

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

II — Infecção experimental do cão

Eduardo Nascimento MÓS (1), Celeste FAVA NETTO (2), Adayr Mafuz SALIBA (3)
e Thales de BRITO (4)

RESUMO

Foram inoculados, por via testicular, 14 cães com a variante cerebriforme de amostra do *Paracoccidoides brasiliensis*. Todos apresentavam sorologia negativa, para blastomicose sul-americana, antes da inoculação. Após a inoculação todos se tornaram positivos pela reação de fixação do complemento, enquanto que, pela reação de precipitação não foram revelados anticorpos em nenhum dos animais. Através do exame microscópico direto realizado em material colhido do testículo inoculado e pela histopatologia, foi possível demonstrar a presença do *Paracoccidoides brasiliensis*, do 3.º ao 20.º dia após a inoculação, bem como as lesões características. A infecção experimental do testículo do cão parece evoluir espontaneamente para a cura a despeito do crescente aumento dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento até 90 dias após a inoculação.

INTRODUÇÃO

São relativamente pouco numerosas as pesquisas visando demonstrar a suscetibilidade ao *Paracoccidoides brasiliensis*, de diferentes espécies animais, através da inoculação experimental.

O cobaio tem sido o animal mais frequentemente utilizado na reprodução de lesões experimentais principalmente através da inoculação testicular. Em tais inoculações utilizou-se material proveniente de lesões dos pacientes e também suspensões do fungo adaptado à vida saprofítica. Assim, LUTZ¹⁴, SPLENDORE²⁰, MONTENEGRO¹⁶, ALMEIDA^{1, 2, 3}, CLAUSEL⁶, GONÇALVES & FIALHO¹³, FIALHO & GONÇALVES¹², PERYASSU¹⁹, CURBAN^{7, 8}, FAVA NETTO & col.¹¹, BRITO & FAVA NETTO⁴, MACKINNON¹⁵, CARBONNEL & RODRIGUES⁵, utilizaram esta espécie animal.

No trabalho de SPLENDORE²⁰, encontra-se referência da inoculação em cães de material proveniente de 3 casos de blastomicose, ao lado da inoculação em gatos, cobaios e macacos, sem qualquer sucesso na reprodução experimental da doença.

PEREIRA & VIANNA¹⁸ inocularam com pus, proveniente de um paciente de blastomicose, diversas espécies animais e o cão por via peritoneal. Referem que o cão morreu 21 dias após a inoculação apresentando quadro anátomo-patológico semelhante àquele do paciente que fornecera o material.

Não encontramos na literatura, que pudemos consultar, outras referências sobre inoculação experimental do *Paracoccidoides brasiliensis* no cão.

- (1) Prof. Assistente-doutor. Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
- (2) Prof. Titular. Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
- (3) Prof. Titular. Departamento de Patologia e Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.
- (4) Prof. Livre-docente. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, Brasil.

Tendo em vista o que ocorre na blastomicose norte-americana onde o cão já foi encontrado infectado naturalmente centenas de vezes e podendo, portanto, desempenhar importante papel na epidemiologia da doença, resolvemos encetar pesquisas visando esclarecer o papel dos cães na paracoccidiodomicose. Em trabalho anterior Mós & FAVA NETTO¹⁷ demonstraram a ocorrência de reações sorológicas positivas em cães de São Paulo e de Botucatu.

O presente trabalho visa contribuir ao assunto, demonstrando a suscetibilidade dos cães à infecção experimental, bem como a conversão das provas sorológicas de negativas a positivas em tais animais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Cães* — Foram utilizados 14 cães de procedência variável, originalmente negativos às reações de fixação do complemento e de precipitação em tubos, padronizados para a paracoccidiodomicose por FAVA NETTO^{9,10}.

2. *Amostra de Paracoccidiodoides brasiliensis* — Para a inoculação foi usada a amostra S/N do *Paracoccidiodoides brasiliensis*, obtida da Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Pelo cultivo a 37°C em meio de cultura proposto por FAVA NETTO⁹, a amostra foi transformada em variante cerebriforme.

3. *Inoculação experimental* — Catorze cães foram inoculados por via intratesticular, com 0,25 ml de suspensão de células leveduriformes, da amostra S/N de *Paracoccidiodoides brasiliensis*. As suspensões foram padronizadas segundo o tubo 3 da escala de McFarland.

4. *Coleta de amostras de sangue* — A fim de pesquisar anticorpos circulantes nos soros dos animais inoculados, os mesmos foram sangrados a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 60 e 90 dias após a inoculação. Os animais foram sangrados por via arterial (artéria femoral), para evitar hemólise retirando-se com seringa e agulhas bem secas e estéreis, 20 ml de cada. O sangue era recolhido em tubos esterilizados de 15 x 150

mm e mantido à temperatura ambiente durante duas horas, após o que era guardado na geladeira a 2-4°C até o dia seguinte quando os soros eram separados esterilmente. Estes eram em seguida conservados a -20°C até o momento do uso, quando eram inativos a 56°C durante 30'.

