

**RENATA BUCCHERI DE OLIVEIRA**

**Efeito da exposição crônica à fumaça de cigarro em modelo experimental murino na reativação da paracoccidioidomicose**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutora em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

**São Paulo**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Renata Buccheri de  
Efeito da exposição crônica à fumaça de cigarro em  
modelo experimental murino na reativação da  
paracoccidioidomicose / Renata Buccheri de  
Oliveira. -- São Paulo, 2021.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Patologia.  
Orientador: Gil Benard.

Descritores: 1.Paracoccidioidomicose 2.Tabagismo  
3.Infecção latente 4.Reativação 5.Fatores de risco

USP/FM/DBD-024/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esse trabalho ao meu pai  
Sergio Domingues de Oliveira (in memoriam)*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Gil Benard por todos os ensinamentos que contribuíram pro meu crescimento profissional e estruturaram o meu caminho na área da ciência.

Ao programa de pós graduação da Faculdade de Medicina e ao Departamento de Patologia, em especial ao Prof. Dr. Raymundo Azevedo-Neto por sua contribuição na análise dos resultados.

Ao Dr. Amaro N. Duarte, por sua essencial colaboração no desenvolvimento desta pesquisa e grande amizade

Aos alunos de iniciação científica, Flaviano, Gabrielle, Rafael e Thais que não pouparam esforços para que este trabalho fosse realizado.

A Edilma, Adilamar, Luiz e Militão por toda a estrutura física e técnica dos biotérios do Instituto de Medicina Tropical e da Faculdade de Medicina da USP que me permitiram realizar este trabalho.

Colegas e amigos do Emílio Ribas, LIM- 20, LIM-09, ICB/USP pelo carinho, conselhos, ensinamentos que recebi durante esse trabalho. Um profundo obrigado pelas palavras em momentos difíceis, me dando força para continuar.

A todos os pesquisadores, funcionários e alunos do LIM-53 pela troca de conhecimento e amizade.

A minha família, irmã e amigos pelo apoio durante as etapas desse trabalho.

Ao meu marido Carlos Henrique por toda a parceria e cumplicidade.

Joaquim e Francisco pela inspiração diária.

A todos os pacientes que tive a honra de poder cuidar e que tanto me ensinaram sobre a medicina e a vida.

## NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

## LISTA DE GRÁFICOS

	<b>Pág</b>
<b>Gráfico 1.</b> Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com $1 \times 10^6$ leveduras de Pb 18.....	38
<b>Gráfico 2.</b> Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com $1 \times 10^5$ leveduras de Pb 18.....	39
<b>Gráfico 3.</b> Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com $1 \times 10^4$ leveduras de Pb 18.....	39
<b>Gráfico 4.</b> Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com $1 \times 10^3$ leveduras de Pb 18.....	40
<b>Gráfico 5.</b> Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com $1 \times 10^2$ leveduras de Pb 18.....	41
<b>Gráfico 6.</b> Área ocupada pelos granulomas ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça.....	43
<b>Gráfico 7.</b> Peso médio dos camundongos ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça.....	43
<b>Gráfico 8.</b> Peso médio dos camundongos ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).....	44
<b>Gráfico 9.</b> Unidades Formadoras de Colônias ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).....	45
<b>Gráfico 10.</b> Área ocupada pelos granulomas ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).....	49
<b>Gráfico 11.</b> Peso médio dos camundongos ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).....	50

<b>Gráfico 12.</b>	Unidades Formadoras de Colônias ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).....	51
<b>Gráfico 13.</b>	Área ocupada pelos granulomas ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).....	55

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo do experimento.....	30
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo do sistema Venturi.....	33
<b>Figura 3.</b> Fluxograma das duas series experimentais realizadas e verificação da reprodutibilidade dos experimentos.....	42
<b>Figura 4.</b> Granulomas compactos observados no grupo NCS. A) 4 semanas, B) 12 semanas e C) 20 semanas.....	47
<b>Figura 5.</b> Granulomas compactos observados no grupo CS 12 cigarros/exposição. A) 4 semanas, B) 12 semanas e C) 20 semanas.....	48
<b>Figura 6.</b> Granulomas compactos observados no grupo NCS com A) 4 semanas, B) 12 semanas e C) 20 semanas.....	53
<b>Figura 7.</b> Granulomas compactos observados no grupo CS com 16 cigarros/exposição. A) 4 semanas, B) 12 semanas e C) 20 semanas.....	54
<b>Figura 8.</b> (A) Septos alveolares e bronquíolos dentro da normalidade. (B) Epitélio colunar alto. (C) Displasia discreta do epitélio colunar.....	57
<b>Figura 9.</b> (A) Histologia pulmonar normal. (B) Displasia do epitélio colunar. (C) Aumento na produção de muco.....	58
<b>Figura 10.</b> (A) Epitélio respiratório normal. (B) Displasia moderada. (C) Aumento da produção de muco.....	59

## SUMÁRIO

**Lista de figuras**

**Lista de gráficos**

**Resumo**

**Abstract**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1	Histórico.....	15
1.2	O Fungo.....	15
1.3	Epidemiologia.....	16
1.4	Imunopatogenia.....	17
1.5	Formas Clínicas.....	17
1.6	Efeitos do Tabagismo.....	19
1.7	Diagnóstico.....	21
1.8	Tratamento.....	21
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1	Objetivo Geral.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	Local do Estudo.....	28
4.2	Aspectos Éticos.....	28
4.3	Modelo Murino.....	28
4.4	Fungo.....	28
4.5	Inoculação.....	29
4.6	Padronização de Infecção Latente.....	29
4.7	Infecção Experimental.....	30
4.8	Método de Exposição à Fumaça de Cigarro.....	32
4.9	Carboxihemoglobina (COHb).....	33
4.10	Padronização da Exposição à Fumaça de Cigarro.....	34

4.11	Peso.....	34
4.12	Culturas Quantitativas.....	34
4.13	Histologia.....	35
4.14	Análise Estatística.....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
5.1	Padronização de Infecção Latente.....	38
5.1.1	Inoculação com $1 \times 10^6$ leveduras.....	38
5.1.2	Inoculação com $1 \times 10^5$ e $1 \times 10^4$ leveduras.....	38
5.1.3	Inoculação com $1 \times 10^3$ e $1 \times 10^2$ leveduras.....	40
5.2	Infecção Experimental.....	41
5.2.1	Carboxihemoglobina.....	41
5.2.2	Padronização e Verificação da Reprodutibilidade Experimental.....	42
5.2.2.1	Análise do grupo não exposto (NCS) à fumaça de cigarro.....	42
5.2.3	Análises entre o <u>grupo CS com 12 cigarros/exposição</u> e o grupo NCS.....	44
5.2.3.1	Peso.....	44
5.2.3.2	Culturas Quantitativas.....	45
5.2.3.3	Disseminação para baço e fígado.....	46
5.2.3.4	Histologia.....	46
5.2.4	Análises entre os <u>grupos CS com 16 cigarros/exposição</u> e o grupo NCS.....	50
5.2.4.1	Peso.....	50
5.2.4.2	Culturas Quantitativas.....	51
5.2.4.3	Disseminação para baço e fígado.....	52
5.2.4.4	Histologia.....	52
5.2.5	Alterações histológicas relacionadas ao tabaco no grupo controle.....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## RESUMO

Oliveira RB. *Efeito da exposição crônica à fumaça de cigarro em modelo experimental murino na reativação da paracoccidioomicose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2021.

A paracoccidioomicose é uma micose sistêmica, endêmica na América Latina, sendo o Brasil responsável por 80% dos casos descritos. A condição de portador crônico ou apenas infectado é muito mais frequente que o desenvolvimento da doença ativa, entretanto, os fatores que levariam ao desenvolvimento da doença ou a manutenção do estado de portador são ainda muito discutidos. Estudos epidemiológicos sobre a PCM buscam identificar fatores que levam o indivíduo infectado a manifestar a doença. A associação entre PCM e tabagismo pode ser observada nas séries de casos sobre paracoccidioomicose crônica, onde as amostras de paciente são compostas prioritariamente por pacientes fumantes ou ex-fumantes, ultrapassando 93%. Além disso, o tabagismo é considerado condição de risco preexistente e pode desempenhar um papel importante na transformação da infecção em doença ativa, uma vez que interfere com os mecanismos de defesa do hospedeiro e têm implicações na qualidade da formação de granulomas. Nesse contexto, a exposição à fumaça de cigarro poderia levar a reativação da paracoccidioomicose em sua forma latente em estudo com modelo experimental associando o tabagismo com a PCM. Em nosso estudo, padronizamos um modelo de infecção latente em camundongos C57BL/6 e posteriormente usamos esse modelo para avaliar a influência do tabagismo na reativação da PCM. Para tal, realizamos dois experimentos com 20 semanas de duração e com cargas tabágicas diferentes. Não encontramos diferenças significativa na evolução da doença ao expor os animais com uma carga tabágica de 12 cigarros/exposição. Ao utilizar 16 cigarros/exposição, observamos piora significativa na área ocupada pelos granulomas até 12 semanas de experimento. Entretanto os camundongos apresentaram uma redução gradual das lesões teciduais ao longo do tempo atingindo praticamente a mesma área total ocupada pelos granulomas quando comparado ao grupo não exposta na vigésima semana do experimento. Apesar de termos observado uma piora da doença em entre 4 e 12 semanas, essa alteração não foi mantida, com controle da doença com 20 semanas. Acreditamos que a nicotina presente no cigarro não seja o único determinante para a reativação da

PCM mas que sim, exerça uma influência importante em seu desenvolvimento associado a talvez outras causas relacionadas talvez ao hospedeiro ou mesmo ao agente infeccioso que ainda não foram elucidadas.

**Descritores:** Paracoccidiodomicose; Tabagismo; Infecção latente; Reativação; Fatores de risco.

## ABSTRACT

Oliveira RB. *Effect of chronic exposure to cigarette smoke in a murine experimental model on the reactivation of paracoccidioidomycosis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis endemic in Latin America, and Brazil is responsible for 80% of the cases described. Chronic or infected carriers' condition is much more frequent than the development of active disease. The factors that would lead to the development of the disease or the carrier status maintenance are not fully known. Epidemiological studies on PCM seek to identify factors that lead the infected individual to manifest the disease. The association between PCM and smoking can be seen in the case series of chronic PCM. The patient is composed primarily of smokers or ex-smokers, exceeding 93%. Also, smoking is considered a preexisting risk condition. It can play an important role in transforming the infection into an active disease since it interferes with the host's defense mechanisms and has implications for the quality of granuloma formation. In this context, exposure to cigarette smoke could lead to PCM's reactivation in its latent form in a study with an experimental model associating smoking with PCM. In our study, we standardized a latent infection model in C57BL/6 mice. We later used that model to assess the influence of smoking on PCM reactivation. For this, we carried out two experiments with 20 weeks duration and with different smoking quantities. We did not find significant differences in the disease's evolution when exposing the animals with a smoking load of 12 cigarettes/exposure. Using 16 cigarettes/exposure, we observed a significant worsening in the area occupied by granulomas up to 12 weeks of the experiment. However, the mice showed a gradual reduction in tissue lesions over time, reaching practically the same total area occupied by granulomas as the group not exposed with 20 weeks. Although we observed a worsening of the disease between 4 and 12 weeks, this change was not maintained. We believe that the nicotine present in cigarettes is not the only determinant for PCM's reactivation, but that it has a significant influence on its development associated with perhaps other causes related to the host or even to the infectious agent not yet elucidated.

**Descriptors:** Paracoccidioidomycosis; Cigarette smoke; Latent infection; Reactivation; Risk Factors.

## ***1 Introdução***

---

## 1.1 Histórico

A paracoccidioidomicose foi descrita pela primeira vez em 1908 pelo pesquisador brasileiro Adolfo Lutz, que isolou, a partir de uma lesão mucocutânea, um fungo de natureza dimórfica distinta do *Coccidioides immitis*, qualificando-a como micose pseudococcídica (1). Quatro anos depois, Alfonso Splendore descreveu novos casos dessa micose e classificou o agente etiológico da paracoccidioidomicose dentro do gênero *Zymonema*, propondo a denominação de *Zymonema brasiliensis* (2).

Em 1930, após diversos estudos, Floriano Paulo de Almeida, criou o gênero *Paracoccidioides* dentro do reino *Fungi*, revalidando também a espécie *brasiliensis*, criada por Splendore (3). Segundo Lacaz, com a observação e o relato de casos isolados da doença em outros países da América do Sul, a mesma passou a ser chamada de blastomicose sul-americana, doença de Lutz, doença de Lutz-Splendore-Almeida, pois Splendore foi o primeiro a cultivar o patógeno e Almeida, o autor do primeiro estudo abrangente sobre a doença (2). Porém, a oficialização do termo paracoccidioidomicose (PCM) foi estabelecida em 1971, na Organização Pan America de Saúde em Medellín, Colômbia, durante reunião de micologistas do continente americano, sendo mundialmente aceita desde então.

## 1.2 O Fungo

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* taxonomicamente encontra-se atualmente no Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis* (4). O uso de métodos moleculares mostrou que *P. brasiliensis* não é uma espécie única, mas sim um complexo de espécies de pelo menos três espécies crípticas: S1 (presente no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela); PS2 (do Brasil e da Venezuela) e PS3 (restrito a Colômbia) (5). Além disso, com base na elevada diversidade poligenética e características morfogenéticas exclusivas, uma espécie diferente, designada por *P.lutzi*, foi descrita (6).

Morfológicamente, *Paracoccidioides spp.* é um fungo termo-dimórfico que, em tecidos e cultura a 37°C aparece como células leveduriformes ovaladas de tamanho variável (6 - 40 µm), algumas das quais apresentam a característica aparência de "roda de leme" pelos mutibrotamentos da célula mãe rodeada por blastoconídeos. Essa fase, também conhecida como parasitária, permite

o diagnóstico da doença fúngica pela simples observação dessas estruturas em análise direta de tecidos (7, 8). Em baixas temperaturas (4° a 26°C) o fungo cresce na forma de micélio e visualizam-se hifas finas e septadas, produtoras de clamidoconídeos, e quando cultivados em meio mínimo o fungo produz propágulos assexuados, microconídios (< 5 µm), que são conhecidos como as formas propagantes inalatórias do fungo (9, 10).

### 1.3 Epidemiologia

A PCM é uma micose sistêmica, endêmica na América Latina, ocorrendo entre o México e a Argentina mais precisamente entre as latitudes 23°N e 34°S (9). É mais frequente na América do Sul sendo o Brasil responsável por 80% dos casos relatados, seguido de Colômbia, Venezuela, Argentina e Equador (8, 11). É interessante notar, que a PCM em qualquer país endêmico, não é distribuída de forma homogênea, preferindo certas regiões, onde, aparentemente as condições ambientais são favoráveis ao fungo. Casos de PCM são vistos principalmente em regiões com precipitação pluviométrica significativa, florestas abundantes e variação de temperatura entre 17-24°C (9).

O fato dessa doença não ser de notificação compulsória seja talvez a principal razão que a torne negligenciada no planejamento da saúde pública no Brasil, tornando difícil o estabelecimento de sua real prevalência e incidência (12). Acredita-se que em áreas endêmicas, a incidência anual alcance 1 a 3 casos novos / 100 mil habitantes ao ano (13). No entanto, a infecção assintomática ou latente por *Paracoccidioides* spp. têm sido demonstrada em praticamente todos os estados brasileiros por meio de testes cutâneos com paracoccidioidina, com reatividade média de 25 a 35% (14, 15).

Ainda do ponto de vista epidemiológico, a PCM é mais prevalente em adultos (responsáveis por 90% dos casos da doença), principalmente naqueles que exercem ou exerceram atividades agrícolas (8, 11). A infecção é prioritariamente adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com um pico de incidência entre 10 e 20 anos de idade. A evolução para doença, entretanto, é incomum nesse grupo, ocorrendo mais frequentemente em adultos entre 30 e 50 anos, como reativação de foco endógeno latente (13, 16). Nos adultos ela é mais comum em homens (relação 15:1), já na população infantil ela acomete igualmente meninos e meninas. Essa desigualdade de sexo tem sua gênese no fator estrogênico protetor, pois o fungo tem receptores para o 17-beta-estradiol e esse estrógeno dificulta a conversão fúngica de conídeos a levedura, o que explica a menor incidência em mulheres adultas (17, 18).

## 1.4 Imunopatogenia

A condição de portador crônico ou apenas infectado é muito mais frequente que o desenvolvimento da doença ativa, entretanto, os fatores que levariam ao desenvolvimento da doença ou a manutenção do estado de portador são ainda muito discutidos. Apesar de não existirem estudos epidemiológicos bem conduzidos, o risco de desenvolver a doença após a infecção por *Paracoccidioides* spp. é muito mais baixo do que após a aquisição de *M. tuberculosis*, agente de uma doença granulomatosa crônica, endêmica em regiões da América Latina (19).

O controle da infecção depende de resposta imune celular efetiva, geralmente associada ao padrão tipo 1 da resposta imunológica, caracterizado pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos T CD4+ e CD8+, resultando na formação de granulomas compactos. A organização desta resposta imune celular permite o controle da replicação do fungo, mas formas quiescentes podem persistir no interior do granuloma (13). Dessa forma, indivíduos saudáveis sensibilizados e estimulados produzem altos níveis de interleucina 2 (IL-2) e interleucina 10 (IL-10), além de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) refletindo em uma resposta imune efetiva (20). Em contraste, pacientes com a forma aguda/subaguda da doença produzem níveis baixos de IL-2, IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), com modulação negativa do padrão Th-1 de citocinas e expressão de altos níveis de citocinas relacionadas à resposta Th-2 como interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), IL10 e fator transformador do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ) além de anticorpos específicos da imunoglobulina E (IgE) e subclasses de IgG4 associados à eosinofilia local e periférica (19, 21). No entanto, aqueles com a forma crônica da doença apresentam uma tendência de resposta imunológica com modulação negativa no padrão de citocinas Th1, porém a polarização em direção a reatividade Th2 é raramente observada (19).

## 1.5 Formas Clínicas

Está hoje amplamente aceito que a infecção pelo *Paracoccidioides* spp. é adquirida através da inalação de propágulos fúngicos (9, 22). Após esse evento inicial, os indivíduos podem desenvolver sintomas pulmonares leves que não são diferenciados de outros agentes que causam pneumonia. As manifestações clínicas geralmente resolvem espontaneamente sem necessidade de intervenção médica; entretanto o fungo pode persistir de forma latente com o posterior

desenvolvimento de doença, através da reativação endógena, evento que pode coincidir com uma alteração do sistema imune do hospedeiro (23).

