 45°. *A. fumigatus* cresce bem em todos os meios de cultivo, mas outras espécies são sensíveis à cicloheximida presente no meio Mycosel®. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C, já sendo produzidas colônias miceliares visíveis após 48 horas de incubação (Kwon-Chung & Bennett, 1992, Latgé, 1999; Lacaz et al, 2002).

O isolamento de *Aspergillus* de uma amostra respiratória de um paciente imunodeprimido tem um elevado valor preditivo positivo, mesmo que sempre se deva considerar a possibilidade de contaminação ou reflexo de uma mera colonização do tecido afetado. Em qualquer caso, é um achado que deve ser informado com rapidez para o médico responsável. Horvath & Dummer (1996) comprovaram o valor preditivo positivo do cultivo de *Aspergillus* que oscilou entre 82% nos transplantados de medula óssea e em 14% nos pacientes soropositivos para HIV. O isolamento de numerosas colônias de *Aspergillus* de forma seriada e repetida apoia a relevância clínica de um resultado microbiológico.

As provas imunológicas de detecção de anticorpos constituem um método diagnóstico de grande utilidade quando da suspeita clínica de aspergilomas, já que aproximadamente 90% desses pacientes possuem anticorpos detectáveis. A técnica mais utilizada é a de imunodifusão ou a imunofluorescência indireta. Contudo, estas técnicas não são úteis para o diagnóstico de API, visto que a debilidade imunológica desses pacientes afeta esse parâmetro (Latgé, 1999).

Métodos de detecção de antígenos, como galactomanana, ou de metabólitos fúngicos como D-manitol, tanto em soro, urina e outros líquidos corporais, estão sendo desenvolvidos por meio de ELISA, “immunoblotting” e radioimunoensaio. Embora esses métodos tenham uma grande especificidade, a sensibilidade não é muito alta, devido ao rápido “clearance” dos antígenos do soro (Sidrim & Rocha, 2004).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular pode dar lugar a métodos muito sensíveis e rápidos que favorecem o prognóstico de quadros de aspergilose grave. A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a região do DNA ribossômico parece ser promissora por ser bastante específica e sensível para *A. fumigatus*. No entanto, um ensaio de PCR “gold standard” para *Aspergillus* ainda não foi definido em virtude da diferença significativa entre os distintos métodos de extração de DNA utilizados, as diferentes seqüências de oligonucleotídeos empregadas, e da falta de padronização das condições da reação de PCR (Clemons & Stevens, 2008).

1.6. Tratamento da aspergilose pulmonar invasiva (API)

Entre a disponibilidade de azóis oferecida no mercado recomenda-se para a maioria dos pacientes o uso de voriconazol, por via intravenosa ou por via oral, pela melhor atividade antifúngica dessa droga sobre esse microrganismo, ou o itraconazol como segunda opção. A

anfotericina B deoxicolato também tem um bom espectro de ação, apresentando eficácias semelhantes ao voriconazol, porém apresenta alta toxicidade (Walsh et al, 2008).

Em pacientes com API refratários ou intolerantes ao voriconazol pode-se utilizar como terapia alternativa a anfotericina B lipossomal, que apresenta uma menor nefrotoxicidade quando comparada à anfotericina B deoxicolato.

A caspofungina também aparece como uma importante opção contra a API. Maertens e colaboradores (2004) mostraram que a monoterapia com esta equinocandina resultou em um prognóstico favorável para 45% dos pacientes diagnosticados com API, sendo que 86% destes estavam refratários ao tratamento com anfotericina B (deoxicolato e lipossomal) ou triazóis.

1.7. Modelos animais para o estudo da aspergilose pulmonar invasiva (API)

Vários fatores devem ser considerados antes de se instituir um modelo particular de infecção. Primeiramente, a escolha do modelo animal deve mimetizar os aspectos clínicos da doença da melhor maneira possível e o modelo precisa ser altamente reprodutível, o que requer padronização de todas as metodologias necessárias para se criar um modelo experimental (Clemons et al, 2005; Patterson, 2005).

Para estudo da infecção por *Aspergillus* têm sido utilizados como modelos experimentais camundongos, coelhos e ratos.

Para induzir infecção por *Aspergillus* é necessário promover imunossupressão do modelo animal, a fim de garantir o estabelecimento de uma infecção invasiva e persistente, uma vez que a maioria dos animais de experimentação é resistente à infecção natural por esse agente. Condições que predispõem os animais à infecção por *Aspergillus* são: animais submetidos à diabetes induzida (Ford & Friedman, 1967), animais submetidos à dieta alimentar deficiente (Niki et al, 1991), animais tratados com terapia imunossupressora com corticosteroides, ciclosporina A, ou ciclofosfamida (Berenguer et al, 1995, Nawada et al, 1996; Balloy et al, 2005; Sheppard et al, 2006), ou animais “knock-out” para diferentes genes (Schmidt, 2002; Clemons et al 2010).

Observa-se na literatura um modelo de depleção de neutrófilos em camundongos, induzido pelo tratamento com anticorpo contra antígenos de superfície de neutrófilos, primariamente utilizado para patologias causadas por bactérias como *Listeria* e *Legionella* e protozoários como *Toxoplasma* e *Leishmania* (Rogers & Unanue, 1993; Sayles & Johnson, 1996), que vem sendo introduzido para estudo da aspergilose pulmonar invasiva (Mehrad et al, 1999; Carpenter & Hogaboam, 2005; Stephens-Romero et al, 2005, Daley et al, 2008).

Trata-se de um anticorpo monoclonal da classe IgG2, derivado do hibridoma RB6-8C5, dirigido contra o antígeno Gr-1 de humanos e Ly-6G em camundongos, presente na superfície de granulócitos.

Os camundongos são os animais de escolha para os estudos experimentais devido a maior disponibilidade de cepas geneticamente definidas e de reagentes imunológicos, além do baixo custo e da facilidade de manipular tais animais (Clemons et al, 2005; Patterson, 2005). Há que se considerar também que com esse modelo pode-se utilizar uma quantidade maior de animais o que gera uma melhor reprodutibilidade de resultados.

A via de infecção frequentemente escolhida é o trato respiratório (intranasal ou intratraqueal) porque reflete a via natural de infecção por *Aspergillus* em humanos (Shibuya et al, 1999; Balloy et al, 2005; Stephens-Romero et al, 2005).

Os modelos experimentais têm sido utilizados para avaliar a eficácia de drogas antifúngicas (Polak, 1998; Clemons & Stevens, 2006; Clemons et al, 2006; Lewis et al, 2007; Vallon-Eberhard et al, 2008), para comparar a virulência de diferentes isolados de *Aspergillus* (Mondon et al, 1995 e 1996; Aufauvre-Brown et al, 1998; Sarfati et al, 2002), para definir genes envolvidos na virulência (Rementeria et al, 2005; Shibuya et al, 2006), para estabelecer procedimentos diagnósticos mais efetivos quer sejam sorológicos, moleculares ou histopatológicos (Clemons & Stevens, 2008), e para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos durante a infecção (Shibuya et al, 1999; Shibuya et al, 2004; Clemons et al, 2005).

Como o número de pacientes com API está aumentando rapidamente, existe uma necessidade em elucidar os mecanismos patológicos relacionados a essa micose, a fim de estabelecer métodos diagnósticos e desenvolver terapias mais seguras e eficazes.

Estudos têm mostrado que em modelos experimentais a resposta pulmonar contra *A. fumigatus* difere de acordo com o regime imunossupressivo utilizado, que permite ou não a germinação dos conídios, que induz uma resposta inflamatória mais ou menos agressiva ao tecido e que determina a produção de citocinas pró ou antiinflamatórias. No entanto, também deve ser avaliado nesses modelos o papel da virulência das amostras do fungo.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar a evolução da aspergilose pulmonar invasiva desenvolvida em camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G, infectados com duas diferentes amostras de *Aspergillus fumigatus* que apresentam distintos padrões de produção de elastase.

2.2. Objetivos específicos

1) Caracterizar as amostras de *A. fumigatus*, isoladas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, quanto ao seu potencial de produção de elastase (fator de virulência).

2) Produzir e purificar o anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G, a partir do hibridoma RB6-8C5, visando estabelecer modelo experimental para o estudo da aspergilose pulmonar invasiva em camundongos C57BL/6.

3) Determinar a virulência de amostras de *A. fumigatus* que apresentaram distintos padrões de produção de elastase, por curva de sobrevivência dos animais neutropênicos e imunocompetentes infectados.

4) Analisar o processo de interação entre células fúngicas (conídios e hifas) e células inflamatórias do lavado broncoalveolar de animais neutropênicos e imunocompetentes infectados com *A. fumigatus*, por microscopia eletrônica de transmissão.

5) Determinar a concentração de hemoglobina no lavado broncoalveolar coletado dos animais neutropênicos e imunocompetentes infectados com as distintas amostras de *A. fumigatus*, como índice de lesão alvéolo-capilar durante a cinética da infecção.

6) Caracterizar as células presentes no lavado broncoalveolar e no sangue periférico dos animais neutropênicos e imunocompetentes durante a cinética da infecção experimental determinada pelas distintas amostras de *A. fumigatus*.

7) Analisar a reação tecidual observada em secções pulmonares obtidas de animais neutropênicos e imunocompetentes durante a cinética da infecção experimental determinada pelas distintas amostras de *A. fumigatus*, pelas colorações de Hematoxilina-Eosina, Gomori-Metenamina-Prata e Weigert.

8) Quantificar a carga fúngica no tecido pulmonar de animais neutropênicos e imunocompetentes durante a cinética da infecção experimental determinada pelas distintas amostras de *A. fumigatus*, por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio de cultura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de *Aspergillus fumigatus*

De uma coleção de fungos mantidos por repiques periódicos em Ágar-Sabouraud-Dextrose com cloranfenicol (ASDC) (Apêndice), pertencentes à micoteca do laboratório de Micologia Médica do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicas da FMRP-USP, foram selecionadas amostras de *Aspergillus fumigatus* isoladas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto que apresentaram quadros clínicos compatíveis com aspergilose, confirmado por resultado histopatológico e resposta terapêutica (Tabela 1). Após purificação dessas amostras em placas com Ágar-Czapek (AC) por 7 dias de incubação, à temperatura ambiente, para obtenção de colônias isoladas (Figura 1), os conídios foram coletados e suspensos em frascos de penicilina estéreis, contendo água destilada estéril, na concentração de 5×10^4 conídios por mL, para manutenção e estocagem das amostras.

Tabela 1. Origem dos isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* utilizados neste estudo

Amostra	Data do Isolamento	Material biológico	Clínica
603	04/2009	Biópsia de gânglio	UETDI
699	04/2009	Biópsia de pele (Tx renal)	Dermatologia
844	05/2009	Líquido pleural	UETDI
1751	06/2009	Sangue	TMO
1753	06/2009	Sangue	TMO
1761	06/2009	Sangue	TMO
100	07/2009	Líquido pleural	Pneumologia
2035	08/2009	Sangue	TMO
2071	08/2009	Sangue	Pediatria

UETDI = Unidade Especial para Tratamento de Doenças infecciosas - AIDS.

TMO = Transplante de Medula Óssea

Figura 1. Cultura pura e isolada da amostra 699 de *Aspergillus fumigatus* cultivada em Ágar-Czapek por 7 dias, à temperatura ambiente. Colônia algodonosa, coberta por grânulos que dão a tonalidade ao fungo (tons de verde oliva).

3.2. Determinação quantitativa da atividade de elastase de amostras de *Aspergillus fumigatus*

Uma alíquota de 30µL da suspensão estoque (1500 conídios) de cada amostra de *A. fumigatus* foi transferida para frascos de penicilina contendo 1mL de meio mínimo com Elastina a 1% (Apêndice). Esses frascos foram incubados a 37°C, por 9, 15 e 21 dias. Um controle negativo foi preparado com 30µL de água destilada.

Após cada período, 200µL do sobrenadante foram recolhidos e centrifugados a 8000rpm, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Uma alíquota de 30µL desse sobrenadante (amostras e controle) foi inoculada, em triplicata, em microtubos contendo 300µL de solução contendo Elastina Congo-Red a 0,5% (Apêndice), submetidos à incubação em banho a 37°C, por 24 horas.

Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 8000rpm, à temperatura ambiente, por 5 minutos, e 200µL dos sobrenadantes de cada amostra e do controle negativo, em triplicata, foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. A absorbância foi lida em leitor de Elisa (Power Wave X Bio-Tek Instruments) em comprimento de onda de 495nm e a média dos valores observados para cada amostra, por tempo de incubação, foi definida como atividade média da enzima. As amostras do fungo foram classificadas, de forma arbitrária, em fortes produtoras de elastases quando apresentaram valores de absorbância acima de 0,1 e fracas produtoras de elastases quando os valores observados foram inferiores a 0,1.

3.3. Confirmação da identificação da espécie das amostras de *Aspergillus* escolhidas para este estudo, por biologia molecular

As amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*, escolhidas pela produção de elastase, e uma amostra representante de *A. flavus* e de *Penicillium* sp (controles negativos) foram cultivadas em ASDC e mantidas a 37°C, por 3 dias. Posteriormente, foram adicionados 3mL de ASDC líquido aos tubos para remoção da massa miceliar. O conjunto foi transferido para um erlenmeyer de 250mL contendo o mesmo meio de cultura e incubado por 3 dias, à temperatura ambiente, sob agitação de 120rpm. Após esse período a solução foi filtrada a vácuo, a massa miceliar foi seca, pesada e mantida à temperatura de -20°C até a etapa de extração do DNA.

Cada amostra foi transferida para um gral de porcelana, submetida à trituração e lise completa das células com nitrogênio líquido e transferida para tubos de polipropileno de 50mL contendo tampão de extração de DNA (Apêndice).

Em seguida efetuou-se choque térmico colocando as amostras em banho com água a 42°C, por 15 minutos, e em gelo comum, por 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 5000rpm, por 10 minutos, a 4°C.

O sobrenadante foi coletado e adicionada a mistura Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico, na proporção 25:24:1. Em seguida, cada amostra foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 9800rpm, por 10 minutos, a 4°C. Esse procedimento foi realizado mais uma vez e em seguida cada amostra foi submetida a uma terceira extração com clorofórmio (V/V) e centrifugada sob as mesmas condições.

O sobrenadante foi coletado e a ele adicionado cloreto de sódio na razão 1/20 do volume total e isopropanol em igual volume (V/V). O conjunto foi homogeneizado por inversão e o DNA foi precipitado em gelo seco, por 20 minutos. Em seguida cada amostra foi centrifugada a 9800rpm, por 20 minutos, a 4°C. O precipitado foi submetido a duas lavagens com etanol 70% e centrifugado a 9800rpm, por 3 minutos, a 4°C.

O precipitado foi ressuspendido em 1mL de tampão de extração de DNA e adicionado 1μL de RNase estocada na concentração de 10mg/mL. A solução foi incubada em banho com água a 42°C, por 1 hora. Novamente foi adicionado cloreto de sódio na razão 1/20 do volume total, isopropanol em igual volume (V/V), e após homogeneização por inversão o DNA foi novamente precipitado em gelo seco, por 20 minutos.

O conjunto foi novamente centrifugado a 9800rpm, por 10 minutos, a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido com 500µL de água milli-Q esterilizada, e estocado a 4°C até o uso para a reação de polimerização em cadeia (PCR).