5. *Reação de fixação do complemento* — Realizada pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER²¹ como padronizada por FAVA NETTO^{9,10} para o sistema paracoccidiodomicose, utilizando como antígeno, polissacarídeo extraído de células leveduriformes de várias amostras de *Paracoccidiodoides brasiliensis*.

6. *Reação de precipitação* — Realizada em tubos de ensaio, de acordo com técnica descrita por FAVA NETTO¹⁰ utilizando como antígeno, o mesmo polissacarídeo usado na reação de fixação do complemento.

7. *Anatomia patológica* — Os animais eram sacrificados por ação de choque elétrico (110 volts), obedecendo o esquema de sacrifício, aos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 60 e 90 dias após a inoculação. Após o sacrifício eram necropsiados. Foram colhidos fragmentos dos órgãos que apresentaram lesões suspeitas. Estes fragmentos foram fixados em formol neutro a 10% e no líquido de Bouin, incluídos em parafina, cortados em cortes de 5-6 "micra" de espessura e corados pelos métodos de hematoxilina-eosina e reativo de P.A.S.

8. *Exame microscópico direto* — Tanto dos fragmentos de órgãos suspeitos como dos testículos foi feita a tentativa de encontro de parasitas através de exame microscópico direto. O exame consistia na deposição da secreção polpar dos órgãos e dos testículos lesados sobre lâmina desengordurada, adicionada ou não de uma gota de KOH a 30% e coberta por lamínula desengordurada examinando-se ao microscópio com objetivas secas.

RESULTADOS

1. *Reações sorológicas* — Os resultados obtidos pelo exame dos soros dos cães inoculados, podem ser vistos na Tabela I. De

TABELA I

Resultados dos exames sorológicos realizados em 11 cães, inoculados experimentalmente

N.º	Data (Inoculação)	Data (Sangrias)	RFC	PP	Data do sacrifício
2	9-05-1972	11-05-1972	3,2	—	11-05-1972
3	9-05-1972	12-05-1972	3,0	—	12-05-1972
4	26-05-1972	30-05-1972	3,2	—	30-05-1972
5	26-05-1972	31-05-1972	25,0	—	31-05-1972
6	09-05-1972	15-05-1972	82,0	—	15-05-1972
7	26-05-1972	02-06-1972	4,8	—	02-06-1972
10	01-02-1972	10-02-1972	125,0	—	10-02-1972
11	01-02-1972	10-02-1972	25,0	—	19-02-1972
		19-02-1972	15,0	—	
12	01-02-1972	10-02-1972	16,0	—	29-02-1972
		19-02-1972	44,0	—	
		29-02-1972	92,0	—	
13	01-02-1972	10-02-1972	36,0	—	28-03-1972
		19-02-1972	28,0	—	
		29-02-1972	36,0	—	
		28-03-1972	190,0	—	
14	01-02-1972	10-02-1972	15,0	—	28-04-1972
		19-02-1972	24,0	—	
		29-02-1972	123,0	—	
		28-03-1972	250,0	—	
		28-04-1972	288,0	—	

N.º = Número do cão

PP = Reação de precipitação

RFC = Reação de fixação do complemento

acordo com esses resultados, os soros foram sempre positivos para a reação de fixação do complemento e inteiramente negativos à reação de precipitação. Salvo em duas ocasiões, os soros mostraram sempre um aumento consistente em função do tempo, após a inoculação. As primeiras reações positivas apareceram logo dois dias após a inoculação e mantiveram-se em título elevado até 90 dias a contar do exame inicial. Os animais que puderam ser mantidos por mais tempo após a inoculação experimental, apresentaram títulos de anticorpos fixadores do complemento bastante elevados.

2. *Estudo anátomo-patológico* — Os principais achados microscópicos nos primeiros dez dias são os mesmos assinalados por FAVA

NETTO & col.¹¹ no cobaio conforme se segue: No exame histopatológico do testículo, 24 horas após a inoculação observamos processo inflamatório agudo com infiltrado neutrofílico, acompanhado por edema e congestão acentuadas. O processo inflamatório agudo se propagou para a circunvizinhança, atingindo o interstício epididimário com as mesmas características. Os parasitas, dificilmente evidenciados, apresentavam-se em número reduzido, sendo raras as formas em reprodução. Após 48 horas, da inoculação observamos que surgiu, de permeio aos neutrófilos, número maior de linfócitos e células histiocitárias de citoplasma basófilo e núcleo vesiculoso, havendo, portanto, tendência à decaída do quadro agudo inespecífico. A demonstração de parasitas ainda é difícil.