O estado de portador assintomático se comprova pelos achados de lesões calcificadas residuais com o fungo no interior em pulmões de indivíduos assintomáticos, além dos inquéritos com reatividade cutânea à paracoccidioidina ou à glicoproteína (gp) 43, provando a reação de hipersensibilidade em indivíduos saudáveis previamente sensibilizados (24).

Nas raras situações em que a infecção pulmonar primária supera a resposta imune do hospedeiro, este desenvolve a forma aguda/subaguda ou juvenil da doença. Esta forma de apresentação clínica é responsável por aproximadamente 10% dos casos da doença (8) predominando em crianças e adolescentes, mas pode acometer indivíduos até os 30 anos de idade (13). Esta forma clínica, afeta jovens de ambos os sexos e se distingue pelo curto período de incubação (25) e rápida evolução, em poucas semanas, disseminando-se por via linfo-hematogênica e envolvendo extensamente o sistema reticuloendotelial. É a forma mais grave da doença, com os indivíduos apresentando febre, perda de peso, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia e possível disfunção medular, além de anemia, eosinofilia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (9, 13).

A forma crônica ou forma do adulto caracteriza-se pela reativação do fungo presente em um foco quiescente dentro de um granuloma, ocorrendo mais tarde na vida do indivíduo e, na maioria dos casos, é considerada doença menos disseminada, porém com potencial maior de induzir sequelas fibróticas nos órgãos acometidos, principalmente no sistema respiratório (9, 13). Essa forma clínica de reativação corresponde por 90% dos casos de paracoccidioidomicose, é diagnosticada em adultos entre 30 e 60 anos e tem amplo predomínio no sexo masculino (15:1) (13, 26). Classicamente, pode-se diferenciar entre forma uni ou multifocal, acometendo os pulmões em 90% do total dos casos quando em associação com outros órgãos. Já na forma unifocal, acomete somente os pulmões em cerca de 25% dos casos (9, 27). As manifestações pulmonares são inespecíficas e incluem dispneia (34 a 72%), tosse (56 a 67%), produção de escarro (39%) e em menores proporções, hemoptise e dor torácica (8). É comum observar focos simultâneos de infecção em vários órgãos extrapulmonares como membranas mucosas, linfonodos, pele, glândulas supra-renais e menos frequentemente, sistema nervoso central (SNC) e ossos (9).

Na forma residual da PCM, normalmente e independentemente do órgão envolvido, a cura ocorre com formação de fibrose e as sequelas correspondentes podem permanentemente interferir com o bem-estar do paciente (28, 29). As lesões residuais mais frequentes e incapacitantes ocorrem nos pulmões seguidos das sequelas extrapulmonar como microstomia, disfonia e diversos graus de estenose da glote e traqueia (9, 30). Na maioria dos pacientes, o tratamento antifúngico específico controla as lesões extrapulmonares, no entanto, em 30% dos

pacientes que receberam um curso adequado de tratamento, a fibrose pulmonar aparecerá de novo ou consolidará, de tal modo que no final do período de tratamento, esta seqüela será documentada em mais de 50% dos casos. Devido a cicatriz fibrótica, 24% dos pacientes irão desenvolver cor pulmonale com hipoxemia secundária e hipertensão pulmonar (30).

## 1.6 Efeitos do Tabagismo

O tabagismo é considerado a principal causa de morte evitável no mundo (31). A prevalência do tabagismo na população brasileira foi abordada por Malta e colaboradores (32), que revelaram uma ampla variação da prevalência de tabagismo, com menor percentual (9,7%) em Maceió (AL) e maior (20,9%) em São Paulo (SP). O tabagismo está relacionado a uma maior morbimortalidade, e os fumantes adoecem 3,5 vezes mais que os não-fumantes (31). O impacto sobre a saúde decorrente do uso do tabaco é bem conhecido e vincula-se causalmente a vinte diferentes tipos de câncer, doenças respiratórias e cardiovasculares (33).

Entre as doenças infecciosas, diversas evidências coincidem ao considerar que fumar está associado a um aumento do risco de tuberculose, independentemente do desfecho da doença: infecção, doença clínica ou mortalidade (34-36). O tabagismo tem sido relatado como um fator de risco independente para a recaída da doença em estudos realizados no Sul da Índia (37) e no Brasil (38).

Estudos epidemiológicos sobre a paracoccidiodomicose, buscam identificar fatores que levam o indivíduo infectado a manifestar a doença. Entre os fatores desencadeantes da doença, têm sido citados o alcoolismo, desnutrição e doenças imunossupressoras, como a AIDS (31, 39, 40). A associação entre PCM e tabagismo pode ser observada nas séries de casos sobre paracoccidiodomicose crônica, onde as amostras de paciente são compostas prioritariamente por pacientes fumantes ou ex-fumantes. Em uma série de vinte casos com a forma crônica, todos os pacientes eram fumantes (41). Outros autores também relatam a presença do tabagismo entre os pacientes com a forma crônica da doença (42-44). Essa alta frequência de tabagismo entre pacientes com PCM, ultrapassa 93%, e parece ser um fator de risco para o desenvolvimento da micose (8). No único estudo controlado associando o tabagismo com a paracoccidiodomicose, foi demonstrado que a chance de desenvolver a doença é quatorze vezes maior em fumantes que em não fumantes, enquanto é 3,6 vezes maior em indivíduos que ingerem mais de 50g de álcool por dia do que nos abstêmios (31).

Os elementos do cigarro, bem como os tipos de exposição à sua fumaça, podem desempenhar funções importantes relativas à atividade imune. O cigarro é composto por 4.720

substâncias, que podem ser classificadas em 15 funções químicas diferentes (31).

O tabagismo é considerado condição de risco preexistente e pode desempenhar um papel importante na transformação da infecção em doença ativa, uma vez que interfere com os mecanismos de defesa do hospedeiro e têm implicações na qualidade da formação de granulomas (45).

Em 2000, o grupo de Kevin Tracey demonstrou que o sistema nervoso parassimpático, através do nervo vago, medeia uma das principais vias anti-inflamatórias (36). A via eferente acetilcolinérgica do nervo vago sinaliza para os tecidos periféricos via receptores nicotínicos da acetilcolina interrompendo a produção de citocinas pró-inflamatórias, pelos macrófagos, tais como TNF- $\alpha$ , sem afetar a liberação de IL-10 (citocina anti-inflamatória) (46). Subsequentemente, o mesmo grupo mostrou que a acetilcolina liberada a partir do nervo vago eferentes atua sobre um tipo específico de receptor nicotínico da acetilcolina ( $\alpha$ -7), que é expresso em níveis elevados em macrófagos alveolares. Por conseguinte, a nicotina (potente agonista do receptor  $\alpha$ -7) no fumo do tabaco acomete a principal via efetora final desse mecanismo anti-inflamatório fisiológico explicando o efeito imunomodulador do cigarro (47). A maioria dos estudos considerando a inibição inflamatória colinérgica tem sido realizada em experimentos in vitro ou em modelo murino, portanto a relevância dessa imunomodulação em humanos permanece incerta (48).

No contexto das doenças granulomatosas como a tuberculose e a paracoccidiodomicose, o papel crítico do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento do granuloma tem sido sugerido por estudos com camundongos deficientes em TNF- $\alpha$  que após a inoculação de micobactéria não conseguem formar granulomas efetivos e rapidamente sucumbem para doença miliar (47). Um elegante estudo experimental de exposição à fumaça de cigarro com posterior infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos C57BL/6, demonstrou pela primeira vez, um aumento significativo no número de isolados de *M.tuberculosis* viáveis no pulmão e baço dos camundongos expostos à fumaça de cigarro, além de uma supressão intracelular do nível de TNF- $\alpha$  e IL-12 e aumento na produção de IL-10 (49).

Dessa forma, concentração alta de nicotina nos pulmões dos fumantes pode reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  e de outras citocinas pró-inflamatórias através da ativação do receptor  $\alpha$ -7 e impedir a contenção granulomatosa da tuberculose e predispor para a doença ativa (50). Apesar de alguns componentes do cigarro possuir propriedades imunossupressoras que podem estar implicados no aumento da susceptibilidade a PCM, essa associação ainda não foi descrita na literatura.

## 1.7 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da PCM é estabelecido pela demonstração microscópica direta do *Paracoccidioides* spp. a partir de exame a fresco, biópsia ou exame histopatológico e confirmado por isolamento e identificação do fungo por cultivo, ou então, indiretamente, por técnicas sorológicas ou métodos moleculares. É essencial entender os usos e limitações de métodos de diagnóstico para que o tratamento específico pode ser iniciado o mais cedo possível (8).

As leveduras do *Paracoccidioides* spp. podem ser facilmente recuperadas de raspado de lesões cutâneas, secreções do trato respiratório ou punções ganglionares, com a imediata visualização ao microscópio ótico das formas fúngicas características após a clarificação dos materiais com solução de KOH (8).

Na PCM, como em outras micoses, o diagnóstico considerado padrão-ouro é o isolamento do agente etiológico em cultura, porém o exame é positivo em apenas 85% dos casos e necessita de 20 a 30 dias para que o crescimento ocorra (13).

Nos casos em que a biópsia tecidual é realizada, o quadro histopatológico é tipicamente de doença granulomatosa com células epitelióides, com o fungo no seu interior ou livre nos tecidos. Colorações especiais como o Gomori-Grocott ou ácido periódico de Schiff podem auxiliar na pesquisa do agente etiológico (13).

As provas sorológicas específicas têm importância não apenas no auxílio diagnóstico como, particularmente, para permitir avaliação da resposta do hospedeiro ao tratamento específico. Atualmente, são disponíveis em diferentes serviços de referência os métodos de imunodifusão dupla (ID), contraimuno eletroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (IB). Estes testes apresentam sensibilidade entre 85% e 100% e especificidade entre 85% a valores próximos de 100%, na dependência da técnica utilizada (13, 45).

## 1.8 Tratamento

Os principais desafios terapêuticos no tratamento da PCM são os longos períodos de tratamento e a alta frequência de recidivas e sequelas (particularmente a fibrose pulmonar) (51). Além da terapêutica antifúngica específica, o manejo terapêutico da PCM deve obrigatoriamente incluir medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes

órgãos pela micose (13). Um grande arsenal terapêutico está disponível para os pacientes com PCM, incluindo derivados de sulfonamidas, anfotericina B e azólicos (51).

Atualmente, apesar da limitação das informações disponíveis em estudos comparativos com diferentes esquemas terapêuticos, o itraconazol é considerado o tratamento de escolha para as formas clínicas leves e moderados da PCM (52). Nas formas graves ou disseminados, em pacientes com intolerância a outros agentes ou com infecção refratária, é indicado uma formulação intravenosa de antifúngico, com anfotericina B convencional ou lipídica. Para evitar recaídas, os pacientes que foram tratados com anfotericina B devem receber terapia de manutenção por longos períodos, tanto com sulfonamidas ou itraconazol (51). O voriconazol, um antifúngico triazólico de segunda geração, apresenta boa penetração no sistema nervoso central, sendo indicado na terapêutica da neuro-PCM (13).

Todos os pacientes devem permanecer em tratamento até a resolução dos sinais e sintomas clínicos da infecção, depuração completa de elementos fúngicos, com uma diminuição significativa e estabilização nos títulos de anticorpos(13, 30).

## ***2 Justificativa***

---

Estudos buscam identificar fatores que levam o indivíduo infectado com *Paracoccidioides* spp. a manifestar a doença. Acredita-se que fatores de risco externos podem participar no desenvolvimento da doença, tanto por sua ação direta sobre o trato respiratório como por atuação na imunidade mediada por células.

Apesar das menções feitas por diversos autores sobre a associação epidemiológica entre tabagismo e PCM não encontramos qualquer estudo em modelo experimental associando o tabagismo com a paracoccidioidomicose. A evidência atual demonstra que alguns componentes do cigarro possuem propriedades imunossupressoras que podem estar implicados no aumento da susceptibilidade a PCM, porém essa associação ainda não foi descrita na literatura.

Nesse contexto, a exposição à fumaça de cigarro poderia levar a reativação da paracoccidioidomicose em sua forma latente provavelmente pelo efeito da nicotina na inibição da liberação de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, porém sem alterar a secreção de IL-10 (46) dessa forma interferindo com os mecanismos de defesa do hospedeiro. Apesar de alguns componentes do cigarro possuírem propriedades imunossupressoras que podem estar implicados no aumento da susceptibilidade a PCM, essa associação ainda não foi descrita na literatura.

Infelizmente não é possível avaliar separadamente indivíduos tabagistas com não tabagistas devido à alta frequência de tabagismo entre pacientes com PCM. Dessa forma, estudo sobre a influência do tabagismo em modelos experimentais de PCM que avaliem o impacto da nicotina se faz necessários para o melhor entendimento dessa afecção.

Finalmente, o conhecimento dessa provável associação encontrada na reativação da doença é mais uma ferramenta na prevenção e tratamento da paracoccidioidomicose, inclusive com o incentivo e oferta de tratamento específico para a dependência à nicotina aos pacientes acometidos por essa doença.

**3 Objetivos**

---

### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar os efeitos do tabagismo como causa associada à reativação da paracoccidiodomicose em um modelo experimental de paracoccidiodomicose em camundongos C57BL/6.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) Padronização de um modelo animal de infecção latente por paracoccidiodomicose.
- b) Caracterização do processo de reativação da PCM por meio do aumento gradual na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) entre camundongos infectados expostos ou não à fumaça de cigarro.
- c) Descrever as alterações e diferenças histológicas associadas ao aumento no número e na área acometida pelos granulomas observados no tecido pulmonar após a exposição à fumaça de cigarro no modelo experimental.

## ***4 Material e Métodos***

---

#### **4.1 Local do Estudo**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica de Micologia Médica (LIM 53) e no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

#### **4.2 Aspectos Éticos**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo sob número CPE-IMT/169. O projeto também foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 066/17.

#### **4.3 Modelo Murino**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, isogênicos, adultos (6-8 semanas de idade) e com peso entre 20 e 25 gramas. Os animais foram criados em condições livres de patógenos específicos (SPF) e receberam água acidificada e alimentos esterilizados no biotério da FMUSP. No biotério de experimentação do IMT, os animais permaneceram na área SPF durante as 3 primeiras semanas e posteriormente foram transferidos para área convencional do biotério.

#### **4.4 Fungo**

Foi utilizado o isolado Pb 18 do *P.brasiliensis*, que é altamente virulento, em sua forma leveduriforme (53, 54). A perda da virulência foi evitada por meio do reisolamento da amostra de Pb 18 após oito semanas de infecção em camundongos C57BL/6. O fungo foi mantido por repiques semanais em meio semi-sólido de Fava Netto (55) a 36°C.

Para a preparação do inóculo, o fungo foi cultivado em meio semi-sólido de Fava Netto à temperatura de 36°C por 6 a 7 dias, tempo em que apresenta máximo crescimento e viabilidade (53). As células leveduriformes foram recolhidas e lavadas por três vezes em solução PBS estéril por centrifugação (3000 rpm/10min). Após essa etapa, foi adicionado 30 ml de PBS e o sobrenadante (suspensão das leveduras) foi recolhido (20ml) com uma seringa.

O sobrenadante foi passado por agulha fina, tipo tuberculina para desfazer os grumos e evitar embolização dos bronquíolos. A suspensão final foi ajustada para conter a quantidade desejada de células viáveis do fungo, em 50 µL de PBS pela contagem em câmara hemocitométrica. A viabilidade foi determinada pelo corante azul de trypan. A inoculação foi realizada após verificação da viabilidade da suspensão fúngica entre 90 e 95%.

#### **4.5 Inoculação**

Os camundongos foram anestesiados com xilazina 2% (10mg/kg) e cetamina 10% (80mg/kg) em uma solução a 0,4% pela via intraperitoneal. Os animais foram mantidos em uma pequena placa e foram infectadas com a quantidade desejada de células fúngicas (Pb 18), de acordo com o experimento, por meio da inoculação cirúrgica intratraqueal. Para isso, uma pequena incisão foi realizada na pele ao longo da traqueia e o tecido subjacente separado. Uma agulha de calibre 30 ligada a uma seringa de tuberculina foi inserida em paralelo com a traqueia, e 50 µL de inóculo dispensado nos pulmões. A pele foi suturada e os camundongos se recuperaram sob uma lâmpada de calor (56).

#### **4.6 Padronização de Infecção Latente**

Primeiramente, foi realizado a padronização da quantidade do inóculo de Pb18 necessário para mimetizar uma infecção “latente” de PCM por meio da ausência de progressão da doença em modelo murino. Sendo assim, cinco preparações de inóculos com diferentes quantidades de leveduras ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ) foram preparados e inoculados em 5 grupos contendo 18 animais cada.

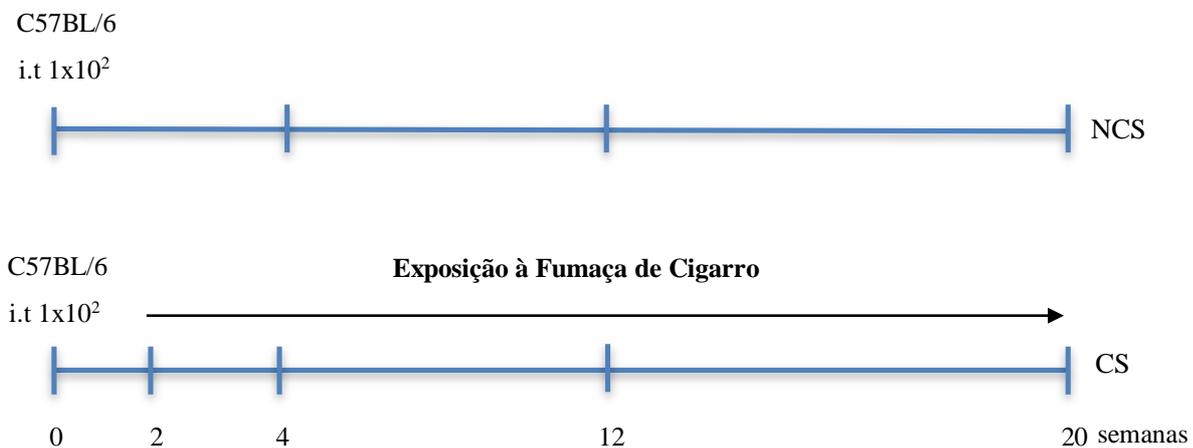
Concluímos que a dose mais baixa para gerar infecção “latente” foi de  $1 \times 10^2$  pois a contagem na cultura das unidades formadoras de colônias permaneceu estável, assim como observamos um acometimento inferior a 25% de área acometida por granulomas na avaliação

histológica ao longo do tempo. Além dessas observações, todos os camundongos desse grupo permaneceram vivos e com aspecto saudável durante todo o experimento. Os gráficos foram apresentados na seção de resultados.