Para a reação de PCR foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos (Sugita et al, 2004): ASPU = 5'-ACTACCGATTGAATGGCTCG-3' e Af3r = 5'-CATACTTTCAGAACAGCGTTCA-3' que geram um produto de aproximadamente 300pb. A reação de PCR foi realizada segundo as seguintes condições: 2µL de DNA da amostra contendo aproximadamente 70ng de DNA, 0,3µL de cada oligonucleotídeos na concentração de 30pmol, 4µL de MgCl₂ a 2mM, 0,4 µL de 2U de *Taq* DNA Polimerase Tli (Promega) com alto poder de correção na inserção das bases nitrogenadas, 5µL do tampão da enzima (NH₄)₂SO₄ 1X e 200µM de cada dNTP, completado com 36 µL de água milli-Q estéril para um volume final de reação de 50µL,

O termociclador (PTC-200 da Bio Rad) foi ajustado para as seguintes condições (Sugita et al, 2004): desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR gerados foram observados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com TAE 1X, a 80 Volts, por 2 horas, utilizando cerca de 5µL do DNA amplificado e do padrão de peso molecular, em paralelo. Ao final da corrida o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), observado em transluminador de ultravioleta (Alpha-Innotech) e fotografado pelo sistema de captação de imagens (Alpha-Imager Mini).

3.4. Obtenção e purificação do anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G

Células do hibridoma RB6-8C5 (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Dario Zamboni) foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para um tubo contendo 10mL de PBS, o qual foi centrifugado a 1000rpm, por 5 minutos, a 4°C. As células foram ressuspendidas em 5mL de meio RPMI completo, acrescido de 20% de soro bovino fetal (Apêndice), e transferidas para uma garrafa de cultivo (25cm²). A garrafa foi mantida em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, até atingir 80-90% de confluência, quando então as células foram retiradas com auxílio de um removedor de células e expandidas para novas garrafas (150cm²) contendo previamente meio RPMI, acrescido de 10% de soro bovino fetal.

Estas garrafas também foram mantidas sob as mesmas condições e a coleta do sobrenadante, contendo os anticorpos monoclonais GR-1/Ly-6G, foi feita seguindo os mesmos critérios de confluência celular. Os sobrenadantes de cada garrafa de cultivo foram coletados em tubos estéreis de polipropileno de 50mL e congelados a -20°C até a etapa de purificação.

Para a etapa de purificação dos anticorpos os sobrenadantes foram precipitados 3 vezes em solução saturada de sulfato de amônio (Apêndice) e transferido para um AMICON® de 50 mL, utilizando uma membrana XM-50. O concentrado adicionado de solução de PBS/Azida foi dialisado até constatar que todo o sulfato de amônio foi retirado da amostra (teste de turbidez com cloreto de bário a 1%). Em seguida o concentrado foi centrifugado a 10000rpm, a 4°C, por 10 minutos. A amostra concentrada foi aplicada na coluna de Proteína G Sepharose Fast Flow®. A seguir, foi adicionada uma quantidade de PBS/Azida e coletada uma alíquota do eluato para leitura, em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Pro – GE) da densidade óptica (DO) em 280nm. Quando a DO foi de 0,05 ou menos não foi mais adicionado PBS/Azida, no entanto, quando a DO foi acima desse valor, continuou-se lavando a coluna com PBS/Azida até o eluato atingir a DO de 0,05.

Os anticorpos foram liberados da proteína G pela aplicação do tampão glicina 0,1M - pH = 2,5 e recolhidas alíquotas de 2,0mL em tubos de polipropileno de 15mL, já contendo cerca de 100 a 150µL de tampão Tris 1M - pH = 9, necessário para neutralizar o pH ácido do tampão glicina. Foram feitas leituras de DO em 280 nm das várias alíquotas coletadas e aquelas que apresentaram DO positiva foram agrupadas em um único tubo. Desse “pool” das alíquotas foi feita nova leitura da DO e o mesmo foi re-submetido à concentração na coluna de AMICON.

A membrana do AMICON® foi lavada com 50mL de PBS sem azida, para retirar a glicina. Os anticorpos foram novamente concentrados, liberados da membrana com PBS, recolhidos com pipeta automática e centrifugados a 10.000rpm, por 10 minutos.

O sobrenadante foi coletado e seguir uma alíquota foi utilizada para a leitura da densidade óptica (DO), a 280nm. Esse valor representou a quantidade de IgG presente na amostra, estimada segundo Howard e Bethell (2001), pela seguinte fórmula: $[IgG/mL] = Abs_{280} \times 0,72$. A amostra foi estocada a 4°C.

3.4.1. Avaliação da purificação do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G

Para confirmação da purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade foi realizada eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida a 10%. O procedimento foi realizado com 3 alíquotas de anticorpos produzidos em momentos distintos.

Resumidamente, o gel de separação (Apêndice) foi aplicado no suporte apropriado da cuba de eletroforese vertical, com o auxílio de uma pipeta. Para evitar formação de bolhas no gel foi utilizado butanol 50%. Após a polimerização o álcool foi retirado, o gel de empilhamento (Apêndice) foi aplicado e, quando este se polimerizou foram aplicadas as amostras, previamente diluídas na proporção (1/1) em tampão de amostra (Apêndice) e desnaturadas a 100°C por 5 minutos.

A migração das amostras foi ajustada para uma corrente elétrica de 15mA e voltagem de 100V, por 15 minutos. Em seguida a corrente elétrica foi modificada para 33mA e a voltagem foi mantida até o final da corrida. Em seguida, o gel foi corado com solução de Coomassie brilhante a 0,2% e as bandas foram visualizadas e fotografadas pelo software Kodak Digital Science 1D.

3.4.2. Avaliação da especificidade do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G

Camundongos machos C57BL/6 (n=3), de 6 semanas de idade, foram inoculados com 250µL de tioglicolato de sódio, pela via intraperitoneal. Essa substância age como agente pró-inflamatório e recruta células leucocitárias para o local de inoculação. Cerca de 4 horas após, os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico xilazina/quetamina (Apêndice). Com o auxílio de tesoura e pinça foi realizada uma incisão na cavidade peritoneal do animal e foi recolhido o líquido inflamatório produzido por meio de uma pipeta Pasteur, o qual foi transferido para um tubo de polipropileno de 50mL.

As células leucocitárias foram contadas em câmara de Neubauer e preparada uma suspensão com 5×10^4 células. Pela técnica de citocentrifugação essas células foram transferidas para lâminas de microscopia. Em uma das lâminas foi realizada coloração pelo método Panótico® (Apêndice) para averiguar se de fato as células se aderiram à lâmina e as demais lâminas foram utilizadas para avaliar a especificidade do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G produzido a partir do hibridoma RB6-8C5, por reação de imunofluorescência indireta.

Estas lâminas foram lavadas cuidadosamente com solução de PBS, por 3 vezes, durante 3 minutos. A seguir foram incubadas com a diluição 1:50 da solução de PBS-BSA (Apêndice) e soro de cabra (98µL de PBS-BSA a 0,5% e 2µL de soro de cabra), a 4°C, em câmara úmida, por 30 minutos. Essa etapa visou bloquear possíveis ligações inespecíficas, minimizando assim o surgimento de “backgrounds” no momento da visualização das lâminas.

Decorrido esse tempo, as células contidas nas lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G produzido) em diferentes diluições (1:50, 1:100, 1:200), a 4°C, em câmara úmida, overnight. Na lâmina controle foi adicionado o mesmo volume de PBS no lugar do anticorpo primário. Em seguida as lâminas foram lavadas com solução de PBS, por 3 vezes, durante 3 minutos.

O anticorpo secundário (anticorpo de cabra anti-camundongo, conjugado com Alexa-fluor 594[®]), diluído em PBS a 1:400, foi então adicionado às lâminas, as quais foram incubadas, a 4°C, em câmara úmida, por 1 hora. Em seguida as lâminas foram lavadas com solução de PBS, por 3 vezes, durante 3 minutos.

As células também foram incubadas com 1mM de DAPI (marcador nuclear), diluído a 1:3000 em PBS, a 4°C, em câmara úmida, por 3 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com solução de PBS, por 3 vezes, durante 3 minutos..

As lâminas foram montadas com fluormount e cobertas com lamínula circular de 10-12mm de diâmetro, observadas em microscópio de fluorescência (Leica DMI 4000B) e fotografadas pelo sistema digital acoplado ao microscópio (Leica LAS/AF Lite Software).

3.5. Preparo do inóculo para infecção experimental

Amostras de *A. fumigatus* que demonstraram ter forte e fraca atividade de elastase, respectivamente, amostras 1753 e 699, foram repicadas em tubo com ASDC e após incubação por 7 dias, à temperatura ambiente, cerca de 10mL de PBS acrescido de Tween 20 a 0,1% (Apêndice) foram utilizados para coleta e lavagem dos conídios. Essa suspensão foi filtrada em duas camadas de gaze e o filtrado foi recolhido em um tubo de polipropileno de 50mL estéril. Repetiu-se esse procedimento mais uma vez e posteriormente os conídios foram contados em câmara de Neubauer, visando preparar inóculo com 5×10^7 conídios em 50µL de salina.

3.6. Animais de experimentação

Camundongos machos C57BL/6 (n= 156), de 6 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, foram alocados em caixas de polipropileno, receberam alimentação com ração granulada e hidratação *ad libitum*.

Os animais foram utilizados para o estabelecimento do modelo de depleção de neutrófilos por tratamento com anticorpos monoclonais GR-1/Ly-6G, para estudos de virulência das amostras de *A. fumigatus* por determinação de curvas de sobrevivência e para os estudos de evolução da infecção pulmonar experimental.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP, registrado como protocolo nº 061/2009 (Anexo).

3.6.1. Depleção de neutrófilos com anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G – estabelecimento do modelo experimental de neutropenia

Grupos de 5 animais foram tratados por via intraperitoneal com 50µg de anticorpo monoclonal GR-1/Ly-6G diluídos em 150µL de PBS e o mesmo procedimento foi realizado em animais controle que receberam ao invés do anticorpo, o mesmo volume de salina.

Sangue dos animais foi coletado por via retro-ocular logo após a inoculação do anticorpo monoclonal (tempo 0), para o estabelecimento da linha de base, e após 48 horas, para o acompanhamento da depleção de neutrófilos, pela contagem total e diferencial de células sanguíneas. A contagem total de leucócitos foi feita em câmara de Neubauer e a contagem diferencial feita em esfregaços sanguíneos corados pelo método Panótico® (Apêndice).

Uma vez estabelecido o modelo de neutropenia, ou seja, tratamento inicial com 50µg de anticorpo e dose de reforço de 25µg a cada 48 horas, para manutenção da neutropenia, se necessário, tal esquema foi utilizado tanto para os experimentos de curva de sobrevivência (verificação da virulência da amostra) quanto para os experimentos de evolução da infecção experimental (análise do lavado bronco-alveolar e do tecido pulmonar).

3.6.2. Determinação da virulência das amostras de *Aspergillus fumigatus* por curva de sobrevivência

Grupos de 8 animais, por amostra fúngica e por condição imune (neutropênicos, ou seja, depletados de neutrófilos pelo tratamento com o anticorpo monoclonal GR-1/Ly-6G, e

imunocompetentes, ou seja, não depletados de neutrófilos), foram anestesiados por via intraperitoneal com xilazina/quetamina (Apêndice) e infectados por via intratraqueal no tempo 0, ou seja, 24 horas após o tratamento com anticorpos. Para isso os animais anestesiados foram imobilizados em uma prancha em decúbito dorsal, com a cabeça hiper-estendida. Com auxílio de pinça e tesoura foi feita uma incisão cervical mediana de 1 a 1,5 cm, com divulsão das estruturas e exposição da traqueia, na qual foram injetados diretamente 50µL do inóculo contendo 5×10^7 conídios. A seguir foi feita a sutura da incisão com fio de algodão (Figura 2).

Os animais foram observados diariamente e a curva de sobrevivência foi construída utilizando o software GraphPad Prism (versão 3.0). Dois experimentos independentes, com as mesmas características, foram realizados para constatar a reprodutibilidade dos resultados.

Figura 2. Inoculação intratraqueal de *A. fumigatus* em camundongos machos C57BL/6.

3.6.3. Evolução da aspergilose pulmonar invasiva (API) experimental

Grupos de 9 animais, por amostra fúngica, previamente tratados ou não com o anticorpo monoclonal GR-1/Ly-6G no tempo -24h, após serem anestesiados por via intraperitoneal com xilazina/quetamina (Apêndice) foram infectados no tempo 0, por via intratraqueal, com 50µL de inóculo contendo 5×10^7 conídios. Os camundongos foram tratados, diariamente, por via oral com gentamicina (100mg em 300mL de água destilada, no bebedouro) e por via subcutânea com ceftriaxona (50mg/mL), para evitar o estabelecimento de infecção bacteriana secundária. Nos tempos 24, 48 e 72 horas pós-infecção, três animais por tempo de observação foram sacrificados e com o auxílio de um cateter inserido na traqueia dos camundongos os pulmões foram lavados 4 vezes com 800µL de PBS (Figura 3).

Dessa forma, de cada animal foram coletados o lavado broncoalveolar (LBA) e a seguir os pulmões, que foram retirados após abertura da caixa torácica.

Figura 3. Coleta do LBA em camundongos machos C57BL/6.

Com o lavado broncoalveolar (LBA) foram realizados: a) observação do índice de lesão alvéolo-capilar ocasionado, determinado pela concentração de hemoglobina presente; b) análise do tipo celular recrutado para o local da infecção, por contagem total e diferencial de leucócitos; c) análise da interação fungo/célula do hospedeiro, por microscopia eletrônica de transmissão.

Com os pulmões foram realizados: a) quantificação de fungos por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio Ágar-Sabouraud-Dextrose com cloranfenicol e gentamicina; b) estudo histopatológico em cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina (HE), Gomori-Metenamina-Prata (GMS) e Weigert (W).

3.6.3.1. Determinação da concentração de hemoglobina (Hb) no LBA

Do LBA coletado de cada animal 200µL foram diluídos em 800µL de água destilada. A solução foi sonicada a 4°C, por 90 segundos. A seguir centrifugada a 10000rpm, por 10 minutos, a 4°C, e a absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 pro – GE) em comprimento de onda de 414nm. A concentração de Hb foi calculada segundo Rutherford e colaboradores (1979), assumindo que uma absorbância igual a 1,0 corresponde a 0,13mg de Hb/mL. Dois experimentos independentes, com as mesmas características, foram realizados para constatar a reprodutibilidade dos resultados.

3.6.3.2. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA

Do LBA colhido de cada animal, 10µL foram diluídos em 90µL de solução de Turk (Apêndice) e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Um volume de 50µL do LBA foi centrifugado a 1000rpm, por 5 minutos, e o material fixado na lâmina foi corado pelo método Panótico[®] para a contagem diferencial dos leucócitos, especificamente, neutrófilos e macrófagos. Dois experimentos independentes, com as mesmas características, foram realizados para constatar a reprodutibilidade dos resultados.

3.6.3.3. Interação fungo/célula do hospedeiro por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Parte do LBA coletado de cada animal foi centrifugada a 2100rpm, por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente as células foram ressuspensas em solução fixadora contendo paraformaldeído a 8% e glutaraldeído a 25% em PBS (Apêndice) e incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% (em tampão cacodilato de sódio 0,2M) e incubadas à temperatura ambiente, por 1 hora, sob abrigo da luz. Após a etapa de fixação as células foram ressuspensas em acetato de uranila a 0,5% e incubadas a 4°C, sob abrigo da luz e sob agitação por 2 horas.