Este quadro se estende até aproximadamente o décimo dia, quando então verificamos, em determinadas áreas, formas típicas de *Paracoccidioides brasiliensis*, em reprodução. A espermatogênese apresenta-se parcialmente preservada. O exame histológico do testículo, após 20 dias, mostrou que o mesmo não apresentava espermatogênese, com infiltrado crônico mononuclear, ao lado de fibrose difusa moderada e edema. O número de parasitas já se apresenta menor, sendo dificilmente demonstrados. Na proximidade do epidídimo a fibrose é acentuada, tendendo a circunscrever pequenos abscessos ao lado de áreas onde o processo inflamatório é mais crônico, por células mononucleares, particularmente histiócitos e plasmócitos. Após 30 dias o processo torna-se eminentemente crônico intersticial no testículo, acompanhado de aspermatogênese. Está caracterizado por grandes acúmulos de linfócitos, plasmócitos e centrados às vezes, por pequenos agrupamentos de neutrófilos. Parasitas são visíveis porém raramente. Na periferia do processo verificamos fibrose relativamente intensa, acompanhada de modificações vasculares, particularmente, espessamento de parede de vasos de calibre médio. No exame do testículo inoculado há 60 dias verificamos aspermatogênese, apresentando no interstício, em focos, discreto infiltrado inflamatório crônico mononuclear. O processo é particularmente evidente na periferia, próximo à cápsula. Neste caso não encontramos granulomas nem a presença de parasitas.

3. *Exame microscópico direto* — O exame direto a fresco da secreção do tecido testicular dos cães inoculados revelou a presença de parasitas a partir do terceiro dia de inoculação, até o vigésimo, conforme se pode verificar na Tabela II. Foi feito exame também da serosidade polpar de gânglios linfáticos, sub-linguais, maxilares, axilares, mediastínicos e mesentéricos, não tendo sido encontrados parasitas em nenhum dos casos.

DISCUSSÃO

Verificamos acentuada discordância relacionada com as reações sorológicas empregadas. Enquanto a reação de fixação do complemento revelou-se positiva a partir de

TABELA I

Resultado do exame direto a fresco para a pesquisa de parasitas no testículo de cães inoculados com *P. brasiliensis*

N.º cão	Horas ou Dias após a inoculação	Presença de parasitas
1	24 horas	—
2	48 horas	—
3	72 horas	—
4	4 dias	+
5	5 dias	++
6	6 dias	++
7	7 dias	+++
8	8 dias	+++
9	9 dias	+++
10	10 dias	+++
11	20 dias	+
12	30 dias	—
13	60 dias	—
14	90 dias	—

dois dias após a inoculação, a reação de precipitação foi negativa em todos os soros (Tabela I). A inexistência de outras experiências em cães, usando tais reações como métodos de diagnóstico, não nos permite tirar conclusão quanto à validade dos mesmos. Na espécie humana, no entanto, a associação dessas duas provas sorológicas permitiu revelar anticorpos nos soros de 98,4% dos pacientes de blastomicose sul-americana (FAVA NETTO¹⁰).

Embora o número de soros examinados não seja significativo, notamos que os anticorpos fixadores do complemento apareceram já dois dias após a inoculação (Tabela I). Da análise da evolução imunológica, verificamos que os exames sorológicos, sucessivos no mesmo animal, revelaram um aumento nos títulos de anticorpos fixadores do complemento, exceção feita a dois casos: os cães de números 11 e 13, cujos títulos caíram de 25 para 15 e de 36 para 28 entre o décimo e o vigésimo dia após a inoculação, respectivamente. O estudo dos resultados dos exames sorológicos (Tabela I), mostra não ter havido uma correspondência perfeita com o tipo de infecção localizada, uma vez que seria de se esperar a elevação rápida dos anticorpos pela inoculação e desenvolvimento da lesão, assim como a sua queda, também rápida, pela cura ou cicatrização da lesão. Os resultados, porém, mostram que, ao invés

de uma queda brusca dos anticorpos, compatível com a concomitante cura clínica e histopatológica, houve elevação dos anticorpos como se o processo caminhasse para a generalização.

Pudemos observar a sensibilidade do cão ao *P. brasiliensis*, fato, aliás, provado desde 1911 por PEREIRA & VIANA¹⁸. Notamos que as inoculações por via testicular resultaram, à semelhança do que ocorre com a cobaia (BRITO & FAVA NETTO⁴), em doença do tipo localizado. Foi observada uma reação histiocitária precoce com tendência para aumento do infiltrado neutrofílico. A supuração existente entre o sexto e trigésimo dias é dependente, exclusivamente, do *P. brasiliensis* e, nunca, devido a uma infecção secundária, uma vez que nunca foram encontrados, nas preparações realizadas após o sacrifício dos animais, outros microrganismos. Não verificamos nenhum caso de fistulização através da pele ou por meio de ruptura testicular com acúmulos de material infectante, como foi registrado no cobaio. Vinte dias após a inoculação (Tabela II), notamos que o número de parasitas encontrava-se em diminuição, sendo que os mesmos parecem ter desaparecido aos 60 dias. Este fato pareceu-nos importante, pois FAVA NETTO & col.¹¹ observaram parasitas, em cobaio, 193 dias após a inoculação.