#### 4.7 Infecção Experimental

##### a) Grupos Experimentais

Após determinar a dose de inóculo necessária, foi realizada a inoculação cirúrgica intratraqueal de  $1 \times 10^2$  células fúngicas (Pb 18) em dois grupos de camundongos C57BL/6. Um grupo não foi exposto à fumaça de cigarro (NCS) e o outro grupo foi exposto à fumaça de cigarro (CS) a partir da 2ª semana após a inoculação.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo do experimento.

**Legenda:** Foram realizados 4 experimentos independentes. Nos dois primeiros experimentos foram utilizados 12 cigarros sem filtro por exposição à fumaça de cigarro e nos dois últimos experimentos foram utilizados 16 cigarros sem filtro por exposição à fumaça de cigarro.

No total, foram realizadas duas séries de experimento. Tanto na primeira como na segunda série foram realizados 2 experimentos independentes. Em cada experimento independente, foram formados dois grupos com 18 camundongos C57BL/6 cada.

Na primeira série de experimentos, um grupo de camundongos foi exposto à fumaça de cigarro durante duas sessões de 90 minutos por dia e cinco dias por semana. Foram utilizados 12 cigarros sem filtro para cada sessão de exposição.

Na segunda série de experimentos, um grupo de camundongos foi exposto à fumaça de cigarro durante duas sessões de 120 minutos por dia e cinco dias por semana. Foram utilizados 16 cigarros sem filtro para cada sessão de exposição.

Nas duas séries de experimentos, cada cigarro foi aceso a cada 7 minutos e 30 segundos e todos os experimentos tiveram um grupo não exposto à fumaça de cigarro (NCS) correspondente.

Em todos os experimentos, o grupo exposto à fumaça de cigarro (CS) foi submetido inicialmente a um protocolo de aclimatização, sendo exposto à fumaça de cigarro no primeiro dia por duas sessões de exposição de 30 minutos (4 cigarros/exposição); no segundo dia por duas sessões de 60 minutos (8 cigarros/exposição); e a partir do terceiro dia, a exposição foi realizada com duas sessões de 90 minutos (12 cigarros/exposição). Na segunda série de experimentos, a partir do quarto dia, foi realizado duas sessões de 120 minutos (16 cigarros/exposição).

O grupo não exposto à fumaça de cigarro (NCS) foi acondicionado em uma sala na área convencional do biotério separada da sala onde a exposição ao cigarro acontecia. Estes animais não entraram em contato com a fumaça de cigarro durante todo o experimento, saindo desta área somente nos dias de eutanásia.

Na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana, 6 camundongos de cada grupo foram eutanasiados em câmara de monóxido de carbono (CO) para o estudo histológico e quantificação de culturas em tecidos.

## **b) Controle**

O controle foi composto de 12 camundongos e divididos em dois grupos de 6 camundongos. Um grupo composto por 6 animais foi exposto apenas à fumaça de cigarro gerada por 16 cigarros/exposição após duas semanas da inoculação de PBS. O outro grupo não foi exposto à fumaça de cigarro após inoculação de PBS. Na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana, 2 camundongos de cada grupo foram eutanasiados em câmara de monóxido de carbono (CO) para o estudo histológico em tecido pulmonar.

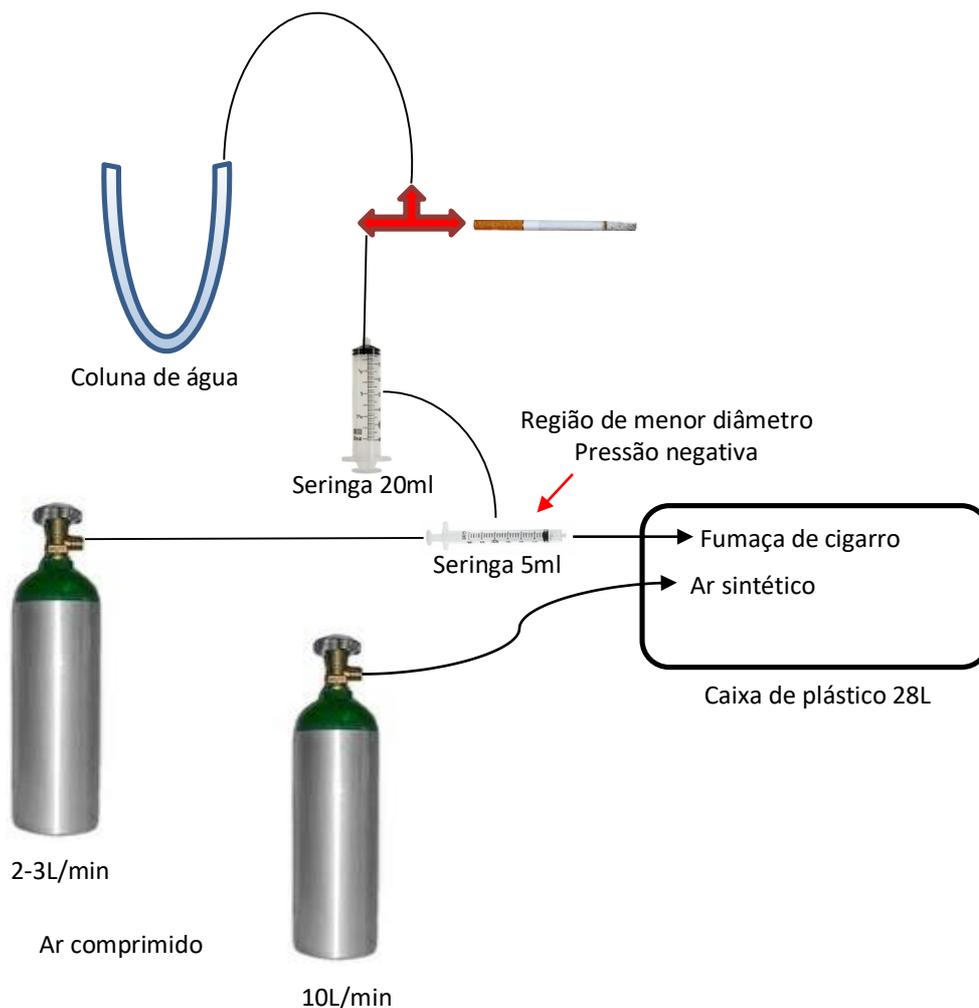
#### 4.8 Método de Exposição à Fumaça de Cigarro

Para a exposição à fumaça de cigarro foi utilizado um protocolo modificado de Biselli et al. (2011) descrito e padronizado por Hizume e colaboradores na FMUSP (57, 58). A exposição foi realizada em uma caixa de plástico de 28 L, no interior de uma capela de exaustão. O interior da caixa foi dividido em 8 baias de metal, sendo que cada gaiola de camundongo (5-6 animais), foi alocada em diferentes baias de forma rotativa, diariamente, para que a exposição à fumaça de cigarro fosse mais homogênea. A baia de número 8 não acomodou nenhum camundongo durante todo o experimento, pois esta foi utilizada para a entrada de ar sintético e para a entrada da fumaça de cigarro.

O fluxo na entrada de ar sintético foi controlado por um fluxômetro conectado a um torpedo de ar comprimido e mantido em 10L/min. A segunda entrada da caixa recebeu uma mistura de ar sintético e fumaça de cigarro, que foi aspirada por um sistema de Venturi conectado a um cigarro sem filtro aceso.

O sistema Venturi, é composto por uma tubulação conectada a uma coluna de água e a um torpedo de ar comprimido. O fluxo laminar de ar sintético passa por uma região de menor diâmetro, sendo acelerado, com conseqüente redução da pressão neste ponto (efeito Venturi), permitindo a aspiração da fumaça do cigarro. A redução na pressão que ocorre no ponto de redução do diâmetro do tubo é dependente do fluxo de ar mantido no torpedo de ar comprimido.

Deste modo, com o controle do fluxo de ar sintético na segunda entrada, a quantidade de fumaça de cigarro que foi aspirada para a tubulação e enviada para o interior da caixa foi igualmente supervisionada. Isto permitiu regular a concentração de monóxido de carbono (CO) mantida na caixa e conseqüentemente o nível sanguíneo de carboxihemoglobina nos camundongos (57). O cigarro utilizado foi o da marca Derby Vermelho Sol (Souza Cruz), pois sua composição 0,8mg nicotina/cigarro é a que mais se assemelha aos cigarros experimentais 3R4F de referência desenvolvidos pela Universidade de Kentucky, EUA (0,73mg de nicotina/cigarro).



**Figura 2.** Esquema ilustrativo do sistema Venturi

**Legenda:** O fluxo de ar comprimido passa por uma região de menor diâmetro, neste ponto há uma redução na pressão, que gera um desnível na coluna de água e aspira a fumaça de cigarro para dentro do sistema Venturi. A fumaça de cigarro, passa pela seringa de 20ml, chega na seringa de 5ml e é desviada para a caixa de plástico com os camundongos. O outro cilindro é conectado diretamente na caixa e aberto com um fluxo mantido de 10L/min para homogeneizar o ar dentro da caixa.

#### 4.9 Carboxihemoglobina (COHb)

O controle da exposição à fumaça de cigarro foi realizado na 4ª, 12ª e 20ª semana de experimento por meio da medida da COHb. Após o término das sessões de exposição à fumaça do cigarro, 2 animais foram anestesiados e submetidos à retirada de sangue do plexo ocular

(500 $\mu$ cl) com auxílio de um capilar. A medida da COHb foi realizada no aparelho Radiometer ABL800 Flex em até 20 minutos após a coleta do sangue. O nível alvo de COHb desejado foi de 10-15% após a primeira exposição baseado nos níveis encontrados em indivíduos fumantes moderados (59).

#### **4.10 Padronização da Exposição à Fumaça de Cigarro**

Com o objetivo de determinar a quantidade de cigarro a cada 30 minutos, assim como o fluxo de entrada de ar sintético para se obter um nível de COHb entre 10-15% após a primeira exposição., realizamos um projeto piloto utilizando 3 animais. No primeiro teste foram utilizados 24 cigarros (8 cigarros/30min) com o fluxo ajustado para 6L/min. Obtivemos um valor de 60% de COHb. No segundo teste a quantidade de cigarros utilizados foi reduzida pela metade (12 cigarros ou 4 cigarros/30min) e o fluxo continuou ajustado em 6L/min. Nestas condições, atingiu-se o valor da COHb de 20%. Por fim, foi realizada outra medição de COHb com o fluxo de 10L/min e mantida a quantidade de cigarros, desta vez sendo obtido um valor 15% de COHb. Dessa forma estabelecemos usar 4 cigarros a cada 30 min, com um intervalo entre cada cigarro de 7 minutos e 30 segundos e associado a um fluxo contínuo de ar comprimido de 10L/minuto.

#### **4.11 Peso**

Em todos os experimentos, após as eutanásias em câmara de monóxido de carbono (CO), tanto os camundongos do CS como do grupo NCS foram pesados na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana,

#### **4.12 Culturas Quantitativas**

A determinação do número de microorganismos viáveis em diferentes órgãos dos animais infectados foi realizada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O pulmão direito e esquerdo, baço e fígado foram removidos dos camundongos sob condições assépticas, pesados e homogeneizados em 2 ml de PBS estéril. Os homogenatos dos tecidos foram diluídos em série (1:50 e 1:100) e plaqueados em meio Brain Heart Infusion (BHI)

suplementado com 4% (vol/vol) de soro bovino e 5% de filtrado de cultura do isolado 192 do *P. brasiliensis*, streptomocina/penicilina 10 IU ml<sup>-1</sup> e cicloheximida 500 µg ml<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 36°C, e o número (log<sub>10</sub>) de colônias de *P. brasiliensis* viáveis por grama de tecido foram contadas a cada 5 dias durante 15 dias.

#### **4.13 Histologia**

O pulmão direito e esquerdo dos camundongos foi ressecado e fixado em 10% de formalina tamponada com fosfato. Foram realizados cortes longitudinais dos pulmões. As preparações histopatológicas foram coradas com hematoxilina e eosina para o estudo das lesões teciduais, resposta inflamatória e das alterações relacionadas à exposição a fumaça de cigarro.

##### **a) Determinação das Lesões Teciduais**

Para quantificação das lesões teciduais utilizamos o programa Axio vision release 4.8.2 SP3. Consideramos a área ocupada pelos granulomas em 20 campos microscópicos com um aumento de 10X. Os valores foram expressos em µm<sup>2</sup>. A quantidade de lesões granulomatosas foram quantificadas em todo corte histológico longitudinal presente no tecido.

Os granulomas foram descritos como compacto e frouxo. Os granulomas compactos consistem em anéis concêntricos de monócitos, linfócitos e células mononucleares grandes (epitelióide) dispostos em forma paliçada ocupando o centro das lesões. Em contrapartida os granulomas frouxos possuem bordas indefinidas e são caracterizados pela presença de pequenos grupos de células epitelióides dispersas, bem como por um número variável de células gigantes (60).

#### **4.14 Análise Estatística**

A estatística descritiva dos dados foi feita por medidas de tendência central e dispersão: médias e desvios-padrão. Os gráficos foram construídos utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e os resultados foram apresentados pela

média e erro padrão.

As variáveis analisadas contra a exposição à fumaça de cigarro (ausência de exposição - NCS, 12cigarros/exposição e 16 cigarros/exposição) e tempo de acompanhamento dos animais durante o experimento (4, 12 e 20 semanas) foram as seguintes: peso, UFC, área acometida pelos granulomas (quantitativas contínuas) e quantidade de granulomas (quantitativa discreta). Foram utilizados o teste t de *Student*, ANOVA de um fator e Modelo Linear Geral para as variáveis quantitativas contínuas ou com distribuição normal, e o teste de Kruskal-Wallis para variáveis que não tenham distribuição normal. O nível de significância estatístico adotado foi de 0,05.

## ***5 Resultados***

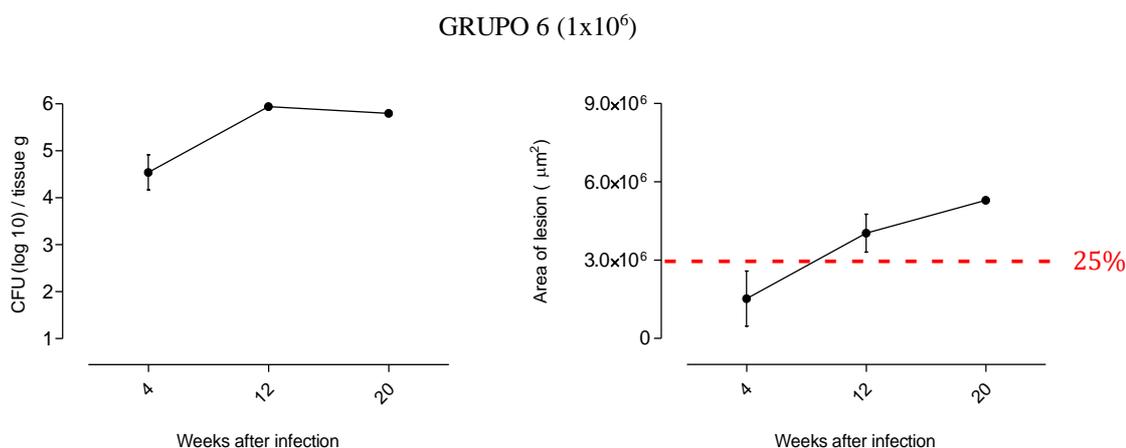
---

## 5.1 Padronização de Infecção Latente

### 5.1.1 Inoculação com $1 \times 10^6$ leveduras

No grupo 6 em que foi realizado o experimento com inóculo de  $1 \times 10^6$  leveduras, observamos uma infecção progressiva, traduzida tanto pelo aumento das unidades formadoras de colônia ao longo do tempo e pelo acometimento da área acometida pelos granulomas, atingindo um valor superior a 25% da área total do pulmão com 12 semanas (**Gráfico 1**).

**Gráfico 1.** Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com  $1 \times 10^6$  leveduras de Pb 18.



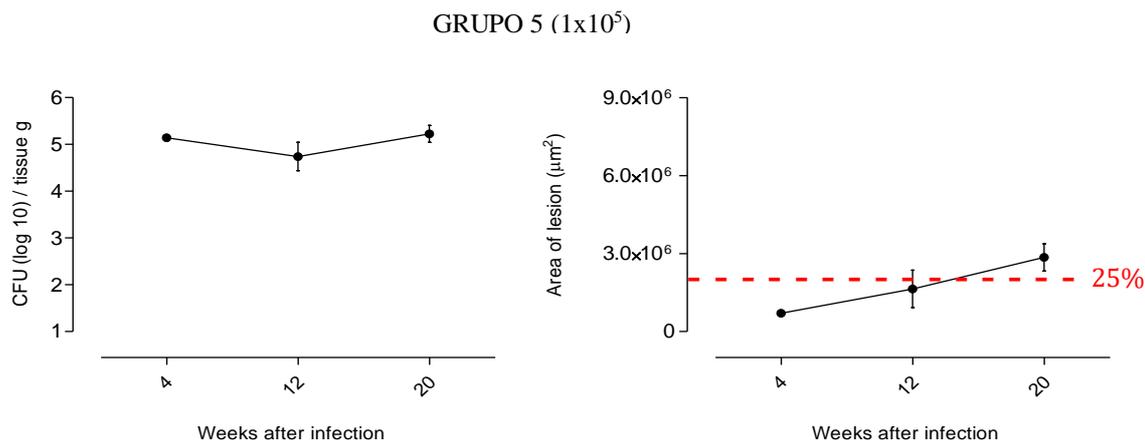
**Legenda:** A) Aumento das UFC, permanecendo em torno de 5 – 6 log10 até a 20 semana. B) Aumento da área média acometida pelos granulomas acima de 25% na 12 semana e atingindo quase 50% na 20 semana.