As células então foram desidratadas em concentrações crescentes de alcoóis: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% por 10 minutos cada passo, e depois em álcool absoluto, 3 vezes, por 10 minutos. As células também foram incubadas com óxido de propileno, por 3 minutos, por 2 vezes, para assegurar a total remoção de água presente na amostra. A seguir foi realizada a infiltração das amostras em resina Embed 812[®]/óxido de propileno (3V:V), por 2 horas, sob agitação contínua. Por fim, as amostras foram transferidas para resina pura (Embed 812[®]) e polimerizadas a 60°C, por 48 horas.

Para cada amostra, foram realizadas secções de 0,5µm, coradas com azul de toluidina para localizar e delimitar a área de interesse. Finalmente as amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão (Philips EM 208) do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP.

3.6.3.4. Análise histopatológica do pulmão infectado

Dos animais infectados e sacrificados nos diferentes tempos de observação (24, 48 e 72 horas) os pulmões esquerdos foram fixados em paraformaldeído, embebidos em parafina, seguidos por cortes de 6µm de espessura que foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE), Metenamina-Prata (GMS) e Weigert (W) (Apêndice) para avaliar, respectivamente, a extensão do processo inflamatório presente nos diferentes grupos, as estruturas fúngicas presentes e a possível ruptura das fibras elásticas presentes em estruturas brônquicas e vasculares. Dois experimentos independentes, com as mesmas características, foram realizados para constatar a reprodutibilidade dos resultados.

A extensão do processo inflamatório foi realizada qualitativamente de acordo com os critérios descritos por Stergiopoulou e colaboradores (2007), ou seja: a) angioinvasão - presença de hifas permeando a parede ou no interior do lúmen de artérias ou veias; b) infarto hemorrágico - presença de hemácias no tecido pulmonar; c) necrose inflamatória - presença de infiltrado neutrofílico e monocítico associado à necrose do parênquima pulmonar. Adicionalmente aos critérios descritos, observamos também a presença ou não de ruptura da parede brônquica permeada por hifas ou conídios (esporos), presentes no interior do lúmen de brônquios e/ou bronquíolos.

A análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico (Bioval) nos aumentos de 100X, 200X e 400X, seguida de documentação fotográfica efetuada no fotomicroscópio óptico (Olympus BX 51) do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (SERPAT- HCRP).

3.6.3.5. Quantificação de fungos do tecido pulmonar

Dos animais infectados e sacrificados nos diferentes tempos de observação (24, 48 e 72 horas) os pulmões direitos foram retirados, pesados em tubos contendo 1,0mL de salina a 0,9% esterilizada (Apêndice), e homogeneizados com auxílio de um triturador mecânico (Ultra Turrax IKA T18 basic). Cerca de 100µL do material total e de diluições seriadas do homogeneizado de tecido (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) foram semeados, em duplicatas, em placas com ASDC acrescido de gentamicina, para determinação da carga fúngica viável presente no tecido. As placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 48 horas, e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. Os resultados obtidos foram expressos como a média do LogUFC de 3 animais por tempo de infecção estudado, segundo a

fórmula: $\text{Log}_{10} = [\text{Média UFC} \times (\text{diluição} \times 0,4) \times (\text{M} + \text{peso do órgão})]$, em que M é o volume da solução utilizada para triturar o órgão. Dois experimentos independentes, com as mesmas características, foram realizados para constatar a reprodutibilidade dos resultados.

3.7. Análise Estatística

Para comparação dos valores obtidos em relação à evolução temporal ou estado imune, que não se apresentaram normalmente distribuídos, foi utilizado ANOVA dupla entrada com teste de Bonferroni, e para comparação dos valores de leucócitos com controle basal inicial foi utilizado ANOVA pós-teste de Dunnett. A significância foi definida com $p < 0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Determinação quantitativa da atividade de elastase de amostras de *Aspergillus fumigatus*

Os valores de atividade de elastase observados não foram muito altos, indicando que, mesmo com um substrato específico, a metodologia utilizada não apresentou alta sensibilidade, ou que, possivelmente, esta enzima não seja fundamental para o metabolismo do fungo. Conforme mostra a Tabela 2 a atividade elastolítica das amostras de *A. fumigatus* estudadas mostrou ser mais intensa após 9 dias entre o contato do fungo com o meio indutor e decresceu consideravelmente com o aumento do período de incubação, indicando que o pico de produção da enzima ocorre precocemente. Dessa forma, foi escolhida a incubação de 9 dias para classificar as amostras em fortes e fracas produtoras de elastases, conforme já descrito no item 3.2 de material e métodos.

Tabela 2. Classificação e atividade média de elastase produzida por amostras de *A. fumigatus*, de acordo com o período de incubação. Em destaque as amostras selecionadas para os experimentos subsequentes de infecção experimental.

Amostra	Atividade média de Elastase			Classificação das amostras por atividade de Elastase
	9 dias	15 dias	21 dias	
699	0,051	0,042	0,038	Fraca
2071	0,055	0,046	0,025	Fraca
844	0,061	0,049	0,031	Fraca
603	0,073	0,034	0,031	Fraca
1751	0,089	0,045	0,036	Fraca
100	0,096	0,079	0,031	Fraca
2035	0,097	0,053	0,041	Fraca
1761	0,104	0,052	0,041	Forte
1753	0,144	0,046	0,034	Forte

4.2. Confirmação da identificação de espécie de *Aspergillus* por PCR

Considerando a complexidade de critérios para a identificação morfológica de espécies do gênero *Aspergillus*, as duas amostras selecionadas para as etapas de infecção experimental foram submetidas à confirmação de identificação de espécie por biologia molecular. A Figura 4 evidencia a especificidade dos oligonucleotídeos indicados pela literatura e empregados neste estudo, já que reconheceram e amplificaram apenas fragmentos de DNA pertencentes à espécie *fumigatus* (699 e 1753), gerando o produto de amplificação esperado de peso molecular aproximado de 300pb. Não foram observadas amplificações do DNA de outra espécie (Af - *Aspergillus flavus*) ou outro gênero (Pen - *Penicillium* sp), semelhantes macro e microscopicamente com *A. fumigatus*. No controle sem DNA (C-) observamos uma banda de baixo peso molecular correspondente ao anelamento entre os oligonucleotídeos (dímeros de oligonucleotídeos), que pode ocorrer durante as condições da reação.

Figura 4. Gel de agarose a 1,5%, após eletroforese convencional e coloração com brometo de etídio, evidenciando os produtos da PCR de 300pb resultantes da amplificação das regiões do DNA de amostras de *A. fumigatus* quando do uso de oligonucleotídeos específicos. M = marcador de peso molecular (pb), 699 = amostra 699 de *A. fumigatus*, 1753 = amostra 1753 de *A. fumigatus*, Af = amostra de *Aspergillus flavus*, Pen = amostras de *Penicillium* sp, C- = controle negativo (reação sem DNA genômico).

4.3. Obtenção e purificação do anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G

Como a obtenção de anticorpos monoclonais anti-GR-1/Ly-6G pelo método *in vitro* permitiu um rendimento satisfatório, ou seja, cerca de 308µg/mL, embora mais trabalhoso, optamos por seguir os princípios éticos da experimentação animal que preconiza o “refinamento, redução e substituição” sempre que possível, e assim trabalhamos com a produção de anticorpos monoclonais pela metodologia *in vitro*.

4.3.1. Purificação do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G produzido

Os sobrenadantes das culturas do hibridoma RB6-8C5 contendo os anticorpos monoclonais anti-GR-1/Ly-6G foram submetidas a cromatografia de afinidade e eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10%. Esta permitiu mostrar a eficácia da purificação, uma vez que não evidenciou resquício de outras proteínas presentes na amostra e apontou a migração de proteínas com dois pesos moleculares diferentes: uma banda com peso aparente de 50kDa, correspondente a cadeia pesada do anticorpo monoclonal, e uma banda com peso aparente de 20kDa, correspondente a cadeia leve do anticorpo monoclonal, quando comparados com o padrão de peso molecular (Figura 5).

Figura 5. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10%, corado por prata. 1, 2 e 3 = Alíquotas dos anticorpos monoclonais anti-GR-1/Ly-6G purificados obtidos a partir do hibridoma RB6-8C5 e PM = marcador de peso molecular em kDa.

4.3.2. Especificidade do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G produzido

A especificidade do anticorpo monoclonal produzido foi avaliada por imunofluorescência indireta, a qual teve interpretação e documentação fotográfica da reação de acordo com o filtro de luz escolhido, que permitiu evidenciar apenas os núcleos das células corados inespecificamente pelo marcador DAPI (filtro azul = A4 – UV), os receptores de superfícies dos neutrófilos (filtro vermelho = N2.1 – TRITC) e marcação simultânea dos núcleos celulares e dos receptores de superfície dos neutrófilos, por sobreposição das imagens captadas pelos filtros azul e vermelho. A Figura 6 mostra que o anticorpo primário se ligou especificamente aos neutrófilos, células que caracteristicamente apresentam núcleo segmentado e multilobulado, bem revelados na diluição 1:100.

Figura 6. Imunofluorescência indireta de células inflamatórias coletadas do lavado peritoneal de camundongos desafiados com tioglicolato de sódio. Com filtro azul observam-se núcleos das células corados inespecificamente com DAPI. Com filtro vermelho observa-se a superfície de neutrófilos reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G, em 3 diferentes diluições, e revelada com anticorpo secundário conjugado a Alexa-fluor 594[®]. Na sobreposição de filtros observa-se a dupla marcação. As setas brancas apontam os neutrófilos.

4.4. Depleção de neutrófilos com anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G - Estabelecimento do modelo experimental de neutropenia

Após a inoculação de 50µg em 150µL de PBS do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G purificado, ou do mesmo volume de salina, nos tempos 0 e 48 horas, foram coletados sangue periférico dos animais. As contagens totais e diferenciais de leucócitos mostraram que após 48 horas do tratamento com o anticorpo os animais apresentaram uma depleção de neutrófilos ao redor 75% do basal, e um leve aumento na contagem total de células, possivelmente devido à elevação reacional do número de macrófagos (Tabela 3). Esses resultados mostraram que esse anticorpo foi efetivo para causar uma depleção de neutrófilos suficiente para o estabelecimento posterior da aspergilose pulmonar invasiva (API).

Tabela 3. Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue periférico de animais controles e animais tratados por via intraperitoneal com 150µL de PBS contendo 50µg do anticorpo monoclonal anti-GR-1/Ly-6G purificado, nos tempos 0 e 48 horas. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo, de 2 experimentos independentes.

Grupo de animais	Contagem total (x 10 ⁶ /mm ³)		Contagem diferencial por 100 leucócitos						Porcentagem de depleção de neutrófilos
			Neutrófilos		Linfócitos		Macrófagos		
	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h	
Tratados com Ac	2,9	3,9	12	3	70	76	16	30	75%
Tratados com salina	3,1	3,5	19	22	51	47	30	31	-

4.5. Determinação da virulência das amostras de *Aspergillus fumigatus* por curva de sobrevivência

Uma das formas de se avaliar a virulência de diferentes amostras de microrganismos é por meio da inoculação destas em animais de experimentação, seguida da observação diária até a morte espontânea dos animais. Quanto mais precoce ocorre a mortalidade, mais virulenta é a amostra.

A Figura 7 mostra que durante o período de até 7 dias nenhum dos animais imunocompetentes e infectados com as amostras de *A. fumigatus* sucumbiram à infecção, enquanto os animais neutropênicos e infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*,

apresentaram perfis de mortalidade muito semelhantes, embora *in vitro* essas amostras tenham apresentado atividade de elastases diferentes.

Figura 7. Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados apresentados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.6. Análise da interação fungo/célula do hospedeiro por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os cortes ultrafinos do LBA coletado de camundongos C57BL/6 infectados com *A. fumigatus* mostraram que alguns macrófagos ou neutrófilos apresentaram características típicas de atividade fagocitária quando em proximidade com os fungos, evidenciado pela presença de projeções dendríticas e pseudópodes apresentados por esses fagócitos.

Independente se conídios ou hifas, e se macrófagos ou neutrófilos, a interação foi feita pela íntima adesão e fusão entre os componentes de superfície de ambas as células (Figura 8), que propiciou a internalização do fungo, possivelmente por formação de estruturas vacuolares, uma vez que foram evidenciadas membranas circundando as células fúngicas (conídios ou hifas) no interior dos fagócitos (Figura 9).

O objetivo desta etapa foi apenas analisar o processo de interação fungo-célula do hospedeiro, mas as diversas análises feitas dos diferentes grupos experimentais mostraram que o padrão de interação observado foi o mesmo, para ambas as amostras do fungo e em qualquer tempo da evolução da API experimental, tanto para os animais neutropênicos (que tinham mais macrófagos), quanto para animais imunocompetentes.

Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a interação de conídios (A-D) e hifas (E-F) com células coletadas do LBA de camundongos C57BL/6 infectados com amostras de *A. fumigatus*. Salienta-se a íntima adesão com fusão entre os constituintes de superfície dos macrófagos e dos fungos. Aumentos de 8000X, 20.000X, 40.000X, 67.000X, 6700X e 10.000X, respectivamente de A a F.

Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a interação de conídios (A-F) e hifas (G-I) com células coletadas do LBA de camundongos C57BL/6 infectados com amostras de *A. fumigatus*. Salienta-se a internalização das estruturas fúngicas em macrófagos (A-F) e neutrófilos (G-I), as quais são circundadas por membrana vacuolar (setas). Aumentos de 10.000X, 27.000X, 40.000X, 10.000X, 27.000X, 40.000X, 10.000X, 27.000X e 100.000X, respectivamente de A a I.

4.7. Evolução da aspergilose pulmonar invasiva (API) experimental

4.7.1. Determinação da concentração de hemoglobina (Hb) no LBA

A Figura 10 mostra que no período de 24 horas pós-infecção os animais imunocompetentes infectados pela amostra 699 de *A. fumigatus* apresentaram liberação de Hb mais elevada que os animais neutropênicos infectados pela mesma amostra, e o mesmo perfil

também foi observado para os animais infectados com amostra 1753 de *A. fumigatus*, porém essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Um pico de liberação de Hb, estatisticamente significativo, foi observado no LBA broncoalveolar dos animais neutropênicos infectados com a amostra 699 de *A. fumigatus*, 48 horas pós-infecção. Os animais neutropênicos infectados por ambas as amostras de *A. fumigatus* apresentaram queda dos níveis de Hb no tempo 72 horas pós-infecção, estatisticamente significativa, quando comparados com os mesmos animais no tempo 48 horas pós-infecção.

Figura 10. Concentração de hemoglobina ($\mu\text{g/mL}$) no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da dosagem de Hb de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos. $p < 0,05$ sendo • = entre 24 e 48h; •• = entre 24 e 72h; ••• = entre 48 e 72h, segundo teste estatístico utilizado: two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

4.7.2. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA

Os animais infectados por ambas as amostras de *A. fumigatus* (699 e 1753) mostraram um comportamento semelhante com relação ao recrutamento celular para o foco da infecção. Em relação à contagem total de células tanto os animais neutropênicos quanto os imunocompetentes apresentaram um aumento no número de leucócitos com a evolução da infecção experimental, com valores estatisticamente significantes em 72 horas pós-infecção (Figura 11).