SUMMARY

Contribution to the study of Paracoccidioidomycosis. II — Experimental infection of the dog

Intratesticular inoculation with a suspension of yeast phase of a strain of *Paracoccidioides brasiliensis* was performed in 14 dogs. Before inoculation all of them had negative serological tests for South American blastomycosis. After the inoculation all of them converted from negative to positive by the complement fixation test. By the precipitin reaction it was not possible to demonstrate this conversion. The etiological agent was found from 3th to 20th days after inoculation in the material obtained from the inoculated testicle. Characteristic histopathological lesions were also present.

The experimental infection of the dog testicle seems to have an expontaneous evolution to the cure although the titers of antibodies in the infected dog serum increase till 90 days after inoculation.

AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem a colaboração, que receberam durante a realização desta pesquisa, dos técnicos de laboratório Ida Mello Sciannaméa e Victor Salcedo Vega.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, F. P. — Lesões cutâneas da blastomycose em cobayos experimentalmente infectados. *An. Fac. Med. São Paulo* 3:3-8, 1928.
2. ALMEIDA, F. P. — Sobre a localização cutânea da "Blastomycose" em uma cobaia inoculada experimentalmente no testículo. *Scientia Med.* 6:173-174, 1928.
3. ALMEIDA, F. P. — Considerações sobre a inoculação cardíaca do *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. *Folia Clin. Biol.* (São Paulo) 8:67, 1936.
4. BRITO, T. & FAVA NETTO, C. — Disseminated experimental south American Blastomycosis of the guinea pig: a pathologic and immunologic study. *Path. Microbiol.* (Basel) 26:29-43, 1963.
5. CARBONNEL, L. M. & RODRIGUES, J. — Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and experimental inoculations. *J. Bact.* 90: 504-510, 1965.
6. CLAUSEL, D. T. — Estudo micológico e experimental de três casos de granuloma paracoccidioidico. *Arq. Dep. Est. Saúde R. G. do Sul* 3:81-87, 1942.
7. CURBAN, G. V. — Blastomycose brasileira experimental. *An. Brasil. Derm.* 25:115-116, 1949.
8. CURBAN, G. V. — Blastomycose brasileira experimental. Contribuição para o estudo da evolução no cobaio. *Rev. Paul. Med.* 36: 145-147, 1950.
9. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomycose sul-americana com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.* 18:197-254, 1955.

10. FAVA NETTO, C. — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. *Rev. Inst. Adolpho Lutz* (São Paulo) 21: 99-194, 1961.
11. FAVA NETTO, C.; BRITO, T. & LACAZ, C. da S. — Experimental South American Blastomycosis of the guinea pig. An Immunologic and pathologic study. *Path. & Microb.* (Basel) 24:192-206, 1961.
12. FIALHO, F. & GONÇALVES, A. P. — Contribuição ao estudo da blastomicose brasileira. Estudo experimental dessa micose no cobaio. *Hospital* (Rio) 30:397-408, 1946.
13. GONÇALVES, A. P. & FIALHO, F. — Contribuição ao estudo da blastomicose experimental do cobaio. *An. Brasil. Derm. Sif.* 21:260, 1946.
14. LUTZ, A. — Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brasil-Med.* 22:121-124, 1908.
15. MACKINNON, J. E. — Revision sobre observaciones experimentales y humanas demonstrativas del efecto de la temperatura en algunas micosis. *Torax* 13:266-270, 1964.
16. MONTENEGRO, J. — Acerca da inoculabilidade da blastomycose no Brasil. *Brasil-Med.* 41:808-812, 1927.
17. MÓS, E. N. & FAVA NETTO, C. — Contribuição ao Estudo da *Paracoccidioidomicose*. I — Possível papel epidemiológico dos cães: estudo sorológico e anátomo patológico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:154-159, 1973.
18. PEREIRA, M. & VIANA, G. — A propósito de um caso de blastomicose (Pyohemia Blastomycótica). *Arq. Brasil. Med.* 1:63-83, 1911.
19. PERYASSU, D. — O sistema retículo endotelial na blastomicose brasileira experimental do cobaio. *Rev. Brasil. Biol.* 6:265-305, 1946.
20. SPLENDORE, A. — Blastomycoses americanas. *Brasil-Med.* 24:153-157, 1910.
21. WADSWORTH, A. & col. — *Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health*. Albany, Williams & Wilkins, 1947, p. 375-387.

Recebido para publicação em 7/1/1974.