### 5.1.2 Inoculação com $1 \times 10^5$ e $1 \times 10^4$ leveduras

Tanto no grupo 5 ( $1 \times 10^5$ ) como o grupo 4 ( $1 \times 10^4$ ), os camundongos apresentaram um comportamento semelhante frente a infecção por Pb18. Em ambos, a infecção se mostrou progressiva, devido ao alto valor das unidades formadoras de colônia ao longo do tempo (5 – 6

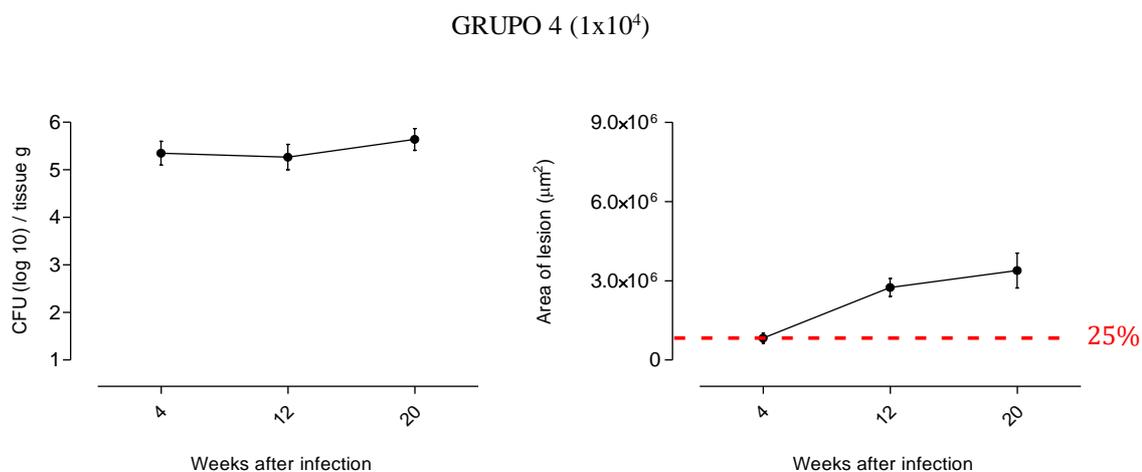
log<sub>10</sub>) e pelo aumento da área média acometida pelos granulomas atingindo  $\geq 25\%$  em ambos os experimentos (**Gráfico 2 e 3**).

**Gráfico 2.** Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com  $1 \times 10^5$  leveduras de Pb 18.



**Legenda:** A) UFC permanecendo em torno de 5 – 6 log<sub>10</sub> até a 20 semana. B) Aumento da área média acometida pelos granulomas até 12 semana e atingindo 25% na 20 semana.

**Gráfico 3.** Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com  $1 \times 10^4$  leveduras de Pb 18.

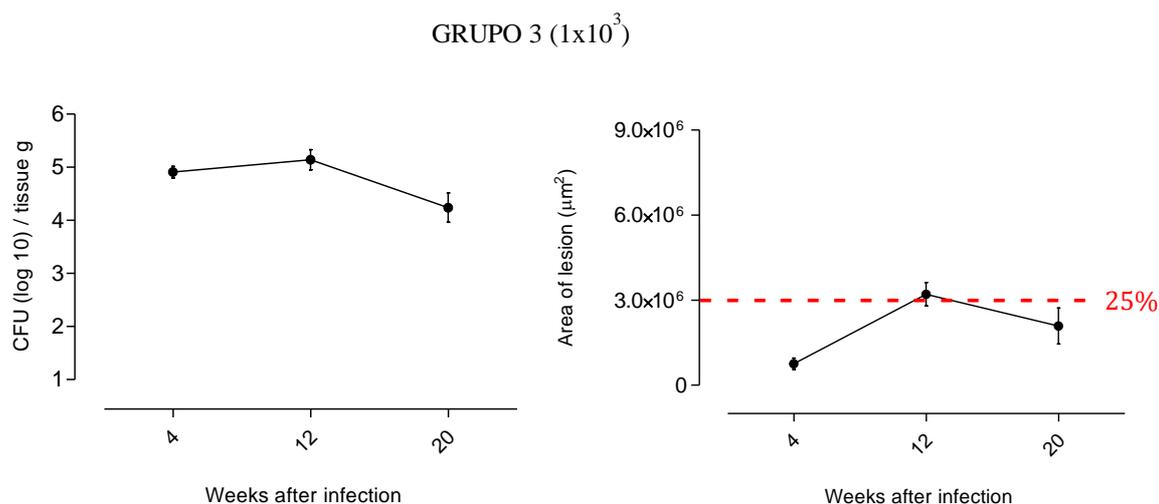


**Legenda:** A) UFC permanecendo em torno de 5 – 6 log<sub>10</sub> até a 20 semana. B) Aumento da área média acometida pelos granulomas atingindo 25% na 12 semana e acima deste valor na 20 semana.

### 5.1.3 Inoculação com $1 \times 10^3$ e $1 \times 10^2$ leveduras

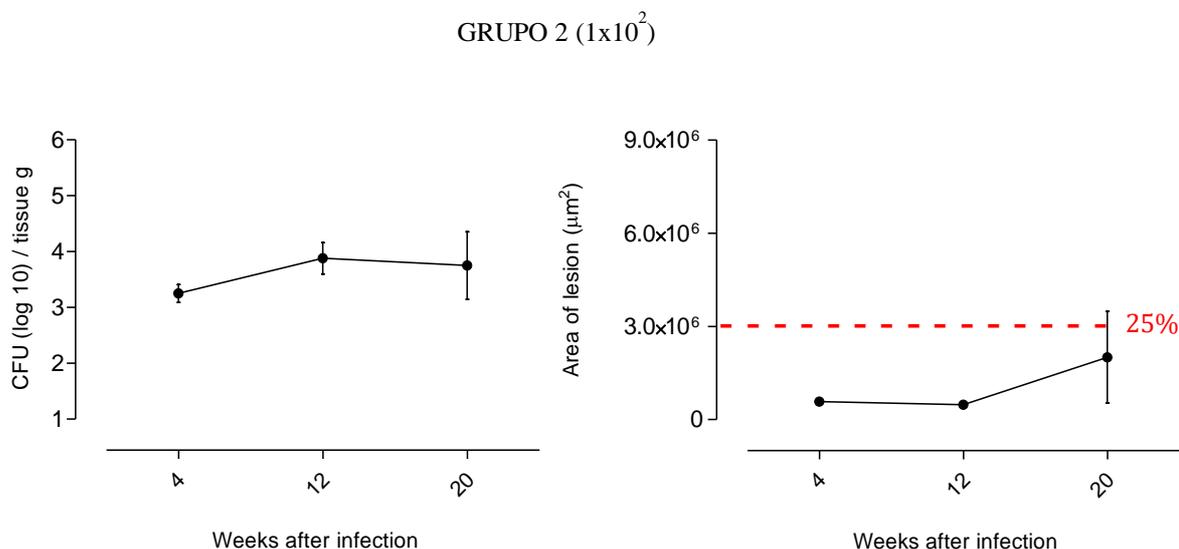
Apesar do grupo 3 ( $1 \times 10^3$ ) ter apresentado um menor valor nas unidades formadoras de colônia ao longo do tempo, permaneceram entre ( $5 - 4 \log_{10}$ ) enquanto no grupo 2 ( $1 \times 10^2$ ) as UFC permaneceram entre ( $3 - 4 \log_{10}$ ) durante todo o experimento. Em relação a área média ocupada pelos granulomas, observamos que no experimento com  $1 \times 10^3$  leveduras, com 12 semanas, 25% da área pulmonar estava acometida diferentemente do grupo 2 que área média acometida pelos granulomas durante todo experimento foi inferior a 25% (**Gráfico 4 e 5**).

**Gráfico 4.** Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com  $1 \times 10^3$  leveduras de Pb 18.



**Legenda:** A) UFC permanecendo em torno de  $5 - 4 \log_{10}$  até a 20 semana. B) Aumento da área média acometida pelos granulomas atingindo 25% nas 12 semanas.

**Gráfico 5.** Unidades formadoras de colônias e área acometida pelos granulomas em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com  $1 \times 10^2$  leveduras de Pb 18.



**Legenda:** A) UFC permanecendo em torno de 3 – 4 log10 até a 20 semana. B) área média acometida pelos granulomas inferior a 25% até a 20 semana.

Dessa forma, concluímos que a dose mais baixa para gerar infecção “latente” foi de 100 leveduras pois durante todo o experimento a contagem de UFC permaneceu estável e com menos de 25% de área média acometida por granulomas na avaliação histológica. Importante notar que todos os camundongos deste grupo permaneceram vivos e com aspecto saudável durante todo o experimento. Em todos os outros grupos tivemos perdas de animais durante o período experimental.

## 5.2 Infecção Experimental

### 5.2.1 Carboxihemoglobina

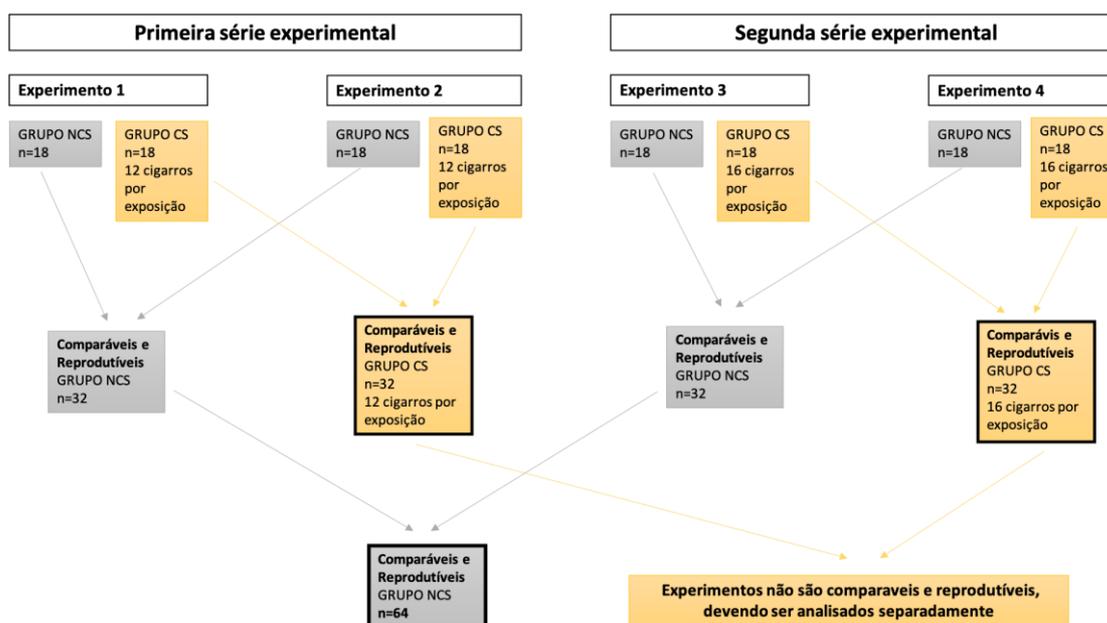
Durante os experimentos realizados com 12 cigarros/exposição, obtivemos um nível médio de COHb medido nos dias da eutanásia de 13,1%, (mín – máx, 7,8% - 17,3%). O grupo não exposto apresentou um nível médio de COHb de 1,4% (mín – máx, 1,1% - 2,2%). Após

aumentar a quantidade de cigarros para 16/exposição, obtivemos um nível médio de COHb de 15,7%, (mín – máx, 6,3% - 24%). O grupo não exposto apresentou um nível médio de COHb de 0,7% (mín – máx, 0% - 2%).

### 5.2.2 Padronização e Verificação da Reprodutibilidade Experimental

No modelo linear geral, comparamos as variáveis UFC, área e peso entre os grupos NCS e tempo de experimento. Não encontramos diferenças entre os grupos de cada série experimental assim como, não houve diferença entre os grupos não expostos das diferentes séries. Sendo assim, assumimos que os grupos controles das duas series de experimentos são comparáveis e reprodutíveis, justificando a unificação em apenas um grupo experimental para realizar as análises específicas em comparação com os grupos expostos (CS) com 12 cigarros e com 16 cigarros/exposição.

A mesma análise foi realizada para os grupos CS, porém foi observado diferença significativa na análise conjunta do grupo e tempo em relação ao peso dos animais, demonstrando a influência do aumento da carga tabágica na perda de peso ( $p=0,006$ ). Dessa forma, como esperado, por diferença na intervenção (12 vs. 16 cigarros) os grupos CS não são reprodutíveis o que não justifica sua unificação em apenas um grupo experimental (**Figura 3**).

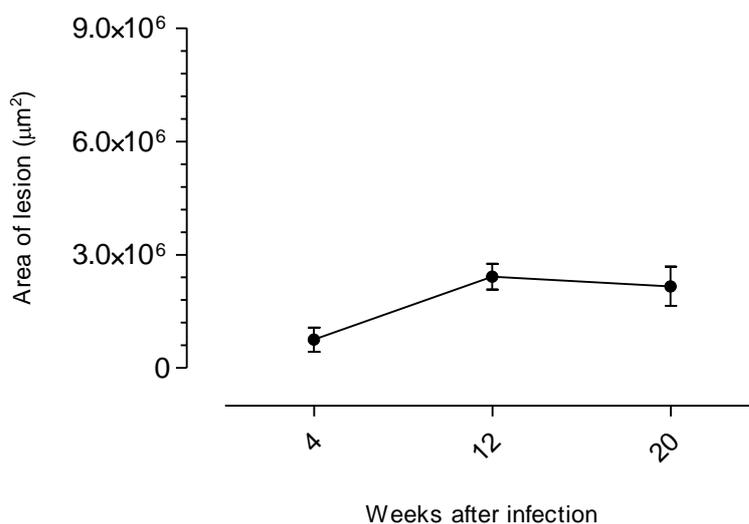


**Figura 3.** Fluxograma das duas series experimentais realizadas e verificação da reprodutibilidade dos experimentos.

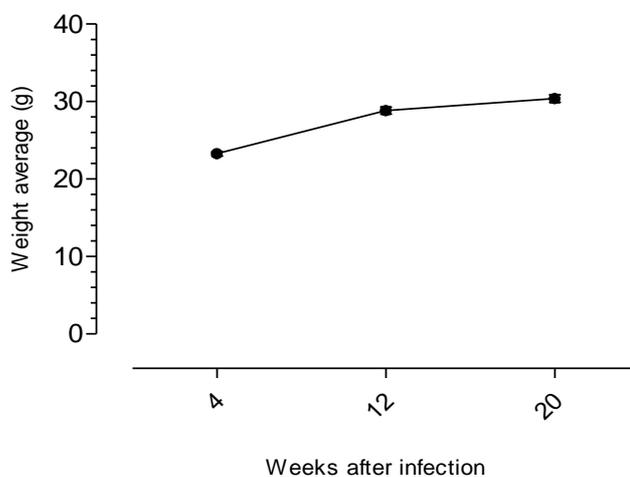
### 5.2.2.1 Análise do grupo não exposto (NCS) à fumaça de cigarro.

Em relação ao tempo, o grupo NCS apresentou uma área significativamente menor no tempo 4 ( $p=0,012$ ) quando comparado com o tempo 12 e 20 demonstrando uma progressão inicial da doença e sua estabilização posterior (**Gráfico 6**). Não foi visto diferença para as UFC. Observamos uma diferença significativa em no peso dos camundongos em todos os tempos experimentais ( $p=0,000$ ), devido ao crescimento esperado destes animais não expostos a fumaça de cigarro apesar da infecção por Pb 18 (**Gráfico 7**).

**Gráfico 6.** Área ocupada pelos granulomas ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça



**Gráfico 7.** Peso médio dos camundongos ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça



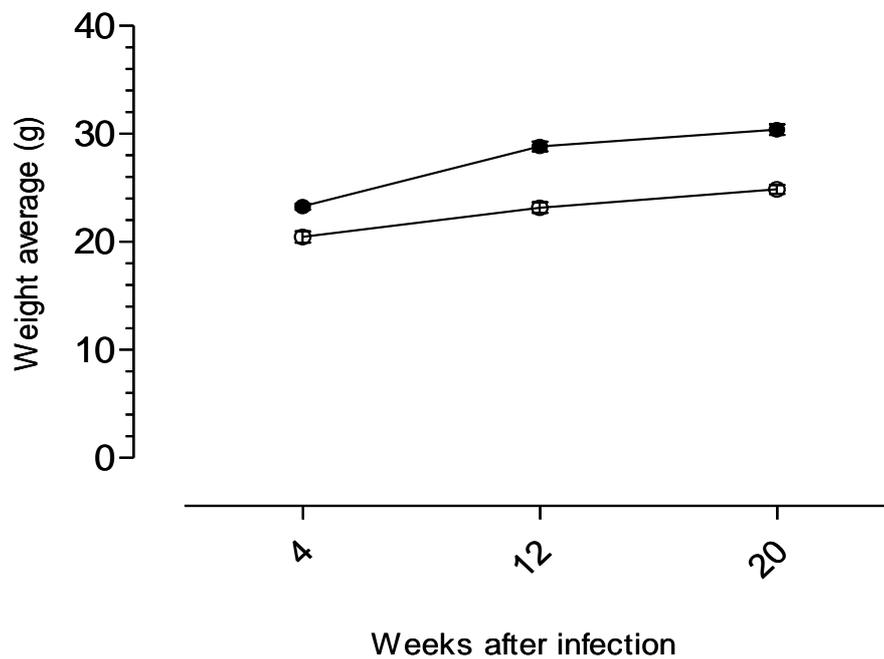
\*teste estatístico ANOVA

### 5.2.3 Análises entre o grupo CS com 12 cigarros/exposição e o grupo NCS

#### 5.2.3.1 Peso

Na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana observamos um peso médio de 23.27, 28.83 e 30.40 gramas para o grupo NCS e 20.46, 23.18 e 24.89 gramas para o grupo exposto (CS). Observamos um menor peso estatisticamente significativo ( $p= 0,11$ ) no grupo exposto entre 4 e 12 semanas. Essa diferença não foi observada entre 12 e 20 semanas ( $p=0,83$ ) (**Gráfico 8**).

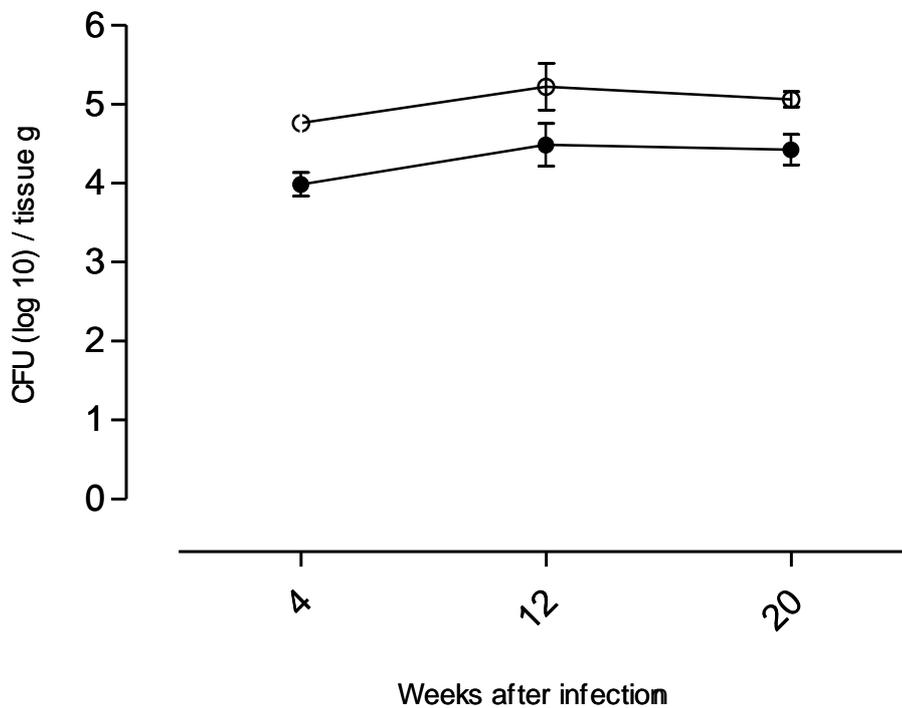
**Gráfico 8.** Peso médio dos camundongos ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).