Figura 11. Contagem total de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem do LBA de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. $p < 0,01$ sendo $\star$ = entre N e IC e $\bullet$ = entre 24 e 72h; $p < 0,001$ para π = entre 24 e 72h segundo o teste estatístico utilizado: two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

O percentual de macrófagos presente no LBA dos animais neutropênicos foi estatisticamente maior do que o percentual deste leucócito presente no LBA dos animais imunocompetentes, independente do período da infecção, tanto para a amostra 699 quanto para a amostra 1753 de *A. fumigatus*. Ao contrário, o percentual de neutrófilos presentes no LBA dos animais neutropênicos se mostrou estatisticamente sempre menor do que o percentual verificado no LBA dos animais imunocompetentes, também independente do período da infecção, tanto para a amostra 699 quanto para a amostra 1753 de *A. fumigatus*, constatando a neutropenia induzida pelo anticorpo anti-GR-1/Ly-6G (Figura 12).

No entanto, em 72 horas pós-infecção até os animais neutropênicos apresentaram um afluxo maior de neutrófilos e menor de macrófagos para o foco da infecção, estatisticamente significante, indicando que o processo infeccioso deve induzir a proliferação e diferenciação celular pela medula óssea.

Figura 12. Contagem diferencial de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem do LBA de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. $p < 0,001$ sendo ★ = entre N e IC, φφ = entre 24 e 72h; $p < 0,01$ sendo π = entre 24 e 48h, ππ = entre 24 e 72h; $p < 0,05$ sendo ●●● = entre 48 e 72h, segundo o teste estatístico utilizado: two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

4.7.3. Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico

A contagem total de leucócitos no sangue periférico dos animais neutropênicos e imunocompetentes infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* revelou uma queda ou manutenção destes, como esperado em todo processo infeccioso, uma vez que ocorre recrutamento das células circulantes para o foco de infecção (Figura 13).

Figura 13. Contagem total de leucócitos ($\times 10^6/\text{mL}$) presentes no sangue de camundongos C57BL/6 animais neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pela amostra 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem do sangue de animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. ★ e ● com $p < 0,05$ para cada período quando comparado ao grupo controle (-24h); ★★ e ●● com $p < 0,01$ para cada período quando comparados ao grupo controle (-24h), segundo o teste estatístico utilizado: one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett.

A Figura 14 mostra que os animais imunocompetentes infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* apresentaram uma manutenção ou aumento significativo no número de neutrófilos e monócitos (células precursoras de macrófagos) na tentativa de contenção do

processo infeccioso, a partir de 24 horas pós-infecção. Nestes mesmos grupos, o número de linfócitos apresentou uma ligeira queda no decorrer do processo infeccioso por ambas as amostras de *A. fumigatus*.

Já os animais tratados com anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G e infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* apresentaram uma redução estatisticamente significativa no número de neutrófilos no decorrer do processo infeccioso, em virtude da eficácia do anticorpo monoclonal. Os animais neutropênicos infectados pela amostra 699 apresentaram um aumento considerável do número de monócitos com a evolução da infecção experimental, possivelmente como mecanismo compensatório. No entanto, o mesmo não foi observado para os animais neutropênicos infectados com a amostra 1753. É possível também que tenha ocorrido um reconhecimento inespecífico de linfócitos pelo anticorpo monoclonal.

Figura 14. Contagem diferencial de leucócitos presentes no sangue de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem do sangue de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. ● com $p < 0,01$ para cada período quando comparados ao grupo controle (-24h); ★ com $p < 0,05$ para cada período quando comparados ao grupo controle (-24h); Teste estatístico utilizado: one-way ANOVA com pós teste de Dunnett.

4.7.4. Análise histopatológica do pulmão infectado com *A. fumigatus*

A análise das secções pulmonares coradas por HE (Figura 15 e Tabela 4) revelou que o processo inflamatório observado nos pulmões dos animais neutropênicos e imunocompetentes, infectados por qualquer uma das amostras de *A. fumigatus*, foi mais exuberante nas 72 horas pós-infecção.

O padrão celular do infiltrado inflamatório observado em animais imunocompetentes, infectados pela amostra 699 de *A. fumigatus* apresentou uma cinética de recrutamento diferente da observada em animais infectados pela amostra 1753 de *A. fumigatus*. No primeiro caso foi observado um predomínio de células mononucleares (monócitos, linfócitos e macrófagos) 24 horas após a infecção. Em 48 horas pós-infecção houve o predomínio de polimorfonucleares e em 72 horas houve predominância de macrófagos. Nos animais imunocompetentes, infectados pela amostra 1753 de *A. fumigatus*, observou-se um maior influxo de neutrófilos já em 24 horas pós-infecção e predomínio de macrófagos em 48 e 72 horas pós-infecção.

O padrão celular do infiltrado inflamatório observado nos animais neutropênicos, infectados por qualquer uma das amostras de *A. fumigatus*, apresentou o mesmo perfil: presença de mononucleares (principalmente monócitos e linfócitos) sempre em maior quantidade quando comparada com polimorfonucleares. O número de macrófagos presentes foi discretamente menor quando comparados com os animais imunocompetentes.

Nos animais neutropênicos foi observada também angionvasão e invasão de parede brônquica por qualquer uma das amostras de *A. fumigatus*, 24 e 48 horas após a infecção, evidenciando que a neutropenia foi condição fundamental para a invasividade e disseminação hematogênica promovida pelo fungo.

Figura 15. Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs), corados por HE. As figuras são representativas do processo inflamatório gerado por cada amostra de fungo durante a evolução da API experimental. Seta cheia evidencia um infarto hemorrágico e seta tracejada mostra área de necrose inflamatória. Aumentos (A-L respectivamente): 100x, 100x, 100x, 200x, 40x, 100x, 100x, 200x, 200x, 100x, 100x e 100x.

As secções pulmonares coradas por GMS (Figura 16 e Tabela 4) mostraram que nos animais imunocompetentes não ocorreu transformação dos conídios do fungo em hifas, para amostra 699 de *A. fumigatus*, em nenhum período de observação. No entanto, essa mesma amostra fúngica apresentou intensa filamentação nos animais neutropênicos, com evidência de angioinvasão no parênquima pulmonar, principalmente nos animais sacrificados 24 e 48 horas após a infecção. Esse resultado é um forte indício que os neutrófilos têm papel fundamental no controle da filamentação e invasividade promovidas pelo fungo. Em 72 horas pós-infecção foi observada uma diminuição considerável de estruturas fúngicas no tecido pulmonar. Supõe-se que em condições de imunossupressão a medula óssea aumente a produção de neutrófilos que, mesmo imaturos (desvio à esquerda), assumem um papel fundamental no controle da infecção. O aumento no número de macrófagos, nesse mesmo período, também contribui para a redução da carga fúngica.

Em animais imunocompetentes infectados com a amostra 1753 de *A. fumigatus*, foi observada filamentação significativa do fungo, principalmente 48 horas após a infecção, reforçando a possibilidade de maior virulência. Nos animais neutropênicos a filamentação foi bastante intensa com evidências irrefutáveis de angioinvasão em animais sacrificados 24 e 48 horas após a infecção. Embora focos de aglomerados de hifas ainda tenham sido observados no parênquima pulmonar de animais nas 72 horas pós-infecção, estes sempre ocorreram em menor proporção quando comparados com as os animais sacrificados 24 e 48 horas pós-infecção.

Figura 16. Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs), corados por GMS. As figuras são representativas da morfologia (conídios ou hifas), carga fúngica e da invasividade gerada por cada amostra de fungo durante a evolução da API experimental. Setas evidenciam angioinvasão. Aumentos (A-L respectivamente): 200x, 100x, 400x, 200x, 400x, 100x, 100x, 200x, 100x, 200x, 100x e 200x.

A coloração de Weigert para fibras elásticas (Figura 17 e Tabela 4) evidenciou a integridade de vasos sanguíneos e discreta ruptura de parede brônquica no parênquima pulmonar dos animais imunocompetentes sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção por ambas as amostras de *A. fumigatus*. Entretanto, nos animais neutropênicos, foram observados

indícios de ruptura vascular nas secções pulmonares de animais sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção pela amostra 699 de *A. fumigatus*. Os animais neutropênicos infectados com a amostra 1753 de *A. fumigatus* apresentaram evidências de ruptura vascular apenas nos animais com 48 horas pós-infecção.

Figura 17. Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs), corados por Weigert (W). As figuras são representativas da ruptura ou não das fibras elásticas de vasos sanguíneos e ramos brônquicos gerados por cada amostra de fungo durante a evolução da API experimental. Setas vermelhas evidenciam disrupção vascular enquanto que setas azuis evidenciam disrupção brônquica. Aumentos (A-L respectivamente): 100x, 100x, 100x, 200x, 100x, 100x, 100x, 200x, 100x, 100x, 100x e 100x.

Tabela 4. Análise qualitativa e semi-quantitativa do padrão histológico observado nos pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, infectados com as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*, de acordo com a evolução da infecção experimental (24, 48 e 72 hs). Os resultados representam médias das observações encontradas para tecidos de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes.

Tempo	HE				HE – GMS - W		GMS	
	Tipo celular				Agressividade		Morfologia fúngica	
	PMN %	MN %	MΦ %	Angio invasão	Invasão brônquica	Hemorragia intra-alveolar	Esporos %	Hifas %
Animais neutropênicos infectados com a amostra 699 de <i>A. fumigatus</i>								
24 hs	25	40	35	+	+	+	25	75
48 hs	20	40	40	+	++	+	50	50
72 hs	30	20	50	-	+	-	60	40
Animais imunocompetentes infectados com a amostra 699 de <i>A. fumigatus</i>								
24 hs	40	40	20	-	+	+	100	0
48 hs	60	10	30	-	+	-	100	0
72 hs	30	20	50	-	+	-	100	0
Animais neutropênicos infectados com a amostra 1753 de <i>A. fumigatus</i>								
24 hs	20	60	20	+	++	+	5	95
48 hs	20	60	20	+	+	+	5	95
72 hs	35	30	35	-	-/+	-/+	10	90
Animais imunocompetentes infectados com a amostra 1753 de <i>A. fumigatus</i>								
24 hs	50	15	35	-	+	+	95	5
48 hs	45	10	45	-	+	+	65	35
72 hs	40	20	40	-	-/+	-	35	65

HE = Hematoxilina-eosina; GMS = Grocott-Metenamina-Prata; W = Weigert.

(-) = ausente em todos os animais do grupo; (-/+) = ausente ou presente em alguns animais do grupo; (+) = presente em todos os animais do grupo, atingindo de 0 a 15% da área tecidual, (++) = presente em todos os animais do grupo, atingindo de 15 a 40% da área tecidual.

De forma geral podemos considerar que: a) o processo inflamatório observado nos animais imunocompetentes, infectados por qualquer uma das amostras de *A. fumigatus*, geralmente apresentou características mais focais ou localizadas comparado com o padrão preferencialmente difuso observado nos animais neutropênicos; b) independente da amostra fúngica e do perfil imunológico os animais já com 24 horas pós-infecção apresentaram intenso padrão inflamatório que foi amplificado com 48 horas. Foi observada uma tendência para resolução da infecção com 72 horas, associado a correspondente diminuição de carga fúngica; c) todos os animais infectados pela amostra 1753 de *A. fumigatus*, neutropênicos e imunocompetentes, apresentaram transformação dos conídios em hifas, com exuberância da filamentação principalmente em 48 horas, enquanto só os animais neutropênicos e infectados pela amostra 699 de *A. fumigatus* apresentaram o mesmo padrão, com manutenção da forma de conídios, em todos os 3 períodos de observação, nos animais imunocompetentes (Figuras 18 e 19).

Figura 18. Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, indicando o mesmo campo corado por HE e GMS, infectados com a amostra 699 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs). Seta cheia evidencia exuberante filamentação. Seta tracejada mostra conídios sem filamentação. Todas as imagens foram obtidas em aumento de 100x.

Figura 19. Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos e imunocompetentes, indicando o mesmo campo corado por HE e GMS, infectados com a amostra 1753 de *A. fumigatus* e sacrificados em diferentes tempos de observação (24, 48 e 72hs). Seta azul indica área de infarto hemorrágico. Seta vermelha evidencia intensa filamentação. Todas as imagens foram obtidas em aumento de 100x.

4.7.5. Quantificação de fungos do tecido pulmonar

Durante a evolução da API experimental foi observada redução da carga fúngica nos pulmões dos animais, para ambas as amostras de *A. fumigatus* (Figura 20 e 21), compatível com as observações histopatológicas. Não foi detectada uma redução da carga fúngica diferenciada e estatisticamente significativa entre os grupos neutropênicos e imunocompetentes, embora se esperasse que os animais imunocompetentes fossem capazes de fazer um “clearance” dos fungos de forma mais efetiva e rápida.

Figura 20. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em pulmões de camundongos C57BL/6 neutropênicos (N) e imunocompetentes (IC), infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus*. Os resultados representam médias e desvios padrões da contagem de UFC de 3 animais para cada período, representativos de 2 experimentos independentes. $p < 0,05$ para • = entre 24 e 48h e •• = entre 24 e 72h; $\pi\pi = p < 0,01$ entre 48 e 72h, segundo teste estatístico utilizado: two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Figura 21. Unidades formadoras de colônias de *A. fumigatus* em meio ASDC obtidas a partir do homogeneizado de tecido pulmonar murino, após 48 horas de incubação à temperatura ambiente. Imagem representativa de pulmão homogeneizado e diluído 10X, proveniente de animal neutropênico após 24 e 48 horas da infecção experimental com a amostra 699 de *A. fumigatus*.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Aspergillus fumigatus é um fungo ubiquitário, amplamente distribuído na natureza, apresentando alta concentração de conídios dispersos no meio ambiente ($1-100/m^3$), que graças aos seus reduzidos tamanhos ($2-3\mu m$), podem ser inaladas por qualquer ser vivo (Latgé, 2001; Gughani, 2003; Gniadek & Macura, 2007)

Grande parte dos conídios ao serem inalados por hospedeiros imunocompetentes é eliminada pela ação de células epiteliais ciliadas presentes nas vias aéreas superiores (Balloy & Chingnard, 2009). Os conídios que atingem o espaço alveolar são prontamente fagocitados e destruídos por macrófagos residentes. A ação destas células é muito eficiente, eliminando 90% das células fúngicas em até 30 horas (Schaffner, 1983).

Porém, quando o sistema imune do hospedeiro apresenta algum tipo de comprometimento, principalmente neutropenia com contagem total destas células abaixo de $500 \text{ por } mm^3$ de sangue, determinada por diferentes condições como: transplantes de células tronco hematopoiéticas e de órgãos sólidos; prolongada terapia com medicamentos imunossupressores, quimioterápicos e antibióticos de largo espectro; pacientes HIV positivos em estágios tardios e outras doenças crônicas debilitantes; a inalação de propágulos do fungo pode causar diversos tipos de patologias, e sem dúvida, a aspergilose pulmonar invasiva é a mais preocupante, podendo ser fatal em 50 a 95% desses pacientes (Balloy & Chignard, 2009, Kousha et al, 2011).

A. fumigatus também apresenta fatores de virulência que o auxiliam a se estabelecer no hospedeiro humano, sendo que entre os mais relevantes e já estudados podemos destacar: secreção de enzimas hidrolíticas como proteases e fosfolipases; secreção de toxinas, produção de melanina e de catalases contra radicais reativos do oxigênio (Karkowska-Kuleta et al, 2009), além de várias proteínas imunogênicas quando em parasitismo, demonstradas por técnica de proteômica (Kumar et al, 2011).