### 5.2.3.2 Culturas Quantitativas

Em relação as unidades formadoras de colônias recuperadas dos pulmões dos camundongos, observamos no grupo NCS um valor médio de 3.98, 4.48 e 4.44 Log10 por grama/tecido na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana respectivamente. Já no grupo CS, foram observados valores médios de 4.76, 5.22 e 5.06 Log10 por grama/tecido na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana respectivamente. O grupo CS apresentou um número maior de UFC em relação ao grupo NCS durante todo experimento, entretanto, a análise estatística não demonstrou diferença significativa entre 4 e 12 semanas ( $p=0,89$ ) e 12 e 20 semanas ( $p=0,83$ ) (**Gráfico 9**).

**Gráfico 9.** Unidades Formadoras de Colônias ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).



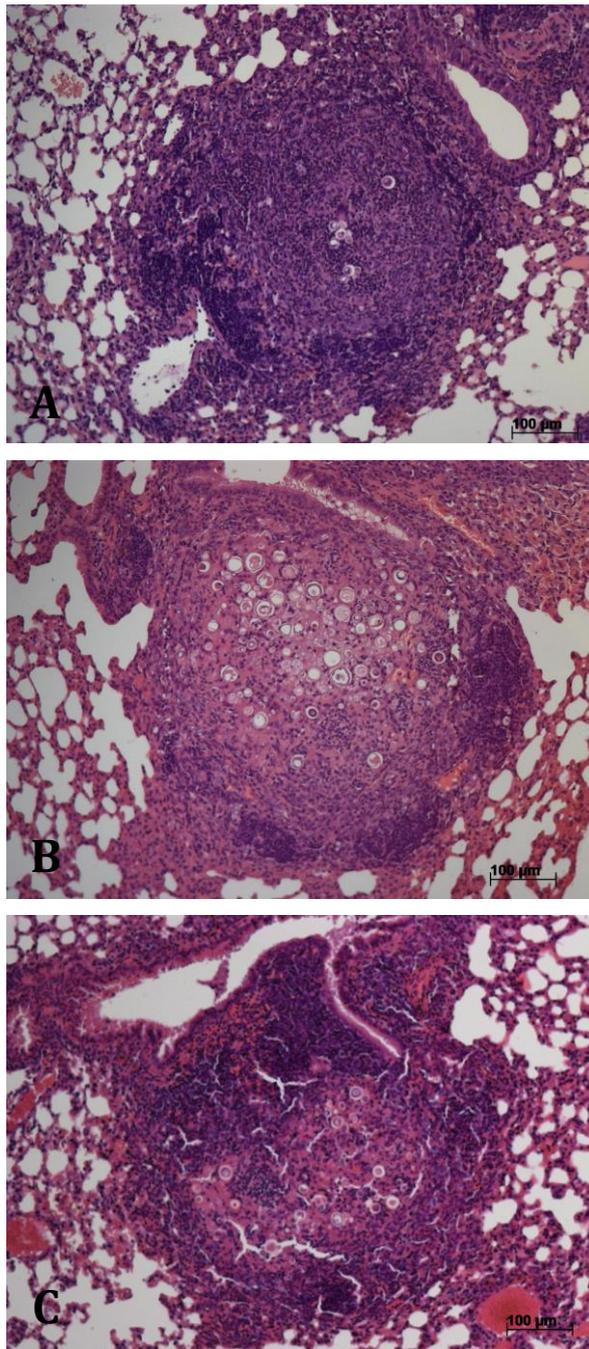
### 5.2.3.3 Disseminação para baço e fígado

Na contagem das unidades formadoras de colônias no baço e fígado, não observamos disseminação para um desses órgãos na 4ª semana de experimento em ambos os grupos. Na 12ª e 20ª semana observamos no grupo NCS, disseminação para outro órgão em 33%, 25% dos camundongos, respectivamente. Já no grupo exposto, observamos disseminação para outro órgão em 8% e 25% dos camundongos na 12ª e 20ª semana.

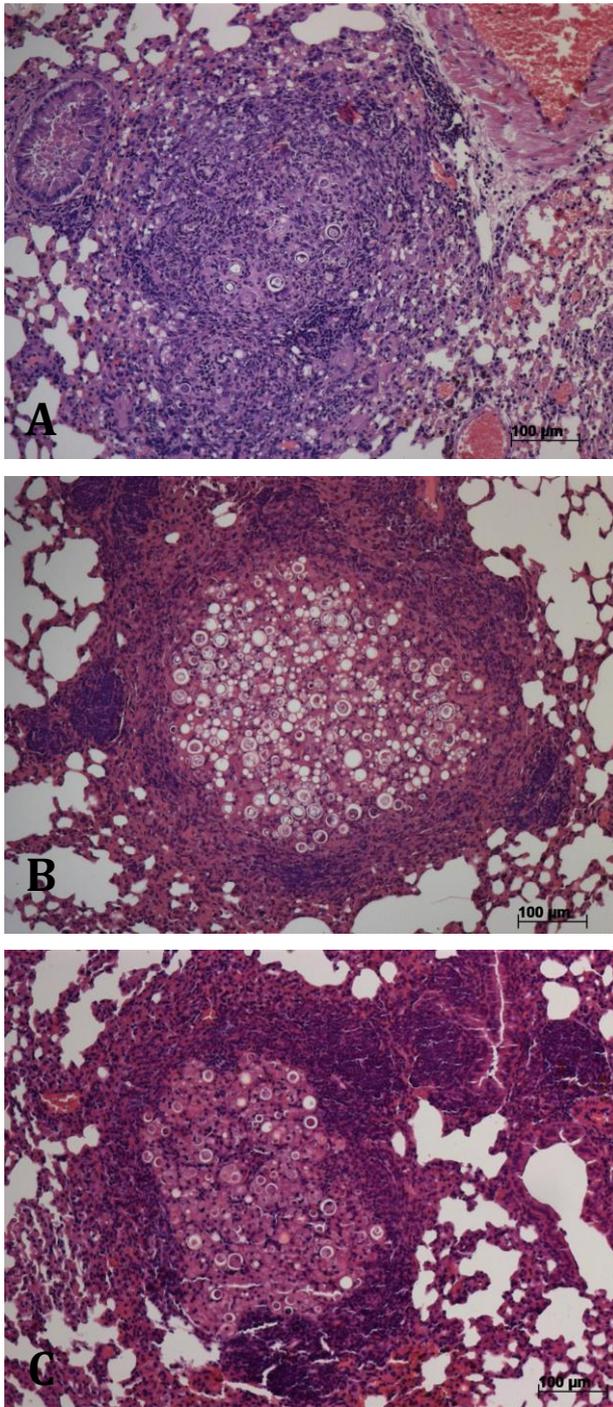
### 5.2.3.4 Histologia

Observamos um número médio de lesões teciduais (granulomas) quantificados no corte histológico de cada pulmão ao longo do tempo, no grupo NCS de 5, 7 e 7 e no grupo CS, foram observados 5, 8 e 9 granulomas na 4ª, 12ª e 20ª semana, respectivamente e ilustrado abaixo.

Em relação a resposta inflamatória observamos com 4 semanas focos difusos de histiócitos, células epitelioides, linfócitos, e alguns polimorfos agregados em torno das células leveduriformes, identificáveis como as estruturas iniciais do granuloma. Com a progressão da doença, 12 semanas em diante, granulomas bem organizados compostos por histiócitos, células epitelioides e células gigantes multinucleares, agregado em torno das leveduras e rodeado por uma borda de linfócitos foram formados.



**Figura 4.** Granulomas compactos observados no grupo NCS. A) 4 semanas, B) 12 semanas e C) 20 semanas



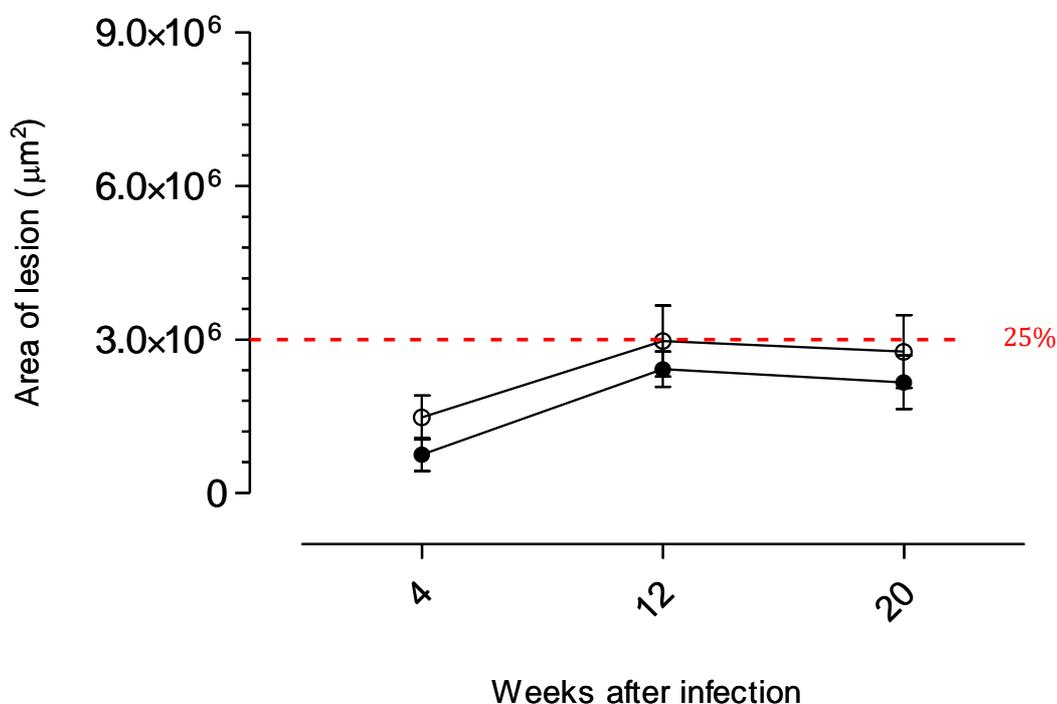
**Figura 5.** Granulomas compactos observados no grupo CS 12 cigarros/exposição. A) 4 semanas, B) 12 semanas e C) 20 semanas

Apesar de termos observados um aumento discreto no tempo 12 e 20 no número de granulomas no grupo exposto em relação ao grupo não exposto, a análise estatística não demonstrou diferença significativa ( $p=0,92$ ).

Os valores médios da área ocupada pelos granulomas em 20 campos microscópicos expressos  $\mu\text{m}^2$  encontrados durante o experimento foram para o grupo NCS: 751.215,  $2,418 \times 10^6$  e  $2,164 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  na 4ª, 12ª e 20ª semana, respectivamente. Já no grupo CS, foram observados os valores médios de 376.943,  $5,053 \times 10^6$  e  $2,851 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  na 4ª, 12ª e 20ª semana, respectivamente.

A área ocupada pelos granulomas no tecido pulmonar foi semelhante entre os grupos na 4ª semana ou após 2 semanas de exposição à fumaça de cigarro. Com 12 e 20 semanas observamos um aumento discreto, porém inferior a 25% na área ocupada pelos granulomas no grupo CS em relação ao grupo NCS (**Gráfico 10**). A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre 4 e 12 semanas ( $p=0,84$ ) e 12 e 20 semanas ( $p=0,96$ ).

**Gráfico 10.** Área ocupada pelos granulomas ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).

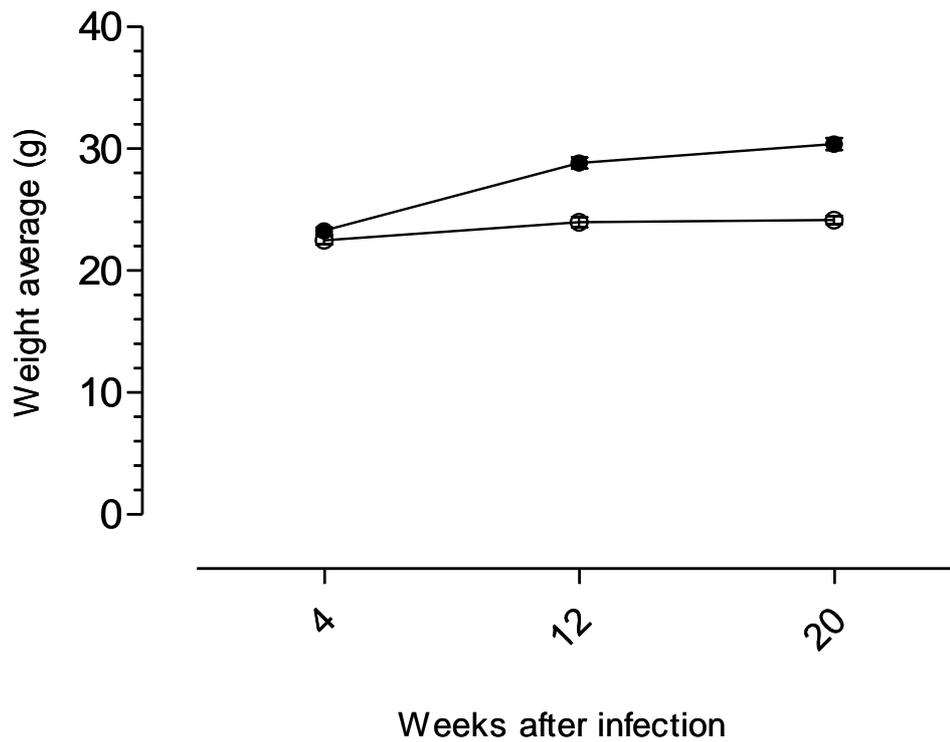


## 5.2.4 Análises entre os grupos CS com 16 cigarros/exposição e o grupo NCS

### 5.2.4.1 Peso

Observamos um peso médio de 22.51, 23.98 e 24.18 gramas para o grupo CS e 23.27, 28.83 e 30.40 gramas para o grupo NCS. Observamos um menor peso significativamente significativo ( $p < 0,001$ ) no grupo exposto entre 4 e 12 semanas. Essa diferença não foi observada entre 12 e 20 semanas ( $p = 0,16$ ) (**Gráfico 11**).

**Gráfico 11.** Peso médio dos camundongos ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).

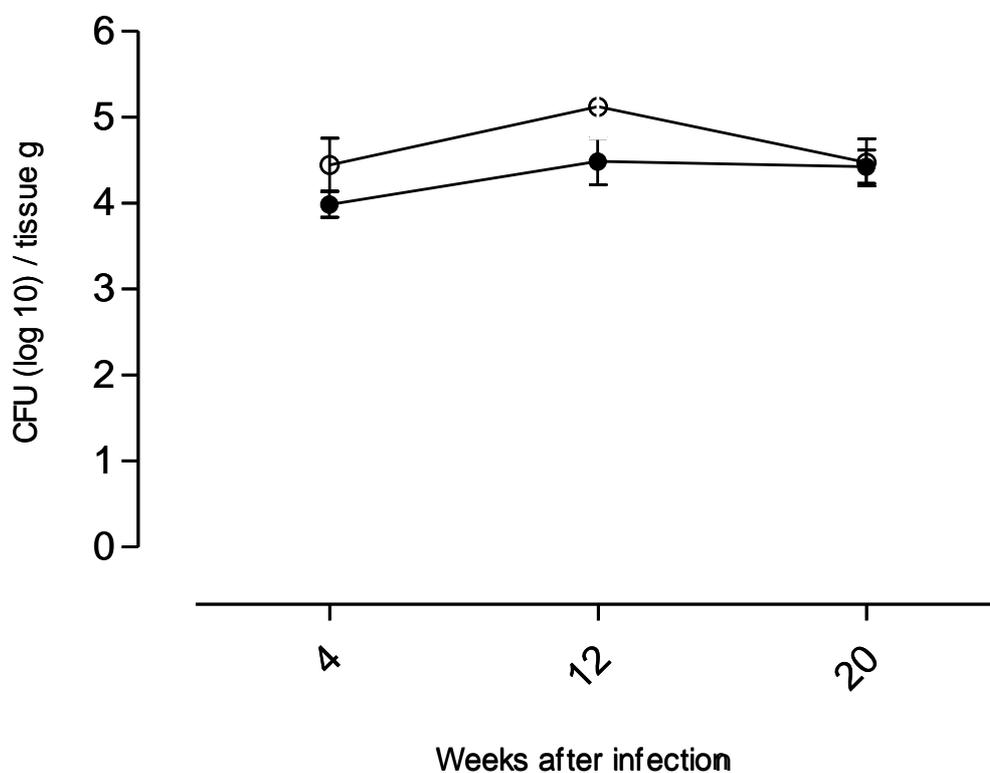


#### 5.2.4.2 Culturas Quantitativas

Aumentando o número de cigarros para 16/exposição observamos em relação as unidades formadoras de colônias recuperadas dos pulmões dos camundongos, no grupo exposto, valores médios de 4.45, 5.12 e 4.47 Log10 por grama/tecido na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana respectivamente. Como já descrito o grupo NCS apresentou um valor médio de 3.98, 4.48 e 4.42 Log10 por grama/tecido na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana respectivamente.

De forma semelhante ao experimento utilizando 12 cigarros/exposição, observamos que o grupo CS apresentou um número maior de UFC em relação ao grupo NCS em todos os tempos analisados, porém a análise estatística não demonstrou diferença significativa entre 4 e 12 semanas ( $p=0,74$ ) e 12 e 20 semanas ( $p=0,29$ ) (**Gráfico 12**).