A produção de proteases como elastases por amostras de *A. fumigatus* gera interesse para seu estudo, pois o pulmão, que é o órgão mais comumente afetado, é rico em fibras elásticas e essa enzima já foi relacionada à virulência desse fungo, comprovada por infecção experimental. Kothary e colaboradores (1984) avaliaram a produção desta enzima em meios contendo elastina como única fonte de nitrogênio e concluíram que amostras produtoras de elastase, quando inoculadas em camundongos, acarretaram extensa destruição do parênquima pulmonar e causaram a morte dos animais em 72 e 96 horas após a infecção. No entanto, a

inoculação de amostras não produtoras de elastase não acarretou qualquer comprometimento pulmonar relevante e a mortalidade foi consideravelmente menor, mesmo em animais neutropênicos, resultados também observados por Kolattukudy e colaboradores (1993).

A literatura aponta conclusões controversas em relação ao papel de elastases de *A. fumigatus* como fator de virulência. Enquanto Blanco et al (2002) mostraram que amostras com alta atividade de elastase eram provenientes de amostras isoladas de casos clínicos disseminados com alta invasividade, em contraste com amostras provenientes de lesões localizadas que mostraram pouca ou nenhuma atividade de elastases, Alp & Arikan (2008) investigaram a produção de elastase em meio sólido por amostras de *A. fumigatus* isoladas de pacientes com API e não conseguiram estabelecer uma ligação entre a produção desta enzima com o desenvolvimento de doença invasiva. Denning e colaboradores (1992) analisaram cortes histológicos de pulmões de nove pacientes que morreram em decorrência de API, coradas por GMS e Van Gieson (coloração para fibras elásticas), e não observaram qualquer destruição das fibras elásticas pulmonares decorrentes de ação enzimática por hifas de *A. fumigatus*.

Utilizando meio com substrato específico, nossos resultados mostraram que todas as nove amostras de *A. fumigatus* produziram elastase, porém a atividade da enzima não apresentou valores com amplitudes marcantes, dificultando a discriminação das amostras por esse parâmetro. Padronizamos um nível de corte aleatório (absorbância de 0,1) que permitiu a classificação das amostras em fortes e fracas produtoras de elastase, baseado nos valores de absorbância detectadas em 495nm, observado após 9 dias de incubação.

A cinética de produção desta enzima (Tabela 2) evidenciou atividade enzimática mais constante e homogênea no menor período de incubação testado (9 dias), indicando que o consumo do substrato em função do tempo (15 e 21 dias), possivelmente leve a uma perda do efeito indutor da elastina para as elastases, independentemente da amostra em estudo. Kolattukudy e colaboradores (1993) obtiveram resultados semelhantes na determinação quantitativa de elastase, com pico de produção da enzima após 5 dias de incubação em meio contendo Elastina Congo-Red como substrato, e níveis decrescentes nos tempos subsequentes.

García et al (2006) mostraram que amostras não produtoras de elastases, após sucessivas passagens em camundongos, passaram a apresentar atividade dessa enzima, indicando que *A. fumigatus*, na dependência das condições em que se encontra, é capaz de induzir a produção da enzima. Isso nos mostra que é possível que o método e as condições por nós escolhidos para avaliar essa enzima, possam não ter sido as ideais para um estudo mais acurado sobre elastases de *A. fumigatus*, mas foi suficiente para o objetivo proposto.

Escolhemos as amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* para as etapas subsequentes de infecção experimental, pois além delas terem sido classificadas, respectivamente, como fraca e forte produtoras de elastase, foram isoladas de casos clínicos compatíveis com o grau de virulência definido, ou seja, provenientes de lesão dermatológica localizada em paciente submetido a transplante renal e fungemia em paciente com neutropenia importante (Tabela 2).

A literatura mostra que diferentes modelos experimentais têm sido empregados na tentativa de elucidar a fisiopatogenia da API. A escolha de um modelo experimental deve preencher alguns requisitos básicos como: mimetizar da melhor forma possível os aspectos clínicos observados em humanos, apresentar alta reprodutibilidade dos resultados e ser econômico.

Camundongos são os principais animais utilizados em experimentos para o estudo da API, pois apresentam uma série de vantagens quando comparado aos demais como: utilização de um maior número de animais por experimento, fácil manuseio, economicamente mais acessíveis, possibilidade de inúmeros animais “knock-out” e reagentes e imunobiológicos específicos comercialmente disponíveis (Clemons & Stevens, 2005).

Para que os resultados possam ser comparados existe um esforço internacional na tentativa de padronização de modelos experimentais de API, já que são inúmeras as variáveis que podem afetar os resultados como: via de inoculação, tamanho do inóculo, linhagem do animal, modelo de imunossupressão escolhido e virulência da amostra utilizada (Patterson, 2005).

Partindo das observações feitas por Shibuya e colaboradores (1997) que estudando lesões pulmonares em 54 autópsias de pacientes com API, puderam definir padrões histopatológicos diretamente relacionados ao perfil imunológico dos pacientes, já apresentados na introdução deste trabalho, foi definido que o estabelecimento da API experimental depende diretamente do regime imunossupressor (Stergiopoulou et al, 2007), e assim os esquemas de imunossupressão mais empregados são: tratamento com corticosteroides e/ou quimioterápicos (Berenguer et al, 1995, Nawada et al, 1996; Balloy et al, 2005; Sheppard et al, 2006), ou tratamento com anticorpo monoclonal dirigido contra antígeno de superfície de granulócitos (Mehrad et al, 1999; Carpenter & Hogaboam, 2005; Stephens-Romero et al, 2005, Daley et al, 2008).

A princípio os glicocorticóides e a ciclosporina A atuam preferencialmente nas células da defesa imune adquirida, ou seja, sobre os linfócitos circulantes; os quimioterápicos, como ciclofosfamida e vinblastina, atuam sobre todas as células da defesa imune, quer inata ou

adquirida; e os anticorpos monoclonais anti GR-1/Ly-6G, atuam depletando especificamente granulócitos.

Berenguer e colaboradores (1995) trabalhando com coelhos observaram que estes apresentaram 100% de mortalidade quando granulocitopênicos (por quimioterápico) e grande sobrevida quando tratados com ciclosporina A mais prednisona. Balloy e colaboradores (2005) também evidenciaram que camundongos tratados com quimioterápico (5 mg de vinblastina por Kg de animal, por via endovenosa), apresentaram abundante desenvolvimento de fungo e pouca resposta inflamatória, enquanto os camundongos tratados com 10mg de acetato de cortisona, por via intraperitoneal, apresentaram resposta imune agressiva, mas com poucos fungos.

Stephens-Romero e colaboradores (2005) utilizando camundongos C57BL/6 e BALB/c aplicaram diferentes esquemas de imunossupressão: tratamento com anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G, administração de ciclofosfamida, ou ação conjunta desses dois esquemas imunossupressores para o estudo da API experimental induzida pela inalação de aerossóis contendo conídios de *A. fumigatus*; e concluíram que os parâmetros histopatológicos variaram consideravelmente de acordo com o regime imunossupressor utilizado, inclusive entre as linhagens dos animais infectados.

No geral os estudos com API experimental mostram que a resposta imune observada em camundongos imunocompetentes é caracterizada por inflamação moderada e transitória que leva à completa eliminação do fungo sem a formação de lesão pulmonar. Essa resposta inflamatória é composta por afluxo transitório de PMN e produção de citocina pró-inflamatória TNF- α . Em camundongos imunodeprimidos, principalmente submetidos a esquema imunossupressor que cause importante depleção de neutrófilos, observam-se lesões pulmonares necrotizantes com limitado infiltrado celular, grande crescimento de hifas, angioinvasão e dano tecidual. Quando o esquema de imunodepressão é feito com glicocorticóides resulta em resposta celular exuberante composta primariamente por neutrófilos, que são responsáveis pelo dano tecidual, e poucos elementos fúngicos a despeito de inóculo acima de 10^7 conídios. Assim, a mortalidade apresentada por esses animais é em parte devido à própria resposta do hospedeiro (Clemons et al, 2011).

Essas observações confirmam o papel essencial de neutrófilos na defesa contra *A. fumigatus*, pois na ausência dessa população celular os fungos rapidamente invadem o pulmão. No entanto, deve-se considerar que a simples presença do fungo induz a migração de neutrófilos para o sítio da infecção e a exacerbação dessa resposta inflamatória visa prevenir a invasão fúngica, mas sua exacerbação pode levar à morte (Balloy et al, 2005).

Optamos por utilizar o modelo de neutropenia determinado pelo tratamento com o anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G, proveniente do hibridoma RB6-8C5, por acreditarmos que este mimetizaria de forma mais adequada à condição de risco (neutropenia em TMO) mais frequentemente observada em humanos com API no nosso meio e pela confiabilidade do modelo já estabelecido para a comparação entre virulência de diferentes amostras de *A. fumigatus*.

Reconhecidamente o rendimento para a produção de anticorpos monoclonais é muito mais eficiente quando utilizado o método *in vivo*, ou seja, produção de ascite em animais. No entanto, tivemos dificuldades para obter os animais isogênicos C57BL/6 *Nude* ou BALB/c *Nude* necessários e mesmo manter esses animais vivos durante o período estipulado para a produção de quantidade suficiente do anticorpo monoclonal. Nesse método, é feito tratamento inicial com 100µL de pristane (visando a supressão total do sistema imune do animal), e 7 dias após são inoculados, por via intraperitoneal, 1×10^6 células do hibridoma RB6-8C5 por animal, permitindo assim o crescimento das células tumorais com liberação dos anticorpos monoclonais no líquido ascítico, em quantidade adequada cerca de 72 horas pós-inoculação.

Ressaltamos que em termos de trabalho e custos o emprego de corticosteroides e/ou quimioterápicos é muito mais simples, mas mesmo com toda a dificuldade enfrentada para produzir *in vivo* e *in vitro* os anticorpos monoclonais a eficiência observada na depleção de neutrófilos nos animais tratados com a dose preconizada pela literatura (Tabela 3), nos garantiu um modelo confiável para os estudos da API por diferentes amostras de *A. fumigatus*.

O anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G, pertence à subclasse IgG2b, reagindo com receptores presentes na superfície de granulócitos de camundongos (Tepper et al, 1992). A especificidade desse anticorpo avaliada *in vitro* pela técnica de imunofluorescência indireta (Figura 6) mostrou que o anticorpo anti GR-1/Ly-6G se ligou especificamente aos receptores de superfície presentes em neutrófilos, e *in vivo*, a inoculação por via intraperitoneal de 50µg de anticorpo em 150µL de PBS induziu neutropenia por 48 horas, com necessidade de dose reforço de 25µg a cada 48 horas. Esse esquema, aplicado sistematicamente para os animais infectados pela amostra 1753, permitiu a redução estatisticamente significativa na contagem total e diferencial de leucócitos (neutrófilos e linfócitos) observada nos tempos estudados da cinética da infecção experimental (Figuras 13 e 14).

A redução do número de linfócitos circulantes pode ter sido decorrente do recrutamento de células para o foco da infecção, mas não podemos descartar a possibilidade de reação cruzada do anticorpo, com reconhecimento de receptores Ly-6C presentes em linfócitos.

Stephens-Romero e colaboradores (2005) utilizando diferentes doses do anticorpo anti GR-1/Ly-6G mostraram que a dose de 50 μ g, indicada pela manutenção mais prolongada da depleção celular, resultou em neutropenia e linfopenia, 24 horas após a inoculação do anticorpo.

Nagendra e colaboradores (2004) avaliaram por citometria de fluxo a especificidade de vários anticorpos, inclusive o anticorpo anti GR-1/Ly-6G e concluíram que esse anticorpo ligou-se apenas aos receptores Ly-6G presentes em granulócitos, no entanto, Daley e colaboradores (2008) observaram que além de reconhecer receptores presentes em neutrófilos, esse anticorpo também se ligou aos receptores de superfície (Ly-6C) presentes em linfócitos. Sugerem que para modelos de depleção de neutrófilos seja utilizado o anticorpo monoclonal 1A8, o qual se liga apenas aos receptores (Ly-6G) presentes em neutrófilos.

A contagem total de leucócitos no sangue dos animais imunocompetentes infectados pelas amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* também mostrou diminuição significativa com a cinética da infecção, possivelmente pelo recrutamento destas células para o foco de infecção, reduzindo assim o número de leucócitos presentes na circulação sanguínea (Figura 13).

A contagem diferencial realizada no sangue dos animais imunocompetentes infectados por ambas as amostras de *A. fumigatus* (Figura 14) mostrou um aumento significativo de neutrófilos já a partir de 24 horas após a infecção, e de monócitos, (células precursoras de macrófagos) a partir de 48 horas após a infecção, evidenciando o papel fundamental de ambos os tipos celulares na contenção e destruição das estruturas (conídios e hifas) do patógeno. O aumento tardio do número de monócitos, quando comparados aos neutrófilos, pode ser explicado pela presença de macrófagos alveolares residentes no pulmão, já que 24 horas após a infecção não houve aumento destas células no sangue. A partir do momento que o processo infeccioso exigiu um maior recrutamento de células monocíticas (48 horas após a infecção) para o tecido acometido, a medula óssea deve aumentar a produção destas células, fato verificado pela contagem diferencial neste período.

Com relação ao perfil dos leucócitos presentes no LBA de animais com API, estudos de Duong e colaboradores (1998) e Balloy e colaboradores (2005) mostraram que a cinética de recrutamento leucocitário varia de acordo com o regime imunossupressor utilizado. Nesses trabalhos, a presença de neutrófilos no LBA dos animais imunocompetentes apresentou um pico 48 horas após a infecção, e diminuiu nos tempos subsequentes. Já o número de monócitos e macrófagos aumentou concomitantemente à redução do número de neutrófilos. A imunossupressão por corticóides também evidenciou resultados semelhantes, ou seja, mostrou

um rápido aumento no número de neutrófilos presentes no LBA dos camundongos infectados já após 24 horas de infecção.

Observamos que as contagens totais de leucócitos presentes no LBA dos animais infectados com as amostras 699 e 1753 de *Aspergillus fumigatus* (Figura 10) apresentaram valores sempre superiores no LBA dos animais imunocompetentes quando comparados aos LBA dos animais neutropênicos, independentemente do tempo da infecção.

A contagem diferencial de neutrófilos revelou diferenças estatísticas relevantes entre os animais neutropênicos e imunocompetentes, em todos os períodos e para ambas as amostras fúngicas (Figura 11). A contagem de macrófagos apresentou o comportamento inverso a de neutrófilos, ou seja, animais neutropênicos apresentaram sempre uma maior contagem de macrófagos quando comparada com os animais imunocompetentes, estatisticamente significativa em todos os tempos pós-infecção. Acreditamos que esse fenômeno possa ser explicado como uma tentativa de suprir a falta de neutrófilos para auxiliar a contenção do processo infeccioso.

Entre os animais neutropênicos, infectados pelas amostras 699 e 1753 de *Aspergillus fumigatus*, observamos um comportamento bastante interessante. Mesmo em condição de neutropenia, a contagem de neutrófilos foi estatisticamente maior 72 horas após a infecção, quando comparada com a contagem realizada nos animais sacrificados 24 horas depois. Esse fenômeno pode ser compreendido como uma característica bastante comum presente em infecções agudas, como a que induzimos com este modelo experimental. A medula óssea lança na corrente sanguínea neutrófilos imaturos, na tentativa de controlar e eliminar a infecção (desvio à esquerda), que por sua vez são recrutados para o sítio da infecção, daí encontramos um aumento no número destas células no LBA.

Os animais imunocompetentes, infectados por ambas as amostras do fungo, apresentaram altas contagens de neutrófilos no LBA (Figura 12). Possivelmente a grande quantidade de neutrófilos no LBA é devida à alta concentração do inóculo utilizado neste trabalho (5×10^7 conídios). Philippe e colaboradores (2003) mostraram que a instilação de inóculos menos concentrados ($\leq 10^5$ conídios por camundongo) resultou em níveis de recrutamento de neutrófilos para o LBA muito baixos, pois macrófagos alveolares residentes, por si só, foram capazes de conter a infecção por *A. fumigatus*, estabelecida em camundongos imunodeprimidos com corticosteroides ou por exposição à radiação por bombardeamento de Césio¹³⁷.

Ainda nesse trabalho esses autores além de mostrarem que macrófagos alveolares participam ativamente na remoção de conídios de *A. fumigatus* observaram que a atividade

fagocítica dessas células não foi influenciada pela imunossupressão mediada por corticosteroides ou radiação. A internalização dos conídios envolveu a formação de projeções citoplasmáticas pelas células fagocitárias que progressivamente circundaram as estruturas fúngicas. Após o processo de fagocitose, esses conídios passaram por um processo de intumescimento, fenômeno característico realizado por essas células antes que elas comecem a germinar, visualizado em MET pela formação de uma dupla camada presente na parede dos conídios.

Ibrahim-Granet e colaboradores (2003) verificaram que as projeções citoplasmáticas observadas nas células fagocitárias e formadas nas etapas iniciais do processo de fagocitose, envolviam a polimerização de filamentos de actina.

Nossa análise sobre a interação fungo-célula do LBA, feita por MET, mostrou que macrófagos ou neutrófilos apresentaram características de atividade fagocitária quando em proximidade com as estruturas fúngicas, evidenciado pela presença de projeções citoplasmáticas nesses fagócitos. Independentemente da estrutura fúngica (conídios ou hifas) e da célula fagocíticas (macrófagos ou neutrófilos), essa interação foi feita pela íntima adesão e fusão entre os componentes de superfície de ambas as células, que propiciou a internalização do fungo (Figuras 8 e 9). Observamos estruturas de membrana envolvendo as estruturas fúngicas internalizadas, sugestivas de fusão com vacúolos citoplasmáticos, passo que deve ser fundamental para a etapa posterior de digestão do microrganismo, por ação de oxidantes e enzimas líticas produzidas por esses fagócitos.

A dosagem de hemoglobina no LBA é um parâmetro indicativo de lesão alvéolo-capilar e por isso objetivamos dosar esse componente nos animais neutropênicos e imunocompetentes infectados pelas diferentes amostras de *A. fumigatus*, como uma medida indireta de virulência.

Observamos a presença de hemoglobina no LBA dos animais imunocompetentes e infectados por ambas as amostras (699 e 1753), nos três períodos avaliados (Figura 10). Inclusive, a quantidade de hemoglobina presente no LBA no tempo 24 horas pós-infecção foi sempre maior do que para os animais neutropênicos infectados, sugerindo que os animais imunocompetentes apresentaram rápida e intensa transmigração de neutrófilos do sangue para o foco da infecção, possivelmente pela alta concentração do inóculo utilizado no nosso trabalho (5×10^7 conídios), resultando em exacerbação da resposta inflamatória, responsável pela formação de lesões que geraram liberação de hemoglobina detectada no LBA. Nos tempos subsequentes (48 e 72 horas) foi observado o inverso, ou seja, a quantidade de hemoglobina no LBA dos animais imunocompetentes foi sempre menor do que o obtido nos animais neutropênicos, independente da amostra infectante. Esse dado sugere que a lesão

tissular nos animais neutropênicos foi decorrente de destruição do parênquima pulmonar determinada essencialmente pela proliferação fúngica.

Em 48 horas os animais neutropênicos infectados com a amostra 699 apresentaram um pico de hemoglobina (muita lesão alvéolo-capilar) que poderia sugerir uma maior virulência para essa amostra, mas outras observações associadas, como menor capacidade de filamentação e menor atividade de elastase *in vitro* dessa amostra, fazem refletir sobre as reais causas da lesão tecidual detectada pela dosagem de hemoglobina. O conjunto desses resultados sugere que a Hb presente no LBA possa ser decorrente de lesão alvéolo-capilar causada pelo crescimento e invasão provocados pelas amostras fúngicas e também pela própria reação inflamatória desenvolvida no tecido pulmonar infectado, que é intensa nos animais imunocompetentes e nos períodos precoces da infecção.

Balloy e colaboradores (2005) observaram que em camundongos imunocompetentes infectados não foi detectada nenhuma concentração de Hb significativa no LBA, indicando que esses animais resolveram o processo infeccioso sem apresentarem lesão pulmonar importante. Nos animais infectados e tratados com corticosteroides, a concentração de hemoglobina aumentou gradualmente até a morte dos animais, indicando a presença de lesões alvéolo-capilares relevantes. Essas lesões, como já comentadas anteriormente, deveram-se mais à exacerbação da resposta inflamatória do que à ação direta do fungo sobre o tecido. Nos animais infectados e tratados com agente quimioterápico, a concentração de hemoglobina presente no dia anterior à morte dos animais foi menor do que a encontrada em camundongos tratados com corticosteroides, com pico de produção observado 48 horas após a infecção, indicando a presença de lesões alvéolo-capilares mais brandas ou em menor quantidade, mesmo com grande proliferação fúngica presente.

Essas observações mostram que as lesões alvéolo-capilares, resultantes de destruição e invasividade do parênquima pulmonar por *A. fumigatus* ou da cinética de recrutamento leucocitário para o foco de infecção, variam consideravelmente e apresentam profunda correlação com o regime imunossupressor utilizado.

Parâmetros como perfil de mortalidade dos animais por análise de curva de sobrevivência, quantificação da carga fúngica tecidual por contagem de UFC e análises histopatológicas dos órgãos afetados são amplamente analisados nos trabalhos sobre a fisiopatogenia da API (Berenguer et al, 1995; Mondon et al, 1996; Duong et al, 1998; Shibuya et al, 2004; Carpenter et al, 2005; Stephens-Romero et al, 2005; Sheppard et al, 2006).

Quando avaliada a mortalidade dos animais neutropênicos, ambas as amostras de *A. fumigatus* apresentaram um mesmo padrão de virulência, com sobreposição das curvas de

sobrevivência. Com o inóculo utilizado, nenhum animal resistiu a infecção experimental por mais de 5 dias, e o tratamento com antibióticos excluiu a possibilidade do curto tempo de sobrevida ser decorrente de infecção bacteriana secundária em animais neutropênicos.

A determinação quantitativa da carga fúngica por contagem de UFC consiste no plaqueamento de diluições seriadas de uma suspensão de tecido visando resultar em placas com contagem ideal entre 30 a 300 colônias do organismo presente no tecido, e assumindo que cada colônia é proveniente de uma simples célula viável do organismo (Clemons & Stevens, 2009). Essa metodologia clássica, amplamente utilizada pelo baixo custo e praticidade, tem gerado resultados controversos que faz questionar a eficácia desta metodologia, principalmente para fungos filamentosos como *Aspergillus* (Bowman et al, 2001).

Acredita-se que esses microrganismos formem agregados de células no tecido, por contínua filamentação de hifas existentes durante a infecção, que são difíceis de se soltarem até poder a vir representar uma simples célula, além de que a fragmentação dessas estruturas por homogeneização mecânica inadequada do tecido pode reduzir a viabilidade fúngica, resultando em uma contagem de UFC não condizente com o real comprometimento do tecido infectado (Clemons & Stevens, 2009).

Sheppard e colaboradores (2006) compararam a carga fúngica presente nos pulmões de camundongos imunossuprimidos por cortisona e/ou ciclofosfamida, e infectados pela inalação de conídios de *A. fumigatus*, por UFC em cultura e por PCR. As UFC foram contadas em tecidos pulmonares provenientes de animais sacrificados no mesmo dia da infecção (para assegurar apenas a presença de conídios no tecido) e nos dias 3, 5 e 7 após a infecção. Os autores observaram que a carga fúngica pulmonar diminuiu significativamente 3 dias após a infecção, e permaneceu relativamente estável nos tempos subsequentes (5 e 7 dias). Esta diminuição foi causada provavelmente pelos fatores técnicos apontados acima (aglomerados e ruptura mecânica), que não comprometeu as contagens do dia da infecção, porque em virtude do pequeno tamanho dos conídios de *A. fumigatus* (estruturas utilizadas como inóculo), eles são dispersos mais facilmente no meio de cultura, levando a uma contagem mais fidedigna. A quantificação por PCR mostrou um comportamento inverso, ou seja, um aumento progressivo de material genético de fungos nos dias 3, 5 e 7 pós-infecção. A explicação desse resultado reside no fato de que as hifas, diferentemente dos conídios, são estruturas multicelulares, daí um maior reconhecimento efetuado pelos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR.

É necessário salientar que a determinação de UFC detecta organismos viáveis, que inclusive podem ser identificados, enquanto outros métodos baseados na determinação

química e imunológica de componentes de parede (quitina, glucana e galactomananas) e mesmo PCR, não indicam a viabilidade ou a especificidade do fungo.

Similar aos nossos resultados (Figura 9), Duong e colaboradores (1998) observaram que a contagem de UFC também apresentou um decréscimo progressivo nos tempos subsequentes pós-infecção, mas eles observaram que essas contagens foram significativamente maiores nos animais imunossuprimidos (com cortisona) do que nos animais imunocompetentes, em todos os períodos analisados. Nossos resultados quando comparados esses grupos, não mostraram o mesmo perfil embora esperássemos que os animais imunocompetentes fossem capazes de fazer um “*clearance*” dos fungos de forma mais efetiva e rápida. Esses resultados sugerem que outras células de defesa, como macrófagos, atuam de forma eficaz na redução da carga fúngica tecidual, compensando a falta de neutrófilos, mas também salientamos que nos pulmões dos animais imunocompetentes, principalmente 24 horas após a infecção, só foram observadas conídios, que são dispersos mais facilmente no meio de cultura, resultando em maiores contagens de UFC.

Diversos autores visando estudar em modelo experimental de imunossupressão a fisiopatogenia da API relatam achados na análise histopatológica similares, que variam diretamente com o sistema imunossupressor adotado, com a virulência do fungo e com o animal empregado. (Berenguer et al, 1995; Shibuya et al, 1999 e 2004; Stephens-Romero et al, 2005; Sheppard et al, 2006).

Em coelhos granulocitopênicos (por quimioterápicos) as análises histológicas revelaram infarto hemorrágico, presença de hifas e evidências de angiainvasão. Áreas de necrose inflamatória com conídios em diferentes estágios de germinação foram as alterações observadas em coelhos imunossuprimidos com ciclosporina A e metilprednisolona e em coelhos imunocompetentes (Berenguer et al, 1995) .

Ratos imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados por via intravenosa com cepas selvagem e mutante MA1 de *A. fumigatus* (cepas com ausência de produção de protease) apresentaram no 5º dia pós-infecção lesões caracterizadas por um proeminente infiltrado neutrofilico com uma mínima participação de macrófagos. As hifas apresentaram um padrão radial circundando os alvéolos. Os pulmões dos ratos infectados com a cepa ΔR47 (ausência de um componente de parede celular presente no conídio) revelaram pequenos e dispersos nódulos que consistiam de neutrófilos, macrófagos e hifas. No 13º dia pós-infecção, não foi observado nenhuma diferença entre as características histológicas ocasionadas pelas três cepas. Todas consistiam em lesões grandes, que envolviam segmentos periféricos dos pulmões com grandes áreas de necrose, presença majoritária de polimorfonucleares e hifas,

com e sem disposição radial. Em alguns casos foi verificada invasão das hifas em brônquios, bronquíolos e artérias (Shibuya et al, 1999).

Camundongos BALB/c imunossuprimidos pelo anticorpo anti GR-1/Ly-6G, mortos espontaneamente em 3 dias pós-infecção, revelaram intensa inflamação, com focos inflamatórios presentes em brônquios, sendo o infiltrado predominantemente neutrofílico. Foram observadas inúmeras hifas presentes dentro de brônquios e invasão do parênquima por ruptura de parede brônquica. As regiões com intenso infiltrado inflamatório apresentaram pouquíssimas hifas. Camundongos C57BL/6 imunossuprimidos pelo anticorpo anti GR-1/Ly-6G, apresentaram extensa necrose do parênquima pulmonar, mas sem presença de inflamação, com pequenas áreas de inflamação perivascular e padrão difuso de distribuição das hifas no parênquima pulmonar, com presença de angioinvasão e trombose vascular (Stephens-Romero et al, 2005).

Nossos resultados com camundongos C57BL/6 imunossuprimidos pelo anticorpo anti GR-1/Ly-6G, independente da amostra do fungo, também revelaram processo inflamatório mais exuberante nas 72 horas pós-infecção e indícios de angioinvasão (Figura 15). Não foi observada a transformação de conídios em hifas nos animais imunocompetentes infectados com a amostra 699, enquanto que nos animais neutropênicos, infectados por qualquer uma das amostras, observamos intensa filamentação (Figura 16 e Tabela 4). Nos animais neutropênicos foram observados indícios de ruptura vascular e brônquica, porém os animais imunocompetentes apresentaram integridade dos vasos sanguíneos e discreta ruptura de parede brônquica (Figura 17).

A disrupção de fibras elásticas presentes em vasos sanguíneos e paredes brônquicas por *A. fumigatus* tem sido relacionada à virulência apresentada por este fungo (Denning et al, 1992), mas nossos resultados semelhantes observados com amostras forte e fraca produtoras de elastase indicam que esta enzima não é um fator primordial para a virulência, que no entanto contribui para a patogênese das lesões observadas na API experimental. Acreditamos que a morfogênese (transformação de conídios em hifas) possa contribuir para a patogênese da API experimental de forma mais relevante do que as elastases do fungo, e portanto, deve representar um fator de virulência a ser estudado mais profundamente.

Por fim, nossos resultados confirmam o papel essencial de neutrófilos na defesa contra *A. fumigatus*, pois na ausência dessa população celular os fungos rapidamente invadem e lesam o parênquima pulmonar. No entanto, deve-se considerar que a simples presença do fungo em animais imunocompetentes induz a migração de neutrófilos para o sítio da infecção, os quais também causam dano tecidual por exacerbação da resposta imune.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As amostras 699 e 1753 de *A. fumigatus* apresentaram perfis distintos de produção de elastase, os quais não refletiram em diferenças significantes para a mortalidade ou gênese das lesões pulmonares observadas em camundongos neutropênicos. O conjunto desses resultados sugere que a virulência de *A. fumigatus* deva ser multifatorial e que a elastase não é um fator primordial de virulência, mas contribui para a patogênese das lesões observadas na API experimental.

O tratamento com anticorpo monoclonal anti GR-1/Ly-6G, mostrou ser um bom método para o estabelecimento do modelo experimental da API, visto que proporcionou uma depleção acima de 75% no número de neutrófilos.

Os animais neutropênicos infectados evoluíram para óbito em no máximo 5 dias, enquanto que os animais imunocompetentes sobreviveram à infecção experimental. A análise histopatológica mostrou um acometimento tecidual muito mais significativo nos pulmões dos animais neutropênicos, quando comparados aos imunocompetentes.

A análise da interação do fungo com fagócitos (neutrófilos e macrófagos) do LBA é feita por contato íntimo entre as superfícies celulares, que conduz à internalização do fungo por fusão de membranas celulares.