**Gráfico 12.** Unidades Formadoras de Colônias ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).

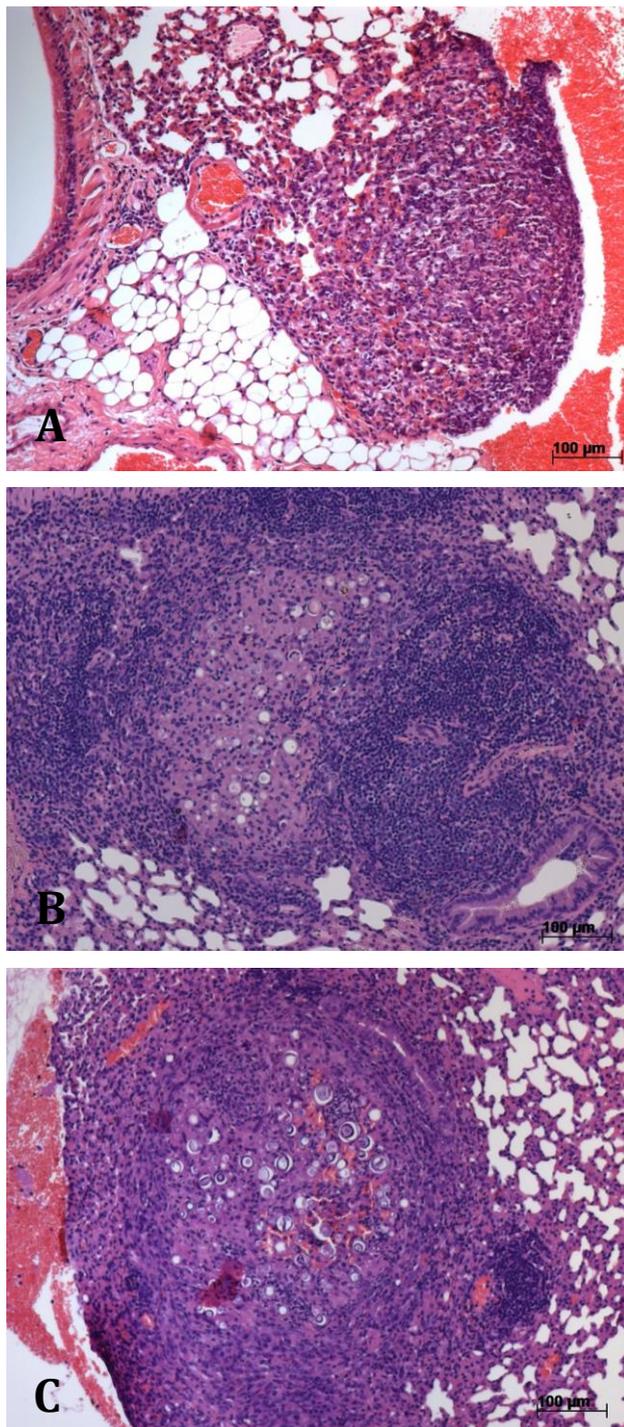


#### 5.2.4.3 Disseminação para baço e fígado

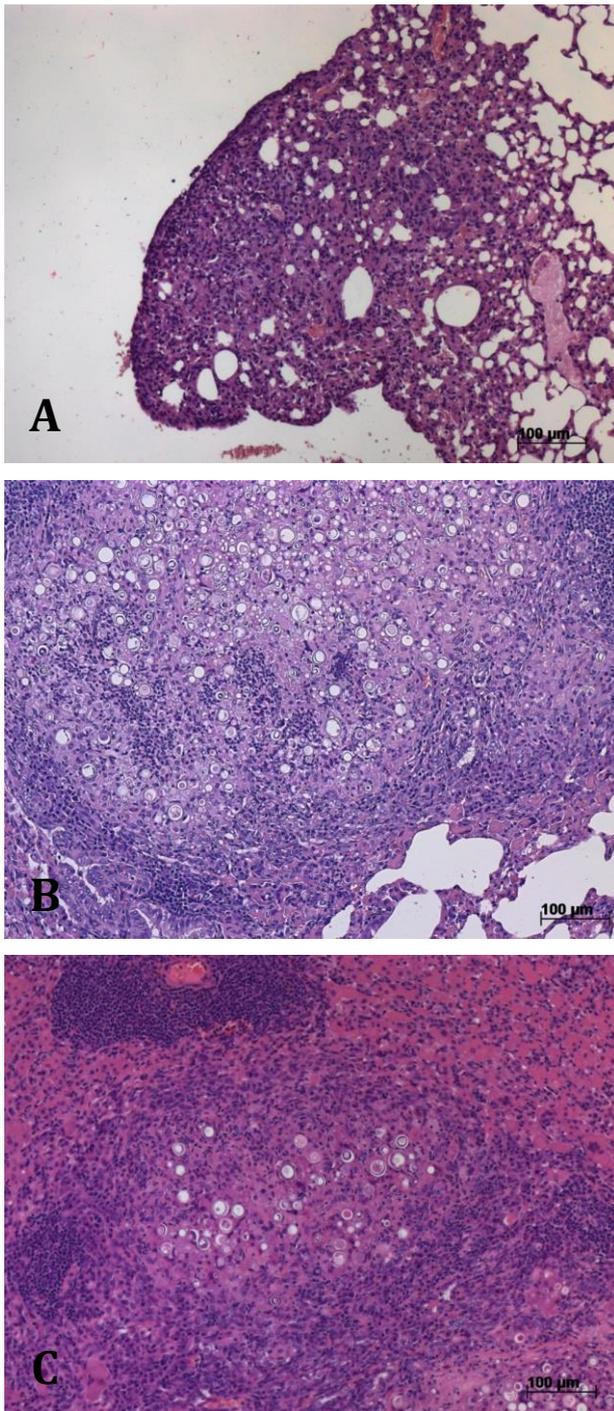
Em relação as unidades formadoras de colônias recuperadas no baço e fígado, observamos disseminação para um desses órgãos no grupo CS em 8%, 17%, e 17% dos camundongos na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana. O grupo NCS, apresentou uma % de disseminação para outro órgão de 8%, 67%, e 25% na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana.

#### 5.2.4.4 Histologia

Observamos que o grupo NCS apresentou o seguinte número médio de granulomas quantificados no corte histológico de cada pulmão ao longo do tempo: 3, 4 e 5 e no grupo CS, foram observados 3, 8 e 9 granulomas na 4<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana, respectivamente e ilustrado na figura 6 e 7. Observamos um aumento no número de lesões no tempo 12 e 20 no grupo CS em relação ao grupo NCS. A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre 4 e 12 semanas ( $p=0,05$ ) e 12 e 20 semanas ( $p=0,84$ ). Em relação a resposta inflamatória não observamos diferenças com o experimento utilizando 12 cigarro.



**Figura 6.** Granulomas compactos observados no grupo NCS com A) 4 semanas, B) 12 semanas e C) 20 semanas

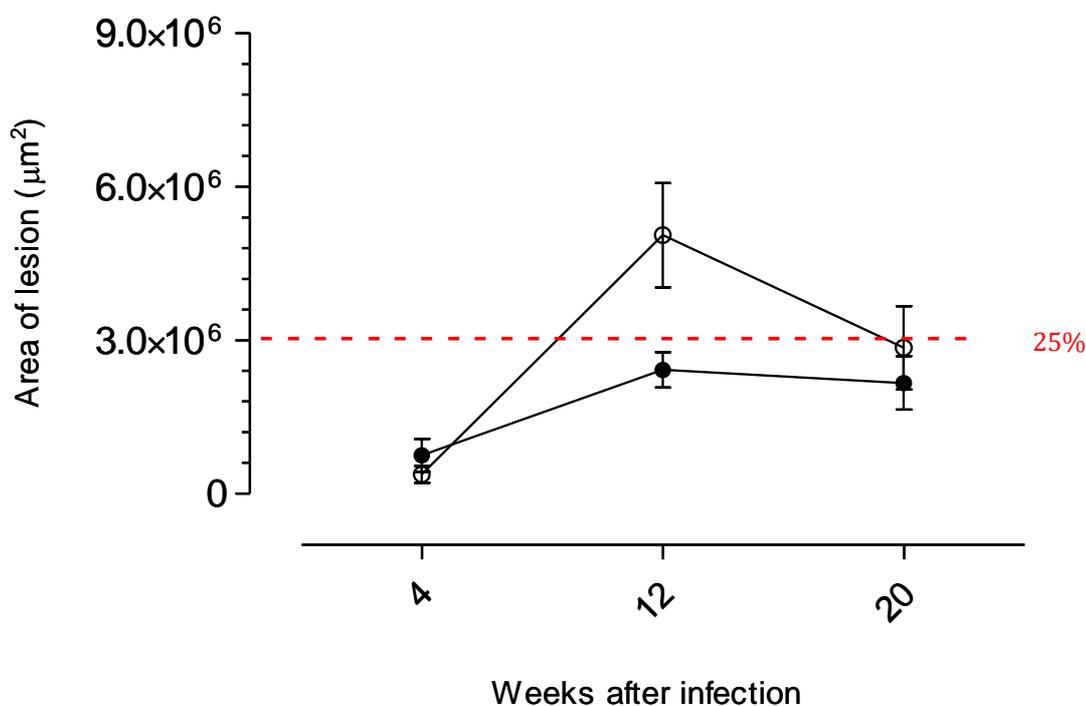


**Figura 7.** Granulomas compactos observados no grupo CS com 16 cigarros/exposição. A) 4 semanas, B) 12 semanas e C) 20 semanas.

Os valores médios da área ocupada pelos granulomas em 20 campos microscópicos expressos  $\mu\text{m}^2$  encontrados durante o experimento com 16 cigarros/exposição foram: 376.943,  $5.053 \times 10^6$  e  $2.851 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  na 4ª, 12ª e 20ª semana, respectivamente. O grupo não exposto apresentou os seguintes valores: 751.215,  $2.418 \times 10^6$  e  $2.164 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  na 4ª, 12ª e 20ª semana, respectivamente.

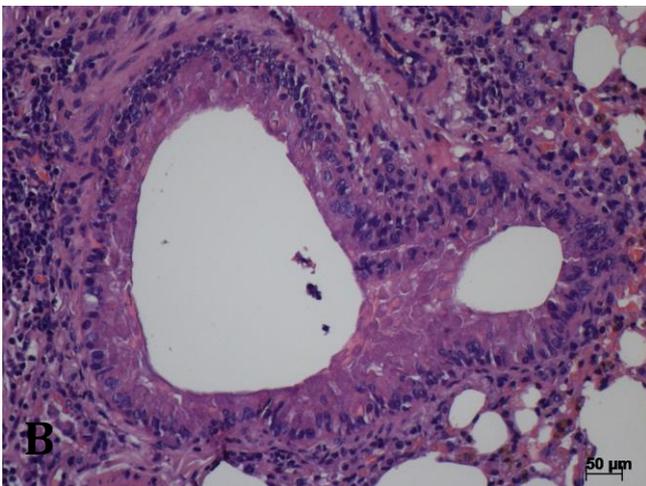
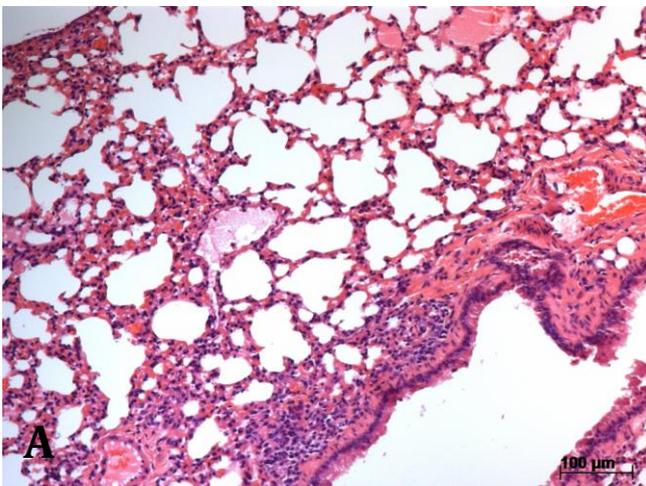
Com 12 e 20 semanas observamos que o grupo CS apresentou uma maior área acometida em relação ao grupo NCS. Com 12 semanas a área ocupada pelos granulomas foi superior a 25% assim. Também observamos o dobro do valor na quantidade de granulomas no grupo CS em relação ao grupo NCS com 12 semanas (**Gráfico 13**). Em contrapartida, com 20 semanas observamos uma diminuição na área acometida pelos granulomas independente da exposição à fumaça de cigarro. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre 4 e 12 semanas ( $p=0,003$ ) porém essa diferença não foi sustentada entre 12 e 20 semanas ( $p=0,13$ ).

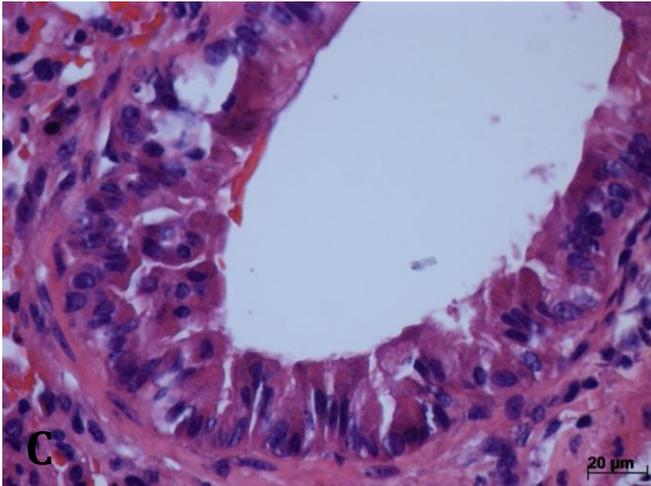
**Gráfico 13.** Área ocupada pelos granulomas ao longo do tempo no grupo não exposto à fumaça de cigarro exposto (●) e exposto à fumaça de cigarro (○).



### 5.2.5 Alterações histológicas relacionadas ao tabaco no grupo controle

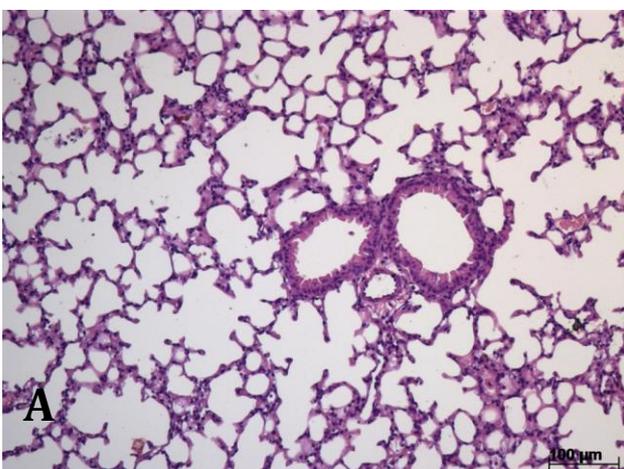
Na quarta semana do experimento, o tecido pulmonar do grupo controle, não exposto à fumaça de cigarros apresentava septos alveolares e bronquíolos dentro da normalidade. Em contrapartida, no tecido pulmonar dos camundongos expostos à fumaça de cigarro durante duas semanas, já pudemos observar o epitélio colunar alto e uma discreta displasia do epitélio colunar (**Figura 8**).

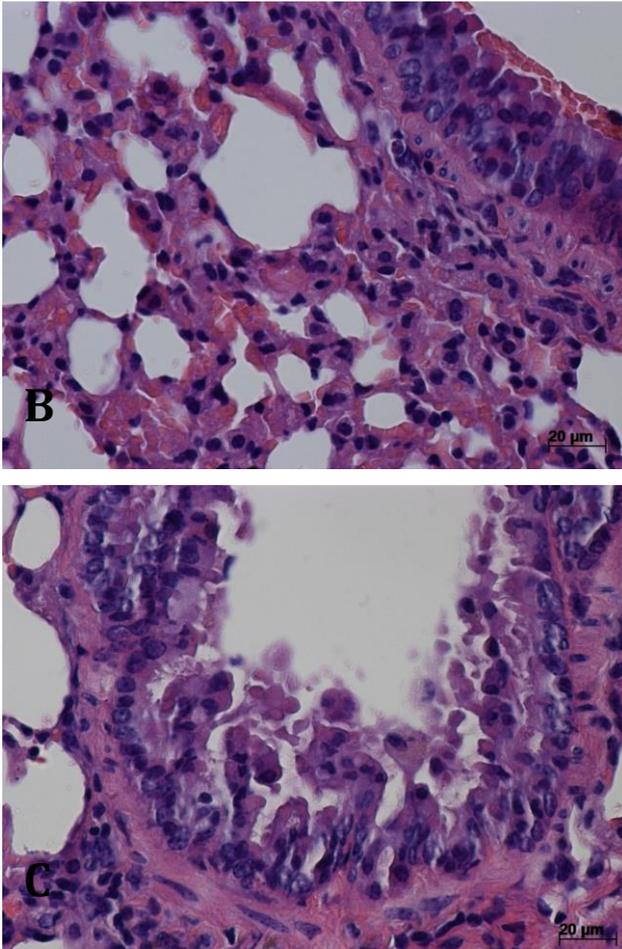




**Figura 8.** (A) Septos alveolares e bronquíolos dentro da normalidade. (B) Epitélio colunar alto. (C) Displasia discreta do epitélio colunar.

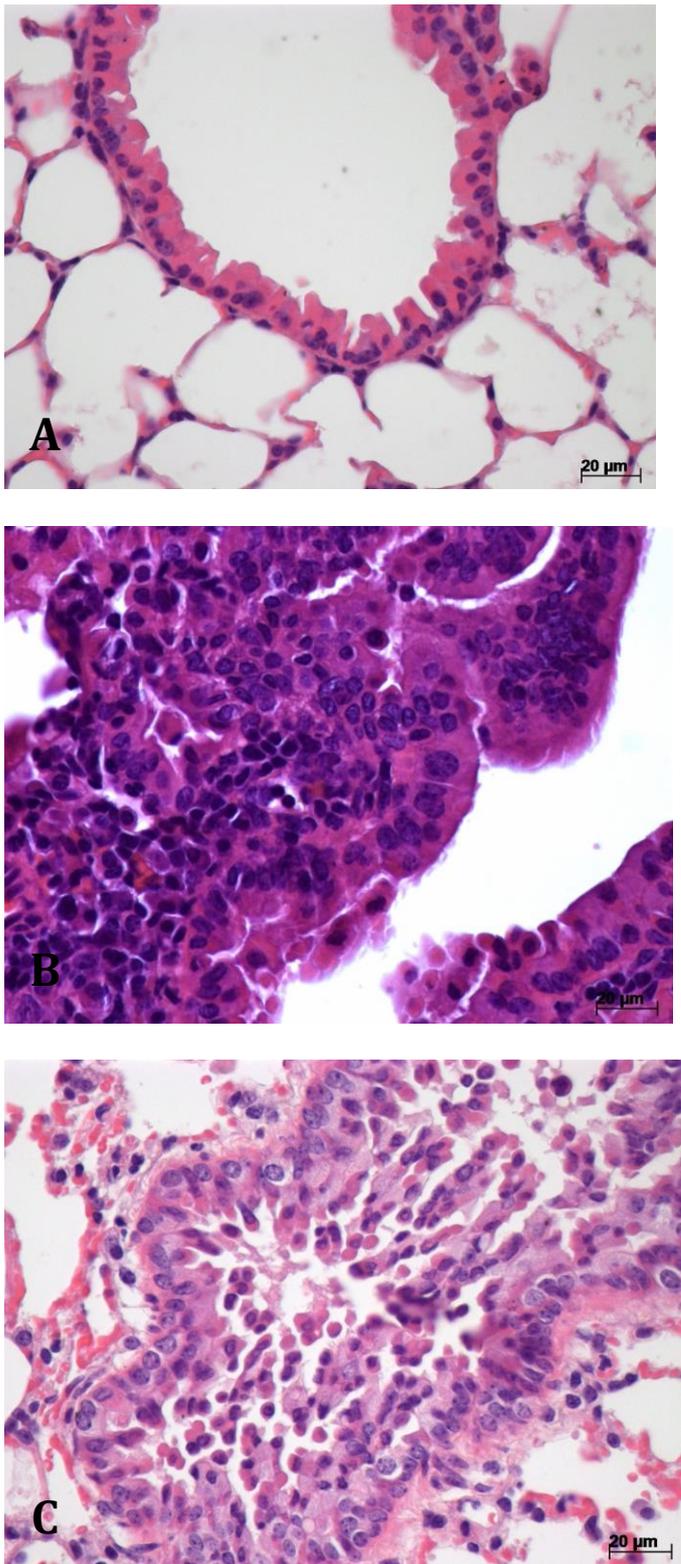
Na décima segunda semana de exposição, não observamos nenhuma alteração na histologia pulmonar dos camundongos não expostos ao tabaco. Entretanto, o grupo exposto ao tabaco apresentou displasia do epitélio colunar e aumento na produção de muco.





**Figura 9.** (A) Histologia pulmonar normal. (B) Displasia do epitélio colunar. (C) Aumento na produção de muco.

Na vigésima semana de exposição, não observamos nenhuma alteração no tecido pulmonar e epitélio respiratório do grupo não exposto. Em contrapartida, no grupo exposto à fumaça de cigarro, observamos displasia moderada do epitélio colunar e aumento da produção de muco.



**Figura 10.** (A) Epitélio respiratório normal. (B) Displasia moderada. (C) Aumento da produção de muco.

## ***6 Discussão***

---

Estudos epidemiológicos da paracoccidiodomicose (PCM) visam identificar fatores que levam o indivíduo infectado a manifestar a doença. A primeira referência sobre a possível associação entre PCM e tabagismo, foi descrita em estudo caso-controle em que os autores demonstraram que entre os doentes, os tabagistas por mais de vinte anos mostraram maiores chances de desenvolver a doença. Além disso, a intensidade de consumo do tabaco também influencia na doença, indicando que os indivíduos que fumavam vinte ou mais cigarros/dia adoeceram em média oito anos antes ( $p = 0,002$ ), que os demais (31).

Embora as evidências epidemiológicas apoiem fortemente a hipótese de que o tabagismo possa levar à reativação da PCM latente, nenhum estudo até o momento demonstrou o mecanismo possível para esta associação.

Em nossa proposta de estudo, avaliamos pela primeira vez, a influência do tabagismo em um modelo experimental murino na reativação da PCM. Para o desenvolvimento deste estudo, foi necessário primeiramente padronizar uma infecção latente em modelo murinho que melhor representasse ou mimetizasse a infecção latente humana.

Como já citato, a PCM pode se traduzir como uma doença progressiva, representado pela minoria dos casos ou como uma infecção latente assintomática que poderá ou não reativar posteriormente durante a vida de um indivíduo e conseqüentemente manifestar a doença. De forma muito semelhante com a PCM, o sistema imunológico da vasta maioria dos indivíduos controla de forma bem sucedida a infecção primária pelo *Mycobacterium tuberculosis*, entretanto, nem todas as bactérias são eliminadas. Esse estado é chamado de tuberculose latente e é clinicamente assintomático (61).

Publicado em 2002, um modelo murino após a administração intratraqueal de  $1 \times 10^6$  micobactérias produziu uma doença progressiva, caracterizada por alta carga bacilar, pneumonia progressiva e alta mortalidade. Em contraste, a infecção com uma dose muito baixa ( $4 \times 10^3$ ) de bacilos produziu uma infecção latente, caracterizada por contagens bacilares baixas e estáveis, granulomas pequenos e ausência de mortalidade. Além disso os camundongos continuaram a ganhar peso e pareciam saudáveis ao longo do experimento (62).

Para estabelecer as doses do *P. brasiliensis* necessárias para induzir infecção latente e doença progressiva, em nosso estudo, reproduzimos um modelo murino, com o objetivo de alcançar o mesmo fenômeno. Ao utilizamos doses de inóculo diferentes, observamos que 100 leveduras foi a dose mínima necessária para induzir uma infecção latente ao longo do tempo, devido aos valores baixos e estáveis das UFC e com uma área pulmonar acometida pelos granulomas inferior a 25% nos três períodos avaliado. De forma semelhante ao descritos, todos os camundongos deste grupo permaneceram com aspecto um saudável ao longo do tempo e obtivemos uma ausência de mortalidade. Comparativamente, em todos os outros grupos, tivemos perdas de animais, sendo mais intensa no grupo  $1 \times 10^6$ , em que só foi possível estudar 1

camundongo no tempo 20. A contagem de fungos nos pulmões de animais infectados permaneceu alta durante o experimento e a área acometida pelos granulomas ultrapassou 25% do pulmão em pelo menos em um dos tempos avaliados.

Nossos resultados se enquadram bem com a definição recente de infecção latente experimental, que considera, área acometida pelos granulomas inferior a 25%, UFC estável nos pulmões sem sinais clínicos da doença por um longo período de tempo, ausência de mortalidade e sem reativação espontânea da doença (62, 63).

A padronização de um modelo de infecção latente de paracoccidiodomicose nos permitiu subsequentemente elucidar certos aspectos da relação parasito-hospedeiro na PCM. Ao buscarmos estudos experimentais, observamos apenas dois estudos com modelo experimental associando o tabagismo as doenças infecciosas granulomatosas, sendo ambos com modelo de *M. tuberculosis* (49, 64).

Para caracterizar a associação da exposição à fumaça de cigarro com o processo de reativação de PCM, primeiro tivemos que entender a história natural da doença para então desenhar o modelo experimental. De acordo com a literatura, os indivíduos com a forma crônica da PCM geralmente se infectam na primeira infância e posteriormente adquirem o hábito de fumar.

Considerando os estudos em modelo murino de micobacteriose, pois se assemelha a PCM por serem doenças granulomatosas, os animais são infectados após a exposição à fumaça de cigarro (49). Diferentemente, em nosso modelo experimental os camundongos foram expostos a fumaça de cigarro após duas semanas da infecção com *P. brasiliensis* mimetizando de forma mais fiel o que ocorre com os pacientes. Optamos por esperar 14 dias, pois acreditamos ser o tempo mínimo necessário para o estabelecimento da infecção.

Em nosso estudo a exposição à fumaça de cigarro foi realizada de acordo com o protocolo modificado de Biselli et al. e independente do momento que a infecção ocorreu, nossos camundongos mantiveram níveis de COHb dentro do intervalo desejado, o que corresponderia a um fumante moderado durante as 20 semanas em todos os experimentos. Este controle mensal da COHb é de fundamental importância ao discutirmos a validade dos nossos resultados, uma vez que esses camundongos não foram expostos a doses tóxicas relacionadas ao tabagismo. Além disso, como observado em outros modelos experimentais (65), os camundongos expostos perderam mais peso quando comparados ao grupo não exposto independente do inóculo administrado, demonstrando que nosso experimento foi realizado e simulou de forma correta uma exposição à fumaça de cigarro de corpo inteiro.

A fumaça do tabaco é uma mistura complexa de mais de 4.500 produtos químicos, e sua queima produz até 6.000 componentes diferentes além de nicotina, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, glicoproteína do tabaco e alguns metais, muitos dos quais são conhecidos

por serem antigênicos, citotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos (66, 67). A possibilidade de que o aumento da prevalência de doenças associadas à fumaça do cigarro possa, em parte, ser devido às alterações induzidas pela fumaça do tabaco nos processos imunológicos e inflamatórios foi reconhecida pela primeira vez na década de 1960 (66, 68). A plausibilidade biológica entre os efeitos do tabagismo e a reativação de doenças infecciosas granulomatosas pode ser devido as propriedades imunossupressoras reconhecidas da nicotina (66, 69, 70). Um fumante inala o aerossol enriquecido com nicotina, com tamanho de partícula na faixa de micron, permitindo deposição alveolar eficiente e rápida absorção pelo sistema circulatório (66, 67).

Uma hipótese inicial era que o efeito imunossupressor da nicotina era devido sua ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por meio de receptores de nicotina no sistema nervoso central. No entanto, observou-se que eixo HPA é importante apenas para os efeitos agudos da nicotina, pois os efeitos anti-inflamatórios crônicos persistem mesmo após a adrenalectomia (71).

Além disso, foi observado que a nicotina estimulou a replicação *in vitro* de *Legionella pneumophila* em uma linha de macrófagos alveolares murinos. O TNF é uma das principais moléculas ativadoras de macrófagos neste sistema. Esse efeito é mediado por receptores nicotínicos de acetilcolina (70), que são expressos em altos níveis nos macrófagos (72).

Curiosamente, o mecanismo imunomodular da nicotina que já estava relatado na literatura desde 2000 (73, 74), mas não havia sido feito uma conexão, que foi apenas posteriormente descrita por Floto & Smith, 2003, quando demonstraram que sistema nervoso parassimpático, sinalizando através do nervo vago, medeia um importante via anti-inflamatória chamada de via anti-inflamatória colinérgica. A nicotina na fumaça do tabaco atua na via final deste importante mecanismo anti-inflamatório fisiológico interrompendo a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF-alpha (47).

Em termos práticos, sabe-se que uma variedade de situações de imunossupressão reativará a tuberculose, mas a mais interessante e específica é o uso de anticorpo monoclonal neutralizante ao TNF-alpha. Estes agentes funcionam neutralizando o TNF-alpha, mas também causam a apoptose de células T e outros tipos de células que expressam o TNF-alpha (48). O uso de imunobiológicos anti-TNF no tratamento de distúrbios inflamatórios crônicos, como a artrite reumatóide, aumenta significativamente o risco para reativação da TB, indicando que TNF-alpha ou células T e macrófagos que expressam em sua membrana TNF-alpha, são cruciais para a manutenção do estado latente (75).

O papel crítico do TNF no desenvolvimento do granuloma já foi sugerido em um estudo de camundongos C57BL/6 com deficiência direcionada ao receptor do TNF p55 (p55KO) infectados por via intravenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras de Pb 18. Ao exame histopatológico o tecido pulmonar revelou diferenças marcantes entre as lesões granulomatosas desenvolvidas em

camundongos selvagens (WT) em comparação com as lesões observadas nos camundongos p55KO. Em comparação com os camundongos WT, trinta dias da infecção inicial, os camundongos p55KO apresentaram lesões pulmonares focais e difusas, com grande quantidade de levedura, sem formação de granuloma. Além disso, os camundongos p55KO infectados começaram a morrer após 60 dias da infecção e a taxa de mortalidade com 90 dias foi de 100% quando comparada com 100% de sobrevivência em animais WT infectados. Por fim, a carga fúngica obtidas nos órgãos (baço, fígado e pulmão) de camundongos p55KO infectados também foram significativamente maiores do que aqueles em camundongos WT (76).

Sendo assim, a nicotina na fumaça de cigarro pode interromper a produção de TNF por macrófagos nos pulmões e, como essa citocina é crucial para a manutenção do estado latente do agente nos macrófagos, pode ocorrer a reativação da doença. É possível que a via anti-inflamatória colinérgica possa não ser a única responsável pelos efeitos imunomoduladores da nicotina, mas é muito provável que seja a dominante.

Em nosso trabalho, foram realizados dois experimentos com quantidades diferentes de cigarro para avaliar e caracterizar a associação da exposição à fumaça de cigarro com o processo de reativação de PCM.

No experimento utilizando 12 cigarros, apesar do grupo exposto à fumaça de cigarro ter apresentado um crescimento maior das unidades formadoras de colônias e da área ocupada pelos granulomas em relação ao grupo não exposto em todos os tempos, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Além disso, os dois grupos apresentaram um padrão de doença não progressiva com menos de 25% da área pulmonar acometida ao longo no tempo. A quantidade de granulomas entre os grupos foi praticamente a mesma, sendo ligeiramente maior com 12 e 20 semanas.

Quando avaliamos os trabalhos que estudo os efeitos da fumaça de cigarro em algumas doenças infecciosas, observamos tanto uma variação no número de cigarros, tempo e período de exposição (77). Dessa forma, após os resultados do nosso primeiro protocolo experimental e baseado em um estudo que investigou os efeitos da exposição à fumaça de cigarro em modelo murino de tuberculose, optamos por aumentar o número de cigarros assim como o tempo de exposição. Neste estudo, os camundongos foram expostos à fumaça de 170-180 cigarros durante 5 horas por dia e posteriormente infectados com *M. tuberculosis*, sendo demonstrado um aumento significativo da carga bacteriana nos pulmões e no baço com 14 e 30 dias após a infecção e um maior acometimentos de lesões pulmonares em comparação com camundongos controle (49).

Dessa forma, optamos por realizar um novo protocolo experimental aumentando a carga tabágica e conseqüentemente o tempo de exposição à fumaça de cigarro com objetivo de avaliar uma piora na evolução da doença do grupo exposto à fumaça de cigarro. Após o aumento do

tempo de exposição, a carboxihemoglobina média medida também aumentou, porém permaneceu dentro do intervalo desejado e considerado não tóxico para os camundongos. Nesse novo protocolo experimental, após a infecção inicial, independente da exposição à fumaça de cigarro, ambos os grupos apresentaram um semelhante padrão da doença até o tempo 4. Além disso, foi observado que a partir da 4ª até a 12ª semana os dois grupos apresentaram um aumento da área ocupada pelos granulomas. Entretanto o grupo não exposto manteve uma porcentagem de acometimento inferior a 25% da área pulmonar analisada assim como na quantidade média de granuloma demonstrando uma estabilidade da doença. Em contrapartida, o grupo exposto, apresentou um aumento progressivo e estatisticamente maior em relação à área pulmonar ocupada pelos granulomas, atingindo, com 12 semanas, 42% da área pulmonar total acometida por granulomas. Em relação a quantidade média de granulomas, observamos um aumento quando comparado ao outro grupo, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação às UFC, apesar do grupo exposto ter apresentado uma quantidade maior de UFC, não foi demonstrado diferença significativa entre os grupos neste mesmo momento experimental. Em contrapartida a disseminação para baço e fígado foi muito mais evidente no grupo exposto.

Em contrapartida, entre 12 e 20 semanas de experimento o grupo não exposto assim como o grupo exposto apresentaram uma redução gradual das lesões teciduais ao longo do tempo atingindo praticamente a mesma área total ocupada pelos granulomas. Dessa forma, mesmo no experimento com aumento da carga tabágica e de forma semelhante ao experimento com 12 cigarros, com 20 semanas ambos os grupos tenderam ao controle da doença apesar do grupo exposto ter apresentado maior área acometida e um maior número na quantidade média de granulomas por pulmão. Como já esperávamos, não houve diferença em relação as UFC neste tempo experimental.

Ao compararmos histopatologicamente nosso experimento com o estudo de Shang e colaboradores (49) observamos semelhanças na resposta inflamatória inicial entre os camundongos expostos a fumaça de cigarro quando comparado aos não expostos pela observação de leve infiltrado perivascular e infiltrados peribronquiolares principalmente de linfócitos. No decorrer do experimento os camundongos expostos apresentaram espessamento da parede dos septos alveolares, infiltrados inflamatórios mais difusos de macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Diferentemente do modelo experimental de tuberculose, em nosso estudo os granulomas permaneceram bem formados e compactos apesar de maiores em tamanho no grupo exposto.

Além disso, observamos tanto no grupo experimental como no grupo controle (apenas exposto ao tabagismo), que as alterações histológicas relacionadas ao cigarro foram evidenciadas a partir da 4ª semana. É interessante notar que as alterações histológicas relacionadas ao fumo foram evidenciadas de forma mais precoce, com 30 dias de exposição, quando comparado com o

resultado da área ocupada pelos granulomas, em que apenas após 90 dias de exposição as diferenças entre os grupos foram mais evidentes, sendo possível sua determinação quantitativa.

Por fim, nosso modelo possui diferenças importantes com os modelos descritos na literatura. Primeiro realizamos um tempo de acompanhamento experimental quase 5 vezes superior ao estudo de Shang et al. [ ] e realizamos nossa exposição após a inoculação do agente infeccioso. Entre esses fatores, acreditamos que o tempo de acompanhamento tenha sido a principal influência para não termos observado diferenças mais consistentes entre os grupos. Em ambos os modelos que realizamos, fica visível o potencial de controle da infecção inicial após 12 semanas da inoculação tanto nos grupos expostos como nos grupos não expostos.

As grandes limitações dos nossos resultados foi não ter conseguido demonstrar diferença entre os grupos em relação as UFC além de não termos sustentado a piora da doença com 20 semanas. Algumas razões podem ter contribuído para isso. Primeiro a variabilidade na contagem das UFC nos pulmões muito provavelmente ocorreu devido ao inóculo de apenas 100 leveduras o que conseqüentemente pode ter influenciado em nosso resultado final. Além disso, apesar de termos observado que o valor de 100 leveduras preencheu os critérios de infecção latente descritivo previamente na literatura; talvez essa dose de inóculo tenha sido de fato muito baixa, e assim os camundongos foram capazes de controlarem a doença com 20 semanas mesmo e apesar do efeito adicional do tabagismo. Por fim, não podemos descartar o fato que talvez a nicotina presente no cigarro não seja o único determinante para a reativação da PCM mas que sim, exerça uma influência importante em seu desenvolvimento associado a talvez outras causas relacionadas talvez ao hospedeiro ou mesmo ao agente infeccioso que ainda não foram elucidadas.

## ***7 Conclusão***

---

Embora a exposição à fumaça de cigarro seja uma associação importante na população acometida pela PCM e também observado em nosso modelo experimental; os mecanismos biológicos pelos quais a nicotina predispõe os indivíduos à PCM não foram descritos. A fim de mitigar a PCM na população exposta à fumaça, é importante seguir com este trabalho com a finalidade de esclarecer os efeitos da nicotina no sistema imunológico.