A hemoglobina presente no LBA pode ser oriunda de lesão alvéolo-capilar causada pelo crescimento e invasão provocados pelas amostras fúngicas ou por lesão determinada pela própria reação inflamatória.

A contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico e no LBA de animais submetidos a neutropenia mostrou que em resposta ao processo infeccioso, a medula óssea foi estimulada a produzir e liberar principalmente macrófagos que se dirigiram para o sítio da infecção.

O processo inflamatório observado nos animais infectados por ambas as amostras de *A. fumigatus*, mostrou ser constituído por macrófagos e linfócitos, aliado a angioinvasão e

disrupção de parede brônquica nos animais neutropênicos, enquanto nos animais imunocompetentes, o padrão foi primordialmente constituído por polimorfonucleares e não ocorreu angioinvasão.

Nos animais neutropênicos foi observada transformação exuberante dos conídios em hifas para ambas as amostras fúngicas, no entanto para os animais imunocompetentes somente a amostra 1753 de *A. fumigatus* mostrou capacidade de filamentação no tecido durante a infecção. Possivelmente a morfogênese deva ser um fator de virulência mais relevante do que a produção de elastase.

A quantificação de fungos do tecido pulmonar por contagem de UFC para fungos filamentosos pode não estimar corretamente a carga fúngica presente no tecido, pois agregados de hifas formados durante a infecção e/ou a ruptura mecânica destas, podem distorcer a estimativa esperada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, A. et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 27, n. 4, p. 155-182, 2010.

ALP, S.; ARIKAN, S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 331-337, 2008.

AMITANI, R. et al. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 63, n. 9, p.3266-3271, 1995.

AUFAUVRE-BROWN, A.; BROWN, J.S.; HOLDEN, D.W. Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.17, n.11, p.778-780, 1998.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.

BALLOY, V. et al. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive aspergillosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n.1, p. 494-503, 2005.

BALLOY, V.; CHIGNARD, M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. **Microbes and Infection**, Paris, v.11, p. 919-927. 2009.

BEHNSEN, J. et al. The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.76, n.2, p. 820-827, 2008.

BENNETT, J.W. *Aspergillus*: a primer for the novice. **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, S. 1, S5-S12, 2009.

BERENGUER, J. et al. Pathogenesis of pulmonary *Aspergillus*: granulocytopenia versus cyclosporin and methylprednisolone-induced immunosuppression. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 152, p. 1079-1086, 1995.

BINDER, R.E. et al. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity. **Medicine**, Baltimore, v. 61, p. 109-124, 1982.

BLANCO, J.L. et al. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n. 5, p. 1811-1813, 2002.

BOSKEN, C.H. et al. Pathologic features of allergic bronchopulmonary aspergillosis. **The American Journal of Surgical Pathology**, New York, v. 12, n. 3, p. 216-222, 1988.

BOWMAN, J.C. et al. Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 12, p. 3474-3481, 2001.

CARPENTER, K.J.; HOGABOAM, C.M. Immunosuppressive effects of CCL17 on pulmonary antifungal responses during Pulmonary Invasive Aspergillosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 11, p. 7198-7207, 2005.

CHAKRABARTI, A. et al. Invasive Aspergillosis in developing countries. **Medical Mycology**, Oxford, v. 49, S.1, S.35-S.47, 2011.

CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. **Medical Mycology**, Oxford, v. 43, S. 1, S101-S110, 2005.

CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Efficacy of micafungin alone or in combination against experimental pulmonary aspergillosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 69-73, 2006.

CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Animal models testing monotherapy versus combination antifungal therapy: lessons learned and future directions. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 19, n. 4, p. 360-364, 2006.

CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Conventional or molecular measurement of *Aspergillus* load. **Medical Mycology**, Oxford, v. 25, p. 1-6, 2008.

CLEMONS, K.V.; STVENS, D.A. Conventional or molecular measurement of *Aspergillus* load. **Medical Mycology**, Oxford, v. 49, S. 1, p. S132-S137, 2009.

CLEMONS, K.V. et al. Resistance of MBL gene-knockout mice to experimental systemic aspergillosis. **Immunology letters**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 105-107, 2010.

CLEMONS, K.V.; SCHARWITZ, J.A.; STEVENS, D.A. Thepateutic and toxicologic studies in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 834-847, 2011.

DALEY, J.M. et al. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 83, n. 1, p. 64-70, 2008.

DENNING, D.W. et al. Lack of vessel wall elastolysis in human invasive aspergillosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 60, n. 12, p. 5153-5156, 1992.

DENNING, D.W. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 23, p. 608-615, 1996.

DUONG, M. et al. Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 178, n. 5, p. 1472-1482, 1998.

FORD, S.; FRIEDMAN, L. Experimental study of the pathogenicity of *Aspergilli* for mice. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 94, n. 4, p. 928-933, 1967.

GARCÍA, M.E. et al. Changes in the elastase activity and colonization ability of *Aspergillus fumigatus* after successive inoculations in mice. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 23, n. 4, p. 221-223, 2006.

GARLANDA, C. et al. Non-redundant of the long pentraxin PTX 3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, London, v. 420, n. 6912, p. 182-186, 2002.

GEISER, D.M. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, S. 1, S1-S26, 2009.

GNIADAK, A.; MACURA, A.B. Intensive care unit environment contamination with fungi. **Advances in Medical Sciences**, Bialystok, v. 52, p. 283-287, 2007.

GROLL, A. et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. **The Journal of Infection**, London, v. 33, p. 23-32, 1996.

GUGNANI, H.C. Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli*. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 1, n. 8, S346-S357, 2003.

HOPE, W.W. et al. The initial 96 hours of invasive pulmonary aspergillosis: Histopathology, comparative kinetics of galactomannan and (1,3) β -D-glucans, and consequences of delayed antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.54, n. 11, p. 4879-4886, 2010.

HORVATH, J.A.; DUMMER, S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 100, n. 2, p. 171-188, 1996.

HOWARD, G.C.; BETHELL, D.R. **Basic methods in antibody production and characterization**. New York, CRC Press, 2001. 271 p.

IBRAHIM-GRANET, O. et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 2, p. 891-903, 2003.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A.; Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta biochimica Polonica**, Warszawa, v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.

KATZENSTEIN, A.L.; LIEBOW, A.A.; FRIEDMAN, P.J. Bronchocentric granulomatosis, mucoid impaction, and hypersensitivity reactions to fungi. **The American Review of Respiratory Disease**, Baltimore, v. 111, n. 4, p. 497-537, 1975.

KNUTSEN, A.P.; SLAVIN, R.G. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in asthma and cystic fibrosis. **Clinical and Developmental Immunology**, Cairo, v. 2011, 2011.

KOLATTUKUDY, P.E. et al. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 61, n. 6, p. 2357-2368, 1993.

KONTOYIANNIS, D.P.; BODEY, G.P. Invasive Aspergillosis in 2002: an update. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 21, p. 161-172, 2002.

KOTHARY, M.H.; CHASE T.J.; MACMILLAN J.D. Correlation of elastase by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 43, p. 320-325, 1984.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **European Respiratory Review**, Copenhagen, v. 20, n. 121, p. 156-174, 2011.

KUMAR, A. et al. Identification of virulence factors and diagnostic markers using immunosecretome of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 7, p. 1104-1112, 2011.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology. Aspergillosis**. In: Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, 1992, p. 201-247.

LACAZ, C.S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104 p.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 12, p. 310-350, 1999.

LATGÉ, J.P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.

LEE, H.S. et al. Clinical manifestations and treatment outcomes of pulmonary aspergilloma. **The Korean Journal of Internal Medicine**, Seoul, v. 19, p. 38-42, 2004.

LEWIS, R.E. et al. Comparative analysis of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B kinetics of lung accumulation and fungal clearance in a murine model of acute Invasive Pulmonary Aspergillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 4, p. 1253-1258, 2007.

LIN, S.J.; SCHRANZ, J.; TEUTSCH, S.M. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, p. 358-366, 2001.

MADAN, T. et al. Protective role of surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 69, n. 4, p. 2728-2731, 2001.

MADAN, T. et al. Role of collectins in innate immunity against aspergillosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 43, S. 1, S155- S163, 2005.

MAERTENS, J. et al. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 39, n.11, p. 1563-1571, 2004.

MCNEIL, M.M. et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, p. 641-647, 2002.

MEHRAD, B. et al. CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, p. 6086-6094, 1999.

MONDON, P. et al. Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of Invasive Pulmonary Aspergillosis strains investigates by random amplified polymorphic analysis. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 42, n. 4, p. 299-303, 1995.

MONDON, P. et al. Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 45, n. 3, p. 186-191, 1996.

NAGENDRA, S.; SCHLUETER, A.J. Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G. **Cytometry**, New York, v. 58, n. 2, p. 195-200, 2004

NAWADA, R. et al. Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 1433-1439, 1996.

NIKI, Y. et al. Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 1317-1322, 1991.

NUCCI, M. et al. Multicenter survey of invasive fungal infections (IFI) in patient with hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplant recipients (HSCT) in Brazil. **In: Program and abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Washington DC). Washington DC: American Society for Microbiology**, p. 635, 2008.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 51, n.5, p. 561-570, 2010.

PATTERSON, T.F. The future of animal models of invasive aspergillosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 43, S. 1, S.115- S.119, 2005.

PHILIPPE, B. et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 6, p. 3034-3042, 2003.

POLAK, A. Experimental models in antifungal chemotherapy. **Mycoses**, Berlin, v. 41, p. 1-30, 1998.

RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. *Aspergillus fumigatus* group. **The William & Wilkins Co**, Baltimore, p. 238-268, 1965.

REMENTERIA, A. et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 22, p. 1-23, 2005.

ROGERS, H.W.; UNANUE, E.R. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 61, n. 12, p. 5090-5096, 1993.

RUTHEFORD, T.R.; WHEATERALL, D.J. Deficient heme synthesis as the cause of noninducibility of hemoglobin synthesis in a Friend erythroleukemia cell line. **Cell**, Cambridge, v. 16, p. 415-423, 1979.

SARACENO, J.L. et al. Chronic necrotizing aspergillosis: approach to management. **Chest**, Chicago, v. 112, p. 541-548.

SARFATI, J. et al. A new experimental murine aspergillosis model to identify strains of *Aspergillus fumigatus* with reduced virulence. **The Japanese Journal of Medical Mycology**, Tokyo, v. 43, n. 4, p. 203-213, 2002.

SAYLES, P.C; JOHSON, L.L. Exacerbation of toxoplasmosis in neutrophil – depleted mice. **Natural Immunity**, Basel, v. 15, n. 5, p. 249-258, 1996.

SCHAFFNER, A. et al. Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 42, n. 3, p. 1109-1115, 1983.

SCHMIDT, A. Animal models of aspergillosis – also useful for vaccination strategies? **Mycoses**, Berlin, v. 45, n. 1-2, p. 38-40, 2002.

SHEPPARD, D.C. et al. Standardization of an experimental murine model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 10, p. 3501-3503, 2006.

SHIBUYA, K. et al. Pathological spectrum of invasive pulmonary aspergillosis: study of pulmonary lesions of 54 autopsies and the relationship between neutrophilic response and histologic features of lesions in experimental aspergillosis. **The Japanese Journal of Medical Mycology**, Tokyo, v. 138, p. 175-181, 1997.

SHIBUYA, K. et al. Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats: pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 27, n. 3, p. 123-131, 1999.

SHIBUYA, K. et al. Pathophysiology of Pulmonary Aspergillosis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 10, p. 138-145, 2004.

SHIBUYA, K. et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. **The Japanese Journal of Medical Mycology**, Tokyo, v. 47, n. 4, p. 249-255, 2006.

SIDRIM, J.L.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2004. 388 p.

- SOUBANI, A.O.; CHANDRASEKAR, P.H. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Chest**, Chicago, v. 121, p. 1988-1999, 2002.
- STEPHENS-ROMERO, S.D.; MEDNICK, A.J.; FELDMESSER, M. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 1, p. 114-125, 2005.
- STERGIOPOULOU, T. et al. Host-dependent patterns of tissue injury in Invasive Pulmonary Aspergillosis. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 127, p. 349-355, 2007.
- STOOLMAN, L.M. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. **Cell**, Cambridge, v. 56, n. 6, p. 907-910, 1989.
- SUGITA, C. et al. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 43, p. 433-437. 2004.
- SULAVIK, S.B. Bronchocentric granulomatosis and allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Clinics in Chest Medicine**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p. 609-621, 1988.
- TAYLOR, P.R. et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. **Nature Immunology**, New York, v. 8, n. 1, p. 31-38, 2007.
- TEPPER, R.I.; COFFMAN, R.L.; LEDER, P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor of interleukin-4. **Science**, New York, v. 257, n. 5069, p. 548-551, 1992.
- TOMEE, J.F; VAN DER WERF, T.S. Pulmonary aspergillosis. **The Netherlands Journal of Medicine**, Haarlem, v. 59, n. 5, p. 244-258, 2001.
- VALLON-EBERHARD, A. et al. Efficient clearance of *Aspergillus fumigatus* in murine lungs by an ultrashort antimicrobial lipopeptide, palmitoyl-lys-ala-DAla-lys. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 9, p. 3118-3126, 2008.
- WALDORF, A.R. Pulmonary defense mechanisms against opportunistic fungal pathogens. **Immunology series**, New York, v. 47, p. 243-271, 1989.
- WALSH, T.J. et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, n. 3, p. 327-360, 2008.

WARK, P.A.B. et al. Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: A randomized controlled trial. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 111, n. 5, p. 952-957, 2003.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **The New England Journal of Medicine**, Royston, v. 320, n. 6, p. 365-376, 1989.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P., PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004, 1081 p.

8. APÊNDICE

8. APÊNDICE

1. Meios de cultura

1.1. Ágar-Sabouraud dextrose com cloranfenicol (ASDC)

Peptona (Fisher)	10 g
Dextrose (Amresco)	20 g
Cloranfenicol (Merck)	50 mg
Ágar bacteriológico (Difco)	20 g
Etanol absoluto (Merck)	10 mL
Água destilada	q.s.p 1000 mL

Dissolver a peptona e a dextrose em água destilada, acrescentar o ágar e fundir. Acrescentar o cloranfenicol dissolvido em 10 mL de etanol absoluto. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Quando necessário, foi acrescentado a esse meio resfriado a 50°C, 10 mg de gentamicina (Ariston).

1.2. Ágar-Czapek (AC)

Sacarose (Synth)	30 g
Nitrato de sódio (Synth)	3 g
Fosfato de sódio dibásico (Vetec)	1 g
Cloreto de potássio (Merck)	0,5 g
Sulfato de magnésio (Reagen)	0,5 g
Sulfato ferroso heptaidratado (Vetec)	0,01 g
Ágar bacteriológico (Difco)	20 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver todos os componentes em água destilada, sob aquecimento em banho com água. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos.

1.3. Meio mínimo

Fosfato de potássio monobásico (Vetec)	152 mg
Cloreto de potássio (Merck)	52 mg
Cloreto de cálcio diidratado (Synth)	7,35 mg

Sulfato de magnésio heptaidratado (Reagen)	52 mg
Sulfato de cobre pentaidratado (J.T.Baker)	1,6 mg
Sulfato de ferro heptaidratado (Merck)	2,2 mg
Sulfato de zinco heptaidratado (Merck)	8 µg
Água destilada	100 mL
Misturar todos os componentes. Autoclavar a 121°C, por 30 minutos	

1.4. Meio mínimo com Elastina® a 1%

Elastina (Sigma-Aldrich)	0,14 g
Meio mínimo	7 mL
Fosfato de sódio 50 mM pH = 6,8	3,5 mL
Água destilada	3,5 mL

Misturar todos os componentes e, sob constante agitação, transferir 1mL para frascos de penicilina de 10 mL, previamente esterilizados.