Por ora, o mecanismo por trás da associação entre fumar na PCM permanece obscuro. Os efeitos do tabagismo e da nicotina são numerosos e porque a patogênese da PCM também não é totalmente compreendida, uma discussão sobre os possíveis mecanismos é apenas especulativa. Potencialmente, a nicotina na fumaça do cigarro pode restringir a resposta imunológica na PCM via ativação de receptores nicotínicos de acetilcolina nas células do sistema imunológico, o que pode explicar seu efeito deletério nas doenças granulomatosas como na tuberculose (34, 78) e PCM assim com seu efeito protetor levando a menor desenvolvimento da sarcoidose (79).

## ***8 Referências***

---

1. A. L. Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil . Contribuicao ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas . . Bras - Med . 1908. p. 121-4
2. CS L. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioomicose. Um pouco de sua história. Del Negro G LC FA, editor. São Paulo: Sarvier-Edusp; 1982.
3. FP A. Estudos comparativos do granuloma coccidiótico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. An Fac Med S . Paulo 1930. p. 125-41.
4. San-Blas G, Niño-Vega G. Paracoccidioides brasiliensis: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. Mycopathologia. 2008;165(4-5):183-95.
5. Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM, Goldman GH, Taylor JW, Restrepo A, et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of Paracoccidioides brasiliensis. J Clin Microbiol. 2006;44(6):2153-7.
6. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. Mol Phylogenet Evol. 2009;52(2):273-83.
7. Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of Paracoccidioides brasiliensis. Sabouraudia. 1985;23(6):407-14.
8. Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. Pulmonary paracoccidiooidomycosis. Semin Respir Crit Care Med. 2008;29(2):182-97.
9. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidiooidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev. 1993;6(2):89-117.
10. Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizábal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidiooidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable paracoccidioides brasiliensis propagules. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000;42(2):59-66.
11. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Goveia A, et al. Endemic regions of paracoccidiooidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. Am J Trop Med Hyg. 1999;61(3):390-4.
12. Martinez R. Paracoccidiooidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(4):480.
13. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Telles FQ, Kono A, Paniago AMM, et al. [Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidiooidomycosis]. Epidemiol Serv Saude. 2018;27(spe):e0500001.
14. Martinez R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57 Suppl 19:11-20.
15. Martinez R. New Trends in Paracoccidiooidomycosis Epidemiology. J Fungi (Basel). 2017;3(1).
16. Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R. Paracoccidiooidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;85(3):546-50.
17. Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidiooidomycosis. Clin Microbiol Rev. 2011;24(2):296-313.
18. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus Paracoccidioides brasiliensis. Infect Immun. 1988;56(3):711-3.
19. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidiooidomycosis. Mycopathologia. 2008;165(4-5):209-21.

20. Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF, Estevez ME, Tiraboschi NI, Sen L, et al. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol Immunol.* 1991;35(3):167-74.
21. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 2002;10(2):80-7.
22. Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F, Robledo M, Londoño F, Hernández H, et al. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia.* 1976;58(2):63-70.
23. Benard G, Kavakama J, Mendes-Giannini MJ, Kono A, Duarte AJ, Shikanai-Yasuda MA. Contribution to the natural history of paracoccidioidomycosis: identification of the primary pulmonary infection in the severe acute form of the disease--a case report. *Clin Infect Dis.* 2005;40(1):e1-4.
24. Fava S di C, Netto CF. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998;40(3):155-64.
25. Buccheri R, Khoury Z, Barata LC, Benard G. Incubation Period and Early Natural History Events of the Acute Form of Paracoccidioidomycosis: Lessons from Patients with a Single *Paracoccidioides* spp. Exposure. *Mycopathologia.* 2016;181(5-6):435-9.
26. Wanke B, Aidê MA. Chapter 6--paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol.* 2009;35(12):1245-9.
27. Queiroz-Telles F, Escuissato DL. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011;32(6):764-74.
28. do Valle AC, Guimarães RR, Lopes DJ, Capone D. [Thoracic radiologic aspects in paracoccidioidomycosis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992;34(2):107-15.
29. Campos EP, Padovani CR, Cataneo AM. [Paracoccidioidomycosis: radiologic and pulmonary study in 58 cases]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991;33(4):267-76.
30. Tobón AM, Agudelo CA, Osorio ML, Alvarez DL, Arango M, Cano LE, et al. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. *Clin Infect Dis.* 2003;37(7):898-904.
31. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. [Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2003;19(1):245-53.
32. Malta DC, Moura EC, Silva SA, Oliveira PP, Silva VL. Prevalence of smoking among adults residing in the Federal District of Brasília and in the state capitals of Brazil, 2008. *J Bras Pneumol.* 2010;36(1):75-83.
33. VW F, AP M, RVM L, FL A. Tobacco smoking and cancer in Brazil: evidence and prospects. *Rev. bras. epidemiol*2010. p. 175-87.
34. Slama K, Chiang CY, Enarson DA, Hassmiller K, Fanning A, Gupta P, et al. Tobacco and tuberculosis: a qualitative systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11(10):1049-61.
35. Lin HH, Ezzati M, Murray M. Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2007;4(1):e20.
36. Davies PD, Yew WW, Ganguly D, Davidow AL, Reichman LB, Dheda K, et al. Smoking and tuberculosis: the epidemiological association and immunopathogenesis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(4):291-8.
37. Thomas A, Gopi PG, Santha T, Chandrasekaran V, Subramani R, Selvakumar N, et al. Predictors of relapse among pulmonary tuberculosis patients treated in a DOTS programme in South India. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9(5):556-61.

38. d'Arc Lyra Batista J, de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque M, de Alencar Ximenes RA, Rodrigues LC. Smoking increases the risk of relapse after successful tuberculosis treatment. *Int J Epidemiol*. 2008;37(4):841-51.
39. Benard G, Duarte AJ. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. *Clin Infect Dis*. 2000;31(4):1032-9.
40. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001;13(4):248-52.
41. Lemle A, Wanke B, Miranda JL, Kropf GL, Mandel MB, Mandel S. Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). An analysis of the obstructive defect. *Chest*. 1983;83(5):827-8.
42. de Pina DR, Alvarez M, Giacomini G, Pavan ALM, Guedes CIA, Cavalcante RS, et al. Paracoccidioidomycosis: level of pulmonary sequelae in high resolution computed tomography images from patients of two endemic regions of Brazil. *Quant Imaging Med Surg*. 2017;7(3):318-25.
43. Verli FD, Marinho SA, Souza SC, Figueiredo MA, Yurgel LS. [Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of São Lucas Hospital, Pontifícia Universidade Católica of Rio Grande do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(3):234-7.
44. Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, et al. [Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(4):455-9.
45. de Camargo ZP, de Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17(2):41-8.
46. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458-62.
47. Floto RA, Smith KG. The vagus nerve, macrophages, and nicotine. *Lancet*. 2003;361(9363):1069-70.
48. van der Zanden EP, Hilbers FW, Verseijden C, van den Wijngaard RM, Skynner M, Lee K, et al. Nicotinic acetylcholine receptor expression and susceptibility to cholinergic immunomodulation in human monocytes of smoking individuals. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(4):255-65.
49. Shang S, Ordway D, Henao-Tamayo M, Bai X, Oberley-Deegan R, Shanley C, et al. Cigarette smoke increases susceptibility to tuberculosis--evidence from in vivo and in vitro models. *J Infect Dis*. 2011;203(9):1240-8.
50. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R, et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(3):148-55.
51. Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol*. 2011;49(3):225-36.
52. Cavalcante ReS, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between itraconazole and cotrimoxazole in the treatment of paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4):e2793.
53. Kashino SS, Calich VL, Burger E, Singer-Vermes LM. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia*. 1985;92(3):173-8.

54. Singer-Vermees LM, Burger E, Franco MF, Di-Bacchi MM, Mendes-Giannini MJ, Calich VL. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol.* 1989;27(2):71-82.
55. Fava Netto C, Vegas V, Sciammaméa I, Guarnieri D. Antígeno polissacarídeo do *Paracoccidoides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *Paracoccidoides brasiliensis*, necessário ao preparo do antígeno.: *Rev Inst Adolfo Lutz*; 1969. p. 177-81.
56. Cano LE, Singer-Vermees LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun.* 1995;63(5):1777-83.
57. Hizume DC, Toledo AC, Moriya HT, Saraiva-Romanholo BM, Almeida FM, Arantes-Costa FM, et al. Cigarette smoke dissociates inflammation and lung remodeling in OVA-sensitized and challenged mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012;181(2):167-76.
58. Biselli PJ, Lopes FD, Moriya HT, Rivero DH, Toledo AC, Saldiva PH, et al. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(5):460-8.
59. Stewart RD, Baretta ED, Platte LR, Stewart EB, Kalbfleisch JH, Van Yserloo B, et al. Carboxyhemoglobin levels in American blood donors. *JAMA.* 1974;229(9):1187-95.
60. Mariano M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995;37(2):161-76.
61. Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994;13(11):908-14.
62. Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GA, Hernández Pando R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2002;128(2):229-37.
63. Phyu S, Mustafa T, Hofstad T, Nilsen R, Fosse R, Bjune G. A mouse model for latent tuberculosis. *Scand J Infect Dis.* 1998;30(1):59-68.
64. Shaler CR, Horvath CN, McCormick S, Jeyanathan M, Khera A, Zganiacz A, et al. Continuous and discontinuous cigarette smoke exposure differentially affects protective Th1 immunity against pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2013;8(3):e59185.
65. Gentry-Nielsen MJ, Top EV, Snitily MU, Casey CA, Preheim LC. A rat model to determine the biomedical consequences of concurrent ethanol ingestion and cigarette smoke exposure. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(7):1120-8.
66. Sopori ML, Kozak W, Savage SM, Geng Y, Kluger MJ. Nicotine-induced modulation of T Cell function. Implications for inflammation and infection. *Adv Exp Med Biol.* 1998;437:279-89.
67. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):372-7.
68. Holt PG, Keast D. Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals. *Bacteriol Rev.* 1977;41(1):205-16.
69. Arnsen Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2010;34(3):J258-65.
70. Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of

- alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol.* 2001;167(11):6518-24.
71. Singh N, Perfect JR. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(6):395-401.
72. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 2003;421(6921):384-8.
73. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* 2007;117(2):289-96.
74. Tracey KJ, Abraham E. From mouse to man: or what have we learned about cytokine-based anti-inflammatory therapies? *Shock.* 1999;11(3):224-5.
75. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun.* 1997;65(1):298-304.
76. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol.* 2000;156(5):1811-20.
77. Gaschler GJ, Skrtic M, Zavitz CC, Lindahl M, Onnervik PO, Murphy TF, et al. Bacteria challenge in smoke-exposed mice exacerbates inflammation and skews the inflammatory profile. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(8):666-75.
78. Lin HH, Ezzati M, Chang HY, Murray M. Association between tobacco smoking and active tuberculosis in Taiwan: prospective cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(5):475-80.
79. Hance AJ, Basset F, Saumon G, Danel C, Valeyre D, Battesti JP, et al. Smoking and interstitial lung disease. The effect of cigarette smoking on the incidence of pulmonary histiocytosis X and sarcoidosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;465:643-56.



## Anexos

## Anexo I. Aprovação da Comissão de Ética no uso de animais em pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO  
**COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA**  
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470  
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil  
Telefone: (55-11) 3061-8650/7193 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e  
3062-2174  
e-mail: cpq-imt@usp.br



São Paulo, 02 de maio de 2013.

Ilmo. (a)

**Dr. Gil Benard**

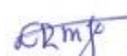
(aos cuidados de Renata Buccheri de Oliveira)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/169** "Efeito da exposição à fumaça de cigarro em modelo experimental murino na reativação de paracoccidiodomicose e sua contribuição para fibrose pulmonar", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

  
**Dr. Jorge Gasseb**  
Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

  
**Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman**

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO  
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470  
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br  
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 10 de março de 2017

Ilmo(a)  
Dr(a). Gil Benard  
(aos cuidados de Renata Buccheri de Oliveira)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o **adendo, referente à prorrogação** do projeto de pesquisa **CEUA-IMT/169** "Efeito da exposição à fumaça de cigarro em modelo experimental murino na reativação de paracoccidiodomicose e sua contribuição para fibrose pulmonar", com previsão de término em 01/12/2018.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb  
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO**  
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470  
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br  
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 05 de outubro de 2018

Ilmo(a)

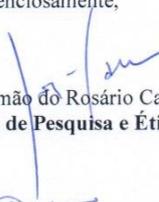
**Dr(a). Gil Benard**

(aos cuidados de Renata Buccheri de Oliveira)

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Efeito da exposição à fumaça de cigarro em modelo experimental murino na reativação de paracoccidiodomicose e sua contribuição para fibrose pulmonar.", registrada com o nº000169A, sob a responsabilidade de **Gil Benard** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei n. 11794, de 8 de outubro de 2008, do decreto n. 6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data. Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Nova data de prorrogação do Projeto: **01/07/2020**

Atenciosamente,

  
Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb  
**Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP**

  
Dra. Luciana Regina Mefreles Jaguaribe Ekman  
**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP**

## Anexo II. Aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito da exposição à fumaça de cigarro em modelo experimental murino na reativação da paracoccidioidomicose e sua contribuição para fibrose pulmonar”, registrada com o nº 066/17, sob a responsabilidade de **Gil Benard e Renata Buccheri de Oliveira**, apresentada pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 24.05.17

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-01-2016 Término: 01-01-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	Não se aplica
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 24 de Maio de 2017

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

### Anexo III. Súmula curricular de Renata Buccheri de Oliveira

De acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Patologia (resolução CoPGr 6882, de 25 de agosto de 2014, item VIII.3), anexo abaixo minha súmula curricular com ênfase na formação e produção científica.

#### A) Formação

Graduada em Medicina pela Faculdade de Ciências Médica de Santos (2009). Cursou residência médica em Infectologia no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (2013). Atuou entre 2013 a 2020 como médica assistente da unidade de internação hospitalar e como preceptora dos residentes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Iniciou suas atividades no seu projeto de Doutorado em 2014 e matriculou-se no programa de Patologia da FMUSP em 2017. Exerceu atividade como médica do Centro de Pesquisa Clínica do HCFMUSP entre 2018 a 2020. Desde o início de 2020, atua com Coordenadora Científica do programa REDS-V-P na Vitalant Research Institute, San Francisco, CA.

#### B) Produção Científica

1. Leal F, Mendes-Correa MC, Buss LF, Costa SF, Bizario JCS, Souza SRP, Thomaz O, Tozetto-Mendoza TR, Villas-Boas LS, Oliveira LC, Grespan RMZ, Capuani L, **Buccheri R**, Domingues H, Alexander N, Mayaud P, Sabino EC. (2020). Clinical features and natural history of the first 2073 suspected COVID-19 cases in the Corona São Caetano primary care programme: a prospective cohort study. *BMJ Open*;0:e042745.
2. Tahmasebi R, Tahmasebi R, Luchs A, Tardy K, Hefford PM, Tinker RJ, Eilami O, de Padua Milagres FA, Brustulin R, Teles MDAR, Dos Santos Morais V, Moreira CHV, **Buccheri R**, Araújo ELL, Villanova F, Deng X, Sabino EC, Delwart E, Leal É, Charlys da Costa A. (2020). Viral gastroenteritis in Tocantins, Brazil: characterizing the diversity of human adenovirus F through next-generation sequencing and bioinformatics. *J Gen Virol*.
3. Chagas, OJ, **Buccheri R**, de Souza Carvalho Melhem M, Szeszs W, Martins MA, de Oliveira L, Marcusso R, Santos DW. (2020). Usefulness of Yeast Cell Counting and Lack of Clinical Correlation of the Antifungal Susceptibility Testing Results in Management of Aids-associated Cryptococcal Meningitis. *Curr Fungal Infect Rep*, 14, 1–8.

4. Kallas EG, D'Elia Zanella LGFAB, Moreira CHV, **Buccheri R**, Diniz GBF, Castiñeiras ACP, Costa PR, Dias JZC, Marmorato MP, Song ATW, Maestri A, Borges IC, Joelsons D, Cerqueira NB, Santiago E Souza NC, Morales Claro I, Sabino EC, Levi JE, Avelino-Silva VI, Ho YL. (2019). Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*, 19(7), 750-758.
5. Queiroz-Telles F, **Buccheri R**, Benard G. (2019). Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. *J Fungi (Basel)*, 5(1). pii: E8.
6. Taborda CP, **Buccheri R**, Benard G, Duarte-Neto AN, Nosanchuk JD, Travassos LR. (2018). Paracoccidioides spp. and Histoplasma capsulatum: Current and New Perspectives for Diagnosis and Treatment. *Curr Top Med Chem*, 18(15), 1333-1348.
7. Soares LB, **Buccheri R**, Palhares RB, Duarte-Neto AN. (2018). Fatal disseminated cytomegalovirus infection with necrotizing oophoritis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Autops Case Rep*, 8(3), e2018029.
8. **Buccheri R**, Morais VDS, Kamikawa CM, Vidal MSM, Naves G, Del Negro GMB, Vicentini AP, Benard G. (2018). Case Report: Misleading Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis in a Young Patient with the Acute Form Disease: *Paracoccidioides brasiliensis* or *Paracoccidioides lutzii*? *Am J Trop Med Hyg*, 98(4):1082-1085.
9. **Buccheri R**, Benard G. (2018). Opinion: Paracoccidioidomycosis and HIV Immune Recovery Inflammatory Syndrome. *Mycopathologia*, 183(3), 495-498.
10. Lomes NR, Melhem MS, Szeszs MW, Martins Mdos A, **Buccheri R**. (2016). Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: A Brazilian case series. *Med Mycol*, 54(7), 669-76.
11. **Buccheri R**, Khoury Z, Barata LC, Benard G. (2016). Incubation Period and Early Natural History Events of the Acute Form of Paracoccidioidomycosis: Lessons from Patients with a Single Paracoccidioides spp. Exposure. *Mycopathologia*, 181(5-6), 435-9.

12. **Buccheri R**, Kassab MJ, Freitas VL, Silva SC, Bezerra RC, Khoury Z, Shikanai-Yasuda MA, Vidal JE. (2015). CHAGASIC MENINGOENCEPHALITIS IN AN HIV INFECTED PATIENT WITH MODERATE IMMUNOSUPPRESSION: PROLONGED SURVIVAL AND CHALLENGES IN THE HAART ERA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 57(6), 531-5.
13. Nobrega de Almeida Júnior J, **Buccheri de Oliveira R**, Duarte A, Lopes Motta A, Rossi F, Sachiko Yamamoto de Figueiredo D, Barbaro Del Negro GM, Aoki V, Wakisaka Maruta C, Giuli Santi C, Benard G. (2015). Trichosporon inkin as an Emergent Pathogen in Patients With Severe Pemphigus. *JAMA Dermatol*, 151(6), 642-5.
14. **de Oliveira RB**, Atobe JH, Souza SA, de Castro Lima Santos DW. (2014). Epidemiology of invasive fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome at a reference hospital for infectious diseases in Brazil. *Mycopathologia*, 178(1-2), 71-8.