1.5. Meio mínimo com Elastina Congo-Red® a 0,5%

Elastina Congo-Red (Sigma-Aldrich)	0,125 g
Meio mínimo	12,5 mL
Fosfato de sódio 50mM pH = 6,8	6,25 mL
Água destilada	6,25 mL

Misturar todos os componentes e, sob constante agitação, aliquotar 300 µL desta solução em microtubos de 2 mL, previamente esterilizados.

1.6. Meio RPMI completo com Soro Bovino Fetal (10 ou 20%)

RPMI (Sigma)	10,4 g
HEPES (Sigma)	3,5 g
L-glutamina (Sigma)	0,3 g
Bicarbonato de sódio (J.T Baker)	2,0 g
Soro Bovino Fetal (Gibco)	100 ou 200 mL
Penicilina 100U/mL e Estreptomicina 10mg/mL (Sigma)	10 mL
Água milli-Q	q.s.p. 1000 mL

Misturar todos os componentes acrescentando por último o soro bovino fetal e os antibióticos. Acertar o pH para 7,0. Completar com água milli-Q e filtrar a vácuo em membrana de 0,22 µm.

2. Soluções

2.1. Solução salina a 0,9%

Cloreto de sódio (Merck)	0,9 g
Água destilada	1000 mL

Homogeneizar os componentes e autoclavar a 121°C, por 30 minutos.

2.2. PBS pH = 7,4

Cloreto de sódio (Merck)	8 g
Cloreto de potássio (Merck)	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico (Vetec)	1,44 g
Fosfato de potássio monobásico (J.T. Baker)	0,24 g
Água destilada	1000 mL

Misturar todos os componentes e acertar o pH para 7,4. Autoclavar a 121°C, por 30 minutos.

Quando necessário foi adicionado a essa solução resfriada 1 mL de Tween 20 (PBS com Tween 20 a 0,1%), ou 5,0 g de Bovine Serum Albumine – BSA (PBS com BSA a 0,5%) , ou 0,2 g de Azida sódica (PBS com Azida a 0,02%)

2.3. Tampão Fosfato de sódio 50 mM

NaH_2PO_4 = Fosfato de sódio monobásico (Vetec)	0,69 g
Na_2HPO_4 = Fosfato de sódio dibásico (Vetec)	0,71 g
Água destilada	100 mL

Misturar os componentes e acertar o pH para 5,8 ou 6,8, conforme a necessidade. Autoclavar a 121°C, por 30 minutos.

2.4. Tampão de extração de DNA

Tris (Tris hidroximetil aminometano) (Fisher)	0,30 g
EDTA (Etilenodiamino ácido tetracético) (Merck)	0,93 g
SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Fisher)	2 g
proteínase K	18,9 mg/mL
Água milli- Q	100 mL

Misturar os componentes, com os devidos cuidados para dissolução dos mesmos, e acertar o pH para 7,5.

2.5. Tampão glicina 0,1M - pH = 2,5

Glicina (Ajinomoto)	0,75 g
Água destilada	100 mL

Dissolver o componente em água destilada e acertar o pH para 2,5.

2.6. Tampão Tris 1M - pH = 9

Tris (Tris hidroximetil aminometano) (Fisher)	1,21 g
Água destilada	100 mL

Dissolver o componente em água destilada e acertar o pH para 9,0.

2.7. Solução saturada de sulfato de amônio

Sulfato de amônio (Synth)	767 g
Água destilada	1000 mL

Após adicionar o sal a água destilada, aquecer a 80°C por 20 minutos para solubilizar. Utilizar a solução acima do precipitado.

2.8. Solução estoque de acrilamida a 30%

Acrilamida (Bio-Rad)	30 g
Bisacrilamida (Bio-Rad)	1 g
Água destilada	100 mL

Misturar os componentes. Usar luvas e máscara no momento que for pesar a acrilamida, pois esta tem efeito carcinogênico e neurotóxico.

2.9. Solução de SDS a 10%

SDS (Merck)	10 g
Água destilada	100 mL

2.10. Persulfato de amônio a 10%

Persulfato de amônio (Bio-Rad)	0,1 g
Água destilada	1 mL

Solubilizar o sal na água destilada.

2.11. Tampão do gel de separação

Trizma base (Sigma-Aldrich)	27,27 g
Água destilada	100 mL

Dissolver o reagente no menor volume de água destilada possível. Acertar o pH para 8,8 com ácido clorídrico fumegante e completar o volume com água destilada.

2.12. Tampão do gel de empilhamento

Trizma base (Sigma-Aldrich)	6,06 g
Água destilada	100 mL

Dissolver o reagente no menor volume de água destilada possível. Acertar o pH para 6,8 com ácido clorídrico fumegante e completar o volume com água destilada.

2.13. Solução de azul de bromofenol a 0,1%

Azul de bromofenol (Vetec)	0,1 g
Água destilada	100 mL

Misturar o corante na água destilada.

2.14. Gel de separação a 10%

Solução estoque de acrilamida	3,3 mL
Tampão do gel de separação (pH = 8,8)	2,5 mL
SDS a 10%	0,1 mL
Persulfato de amônio a 10%	0,1 mL
TEMED (Bio-Rad)	0,01 mL
Água destilada	4,0 mL

Misturar os componentes e acrescentar o persulfato de amônio no final

2.15. Gel de empilhamento

Solução estoque de acrilamida	1,3 mL
Tampão do gel de empilhamento (pH 6,8)	2,5 mL
SDS a 10%	0,1 mL
Azul de bromofenol a 0,1%	0,15 mL
Persulfato de amônio a 10%	0,1 mL
TEMED (Bio-Rad)	0,01 mL
Água destilada	6 mL

Misturar os componentes e acrescentar o persulfato de amônio no final

2.16. Tampão da amostra (5x)

Trizma base pH 6,8	5 mL
SDS (Merck)	1,25 g
Glicerol (USB)	5 mL
Água destilada	q.s.p 100 mL

2.17. Tampão da amostra reduzido

Tampão de amostra (5x)	175µL
β-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)	25 µL
Azul de bromofenol a 0,1%	25 µL

2.18. Solução de xilazina e quetamina

Xilazina a 20 mg/mL (Dopaser)	100 µL
Quetamina a 1000 mg/mL (Agener)	200 µL
Salina 0,9%	q.s.p. 1 mL
Misturar os componentes	

2.19. Solução de Turk

Violeta genciana a 1% (Inlab)	1 mL
Ácido acético glacial (Merck)	1 mL
Água destilada	q.s.p 100 mL
Misturar todos os componentes.	

2.20. Solução fixadora (Microscopia Eletrônica de Transmissão)

Paraformaldeído a 8% (EM Sciences)	2,5 mL
Glutaraldeído a 25% (EM Sciences)	0,8 mL
PBS pH = 7,4	q.s.p 10 mL

Misturar o volume de paraformaldeído com 8 mL de PBS e ajustar o pH para 7,4. Acrescentar o glutaraldeído e completar o volume para 10 mL com PBS.

2.21. Tampão cacodilato de sódio 0,1M pH = 7,4

Cacodilato de sódio (EM Sciences)	2,14 g
Água destilada	100 mL.

Dissolver o cacodilato de sódio em água destilada e ajustar o pH com KCl para 7,4.

2.22. Solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%

Tetróxido de ósmio (EM Sciences)	1 g
Cacodilato de sódio (EM Sciences)	4,28 g
Água destilada	100 mL

Misturar todos os componentes e armazenar sob abrigo da luz.

2.23. Solução de acetato de uranila a 0,5%

Acetato de uranila (EM Sciences)	0,05 g
Água destilada	10 mL

Solubilizar o acetato de uranila em água destilada, filtrar e armazenar sob abrigo da luz.

3. Colorações**3.1. Coloração Panótica (Laborclin)**

Panótico rápido nº1 (solução de triarilmetano a 0,1%)	40 mL
Panótico rápido nº2 (solução de xantenos a 0,1%)	40 mL
Panótico rápido nº3 (solução de tiazinas a 0,1%)	40 mL

Submergir as lâminas na solução nº1 por 5 segundos e nas soluções nº2 e nº3 pelo mesmo tempo. Lavar em água corrente e secar as lâminas na posição vertical.

3.2. Coomassie brilhante a 0,2%

Coomassie (Sigma-Aldrich)	1 g
Metanol (Merck)	250 mL
Ácido acético glacial (Merck)	50 mL
Água destilada	200 mL

Misturar os componentes, filtrar e guardar em frasco escuro. Imergir o gel na solução corante por 15 minutos. A seguir, lavar com PBS.

3.3. Coloração de Hematoxilina- Eosina**3.3.1. Solução de Hematoxilina de Harris**

Cristais de Hematoxilina (Merck)	2 g
Álcool absoluto (Merck)	20 mL
Alúmen de potássio (Merck)	20 g

Óxido vermelho de mercúrio (Merck)	1 g
Água destilada	400 mL

Dissolver a hematoxilina no álcool absoluto e o alúmen de potássio na água destilada um dia antes de realizar a coloração. Misturar as soluções (no dia seguinte) e ferver por 3 minutos. Adicionar o óxido vermelho de mercúrio lentamente e ferver novamente por 5 minutos. Esfriar em recipiente contendo água à temperatura ambiente e filtrar.

3.3.2. Solução de Eosina/floxina

Eosina amarelada a 1% (Merck)	50 mL
Floxina a 1% (Merck)	5 mL
Álcool Absoluto 95% (Merck)	390 mL
Ácido acético glacial (Merck)	2 mL

Misturar bem os componentes e guardar em frasco escuro.

3.3.3. Procedimento para coloração

Desparafinizar as lâminas em 3 baterias de xilol, por 5 minutos cada.

Hidratá-las em concentrações decrescentes de alcoóis (álcool absoluto, álcool 95%, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70% e álcool 50%). Deixar as lâminas por 2 minutos em cada bateria. Colocar as lâminas na hematoxilina por 2 minutos. Se o corante for recém preparado, deixá-las por 20 segundos.

Lavar com água corrente e em seguida com água destilada por 2 minutos.

Colocar as lâminas na solução de eosina/floxina por 2 minutos

Desidratá-las em concentrações crescentes de alcoóis (álcool 95%, e 3 baterias de álcool absoluto). Deixá-las por 2 minutos em cada bateria.

Diafanizá-las em mistura álcool/xilol e 3 baterias de xilol. Deixá-las por 5 minutos em cada bateria.

Montar as lâminas com bálsamo e lamínula retangular 24 x 60 mm.

3.4. Método de Gomori-Metenamina- Prata (GMS)

3.4.1. Solução de Ácido Crômico a 5%

Ácido Crômico (Synth)	5 g
Água destilada	100 mL

3.4.2. Solução de Nitrato de Prata (AgNO_3) a 5%

Nitrato de Prata (Merck)	5 g
Água destilada	100 mL

3.4.3. Solução de Metenamina a 3%

Metenamina ou hexamethyltetramine (Merck)	3 g
Água destilada	100 mL

3.4.4. Solução de Bórax a 5% (Tetraborato de sódio)

Bórax (Synth)	5 g
Água destilada	100 mL

3.4.5. Solução de Incubação

Solução de Metenamina a 3%	50 mL
Solução de Nitrato de Prata a 5%	2,5 mL
Solução de Bórax a 5%	4 mL
Água destilada	50 mL

3.4.6. Solução de Bissulfito de sódio a 1%

Bissulfito de sódio (Vetec)	1 g
Água destilada	100 mL

3.4.7. Solução de Tiosulfato de sódio a 2%

Tiosulfato de sódio (Vetec)	2 g
Água destilada	100 mL

3.4.8. Solução de Cloreto de Ouro a 0,1%

Cloreto de Ouro (Merck)	0,1 g
Água destilada	100 mL

3.4.9. Solução corante de Light Green a 0,2% (Estoque)

Light Green (Merck)	0,2 g
Ácido acético glacial (Merck)	0,2 mL
Água destilada	100 mL

3.4.10. Solução de uso Light Green

Solução estoque a 0,2%	10 mL
Água destilada	50 mL

3.4.11. Procedimento para coloração

Desparafinizar as lâminas e hidratar em água conforme descrito para a coloração de Hemtoxilina-Eosina.

Oxidar na solução aquosa de ácido crômico a 5%, por 1 hora.

Lavar em água corrente por 2 minutos.

Mergulhar na solução de bissulfito de sódio a 1%, por 1 minuto para remover o excesso de ácido crômico.

Lavar em água corrente por 5 minutos e em seguida em água destilada por 4 vezes.

Colocar na solução de incubação e transferir para estufa a 60°C, por 30 a 60 minutos, até que os cortes fiquem amarelo-pardacentos.

Usar pinças com pontas parafinizadas para remover as lâminas e colocá-las em água destilada, por várias vezes.

Colocar na solução de cloreto de ouro a 0,1%, por 5 minutos.

Lavar em água destilada.

Remover a prata não reduzida passando as lâminas na solução de tiosulfato de sódio a 2%, por 2 a 5 minutos.

Lavar em água destilada.

Contracorar com a solução de Light Green, por 45 segundos.

Desidratar, diafanizar e montar conforme descrito para a coloração de Hematoxilina-Eosina.

3.4.12. Observações

Colocar a solução de nitrato de prata-metenamina na estufa, 30 minutos antes do uso.

Caso a prata ficar forte, incubar com tiosulfato de sódio por 5 minutos.

Só usar frascos de vidro e lavá-los com água sanitária.

Usar lâmina controle.

Fungos coram em negro, fundo fica verde pálido.

3.5. Coloração para fibras elásticas (Weigert)

3.5.1. Solução de Fucsina/Resorcina

Fucsina básica (Merck)	2,0 g
Resorcina (Merck)	4,0 g
Água destilada	200 mL
Solução de cloreto férrico (Merck) a 30%	25 mL
Etanol 90% (Merck)	200 mL
Ácido clorídrico (Merck)	4 mL

Colocar a fucsina básica e a resorcina na água destilada e aquecer. Adicionar a solução de cloreto férrico a 30% e ferver por 5 minutos. Filtrar e dissolver o material retido no papel de filtro com etanol 90% aquecido (55°C). Filtrar novamente, resfriar e adicionar o ácido clorídrico.

3.5.2. Procedimento para coloração

Desparafinizar e hidratar as lâminas conforme descrito para a coloração de Hematoxilina-Eosina.

Corar com a solução Resorcina-Fucsina de Weigert, por 10 minutos.

Lavar com água destilada por 2 minutos.

Desidratar, diafanizar e montar conforme descrito para a coloração de Hematoxilina-Eosina.

Fibras elásticas coram em roxo, o fundo apresenta uma coloração rósea clara.

9. ANEXO

9. ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 061/2009, sobre o projeto intitulado "*Papel dos neutrófilos na progressão da aspergilose pulmonar invasiva murina, estabelecida por diferentes amostras de Aspergillus fumigatus strains*", sob a responsabilidade da **Professora Doutora Cláudia Maria Leite Maffei** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **27 de abril de 2009**.

(We certify that the protocol nº 061/2009, about "*Role of the neutrophils in the progression of the murine invasive pulmonary aspergillosis established by different Aspergillus fumigatus strains*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in **04/27/2009** meeting.

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2009.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal