

JULIANA DE FARIA FRACON E ROMÃO

**MORFOLOGIA E MECÂNICA PULMONARES NO CURSO DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL INDUZIDA PELO *Paracoccidioides brasiliensis* EM
CAMUNDONGOS**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

BRASÍLIA - 2007

JULIANA DE FARIA FRACON E ROMÃO

**MORFOLOGIA E MECÂNICA PULMONARES NO CURSO DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL INDUZIDA PELO *Paracoccidioides brasiliensis* EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular (Imunologia aplicada), sob a orientação do Prof. Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcante Neto.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

BRASÍLIA - 2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a minha família, especialmente a minha filha Laura, ao meu esposo Leonardo, aos meus pais Celestino e Ruth, ao meu irmão Celestino Júnior, a minha cunhada Patrícia e aos meus sobrinhos Felipe e Rafael, por todo o apoio e ajuda incondicionais que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, pela vida e por tudo mais...
- Ao Prof. Dr. Florêncio Figueiredo e à Prof^a. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca.
- À Universidade Católica de Brasília – UCB, nas pessoas da Prof^a. MSc. Claudia Elaine Cestari de Souza e da Prof^a. MSc. Rosangela Fonseca Araújo, minhas amigas, e também aos funcionários e ex-funcionários Otacílio Alves dos Reis, Elem Virgínia Marques Soares e Ana Karina.
- À Universidade de Brasília – UnB, aos funcionários do Laboratório de Patologia e também aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina.
- À Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, a todos do Laboratório de Fisiologia da Respiração – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, especialmente ao Prof. Dr. Walter de Araújo Zin, e às alunas Flavia Mazzoli, Alba Barros, Halina Cidrini Ferreira e Viviane Cagido.
- À Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, nas pessoas do Prof. Dr. Mauro Teixeira e Dr. Remo de Castro Russo, do Laboratório de Imunofarmacologia.
- Às amigas Gislane Ferreira de Melo, Claudia Dias Leite e Renata da Nóbrega Souza.
- A toda a minha família e a todos os meus amigos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔE	Variação de elastância
ΔP_1	Queda rápida da pressão traqueal / variação de pressão relativa ao componente viscoso pulmonar
ΔP_2	Decaimento pressórico lento / variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo
ΔP_{tot}	Variação de pressão total
ΔV	Variação de volume gasoso mobilizado
aw	Referente às vias aéreas
BE	Excesso de base
C	Complacência
CD4 ⁺	Linfócitos T CD4 ⁺
CD8 ⁺	Linfócitos T CD8 ⁺
E	Elastância
Edyn	Elastância dinâmica
Est	Elastância estática
HCO ₃	Íon bicarbonato
L	Referente ao pulmão
P	Pressão
PaCO ₂	Pressão parcial do gás carbônico arterial
PaO ₂	Pressão parcial do oxigênio arterial
<i>Pb</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

PBS	Solução salina tamponada em fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose
PEEP	Pressão positiva ao final da expiração
Pel	Pressão de retração elástica
Pes	Pressão esofagiana
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Ponto de inflexão
PL	Pressão transpulmonar
Pmax	Pressão máxima
Pres	Pressão resistiva
Ptr	Pressão traqueal
R	Resistência
Req	Resistência total do equipamento
Rinit	Resistência pulmonar intrínseca
rs	Referente ao sistema respiratório
Rtis	Resistência tecidual
SaO ₂	Porcentagem de hemoglobina saturada pelo oxigênio
T	Tensão superficial
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
V	Volume
V'	Fluxo aéreo
Vt	Volume corrente
w	Referente à parede torácica
EPM	Erro padrão da média

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Montagem experimental.

Figura 2 – Método de Oclusão ao Final da Inspiração.

Figura 3 - Fotomicrografia de lesões de camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, após 15 dias.

Figura 4 - Fotomicrografia de lesões de camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, após 30 dias.

Figura 5 - Fotomicrografia de lesões de camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, após 45 dias.

Figura 6 - Fotomicrografia de lesões de camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, após 60 dias.

Figura 7 – Detecção da quimiocina KC do pulmão direito de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15, 30, 45 e 60 dias.

Figura 8 – Detecção da quimiocina MIP-1 α do pulmão direito de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15, 30, 45 e 60 dias.

Figura 9 – Detecção da quimiocina RANTES do pulmão direito de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15, 30, 45 e 60 dias.

Figura 10 – Detecção da quimiocina MIG do pulmão direito de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15, 30, 45 e 60 dias.

Figura 11 – Pressões resistivas ($\Delta P1$) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias.

Figura 12 – Pressões viscoelásticas/inomogêneas ($\Delta P2$) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias.

Figura 13 – Variações totais das pressões (ΔP_{tot}) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias.

Figura 14 – As barras claras representam as pressões resistivas (ΔP_1) e as barras escuras as pressões viscoelásticas/inomogêneas (ΔP_2) dos pulmões de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias. A coluna inteira representa a variação de pressão total (ΔP_{tot}).

Figura 15 – Elastância estática (Est) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias.

Figura 16 – Elastância dinâmica (Edyn) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias.

Figura 17 – Diferença entre as elastâncias estática e dinâmica (ΔE) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias.

Figura 18 – Elastância estática (Est), dinâmica (Edyn) e diferença entre as elastâncias (ΔE) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais nos grupos de acordo com os procedimentos realizados após a inoculação com o *P. brasiliensis*.

Tabela 2 - Resultados semi-quantitativos dos achados histopatológicos.

Tabela 3 – Volume corrente e fluxo aéreo de animais controle e infectados com *P. brasiliensis*.

Tabela 4 – Variação de pressão resistiva (ΔP_1), viscoelástica e/ou inhomogênea (ΔP_2) e total (ΔP_{tot}) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis*.

Tabela 5 – Elastância dinâmica ($E_{dyn,L}$) e estática ($E_{st,L}$) e diferenças entre as elastâncias dos pulmões de animais controle e infectados com *P. brasiliensis*.

Tabela 6 – Valores gasométricos de animais controle e infectados com *P. brasiliensis*.

SUMÁRIO

RESUMO	03
ABSTRACT	06
INTRODUÇÃO	09
1. Paracoccidiodomicose	10
1.1. Acometimento Pulmonar	19
2. Mecânica Respiratória	22
2.1. Estudo da Mecânica Respiratória	27
OBJETIVO	33
MATERIAIS E MÉTODOS	35
1. Cultura de fungo e Preparação do inóculo	36
2. Animais de Experimentação	36
3. Inoculação dos Animais	37
4. Grupos Experimentais	37
5. Análise Histopatológica dos Pulmões	39
6. Processamento das Amostras de Pulmão	39
7. Detecção de Quimiocinas no Pulmão	40
8. Mecânica Respiratória	41

8.1. Método utilizado para estudo da Mecânica Respiratória	45
9. Gasometria Arterial	49
10. Análise Estatística	50
RESULTADOS	51
1. Análise Histopatológica dos Pulmões	52
2. Detecção de Quimiocinas no Pulmão	59
3. Mecânica Respiratória	63
4. Gasometria Arterial	74
DISCUSSÃO	76
CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

RESUMO

No presente trabalho, camundongos BALB/c foram infectados por via endovenosa com leveduras viáveis do *P. brasiliensis* e foram analisadas a morfologia e a mecânica pulmonares no curso da infecção experimental causada pelo fungo, em diferentes ocasiões (15, 30, 45 e 60 dias após a infecção).

Os animais foram sedados, anestesiados e ventilados mecanicamente e foram mensuradas as elastâncias estática (Est), dinâmica (Edyn) e a diferença entre elas (ΔE), bem como as pressões resistivas ($\Delta P1$), viscoelásticas/inomogêneas ($\Delta P2$) e a variação total das pressões (ΔP_{tot}) dos pulmões, obtidas pelo método de oclusão ao final da inspiração. Foram coletadas amostras de sangue arterial para análise através da gasometria arterial dos parâmetros: potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial do oxigênio arterial (PaO_2), pressão parcial do gás carbônico arterial ($PaCO_2$), percentagem de hemoglobina saturada pelo oxigênio (SaO_2), excesso de base (BE) e íon bicarbonato (HCO_3). Após as coletas os animais foram sacrificados e os pulmões foram retirados e enviados para a análise histopatológica e para a dosagem de quimiocinas.

A análise histopatológica revelou resposta inflamatória progressiva, de padrão granulomatoso, com aumento na quantidade de fungos e formação de tecido fibroso, graduais ao desenvolvimento da infecção, comprometendo o tecido pulmonar. A dosagem de quimiocinas detectou a presença de MIP-1 α , RANTES, MIG e KC, com aumento significativo diretamente proporcional ao tempo de infecção. A presença de acidose mista seguida de acidose metabólica, com alterações mais acentuadas na fase aguda, foram observadas no sangue arterial. Na avaliação da

mecânica respiratória evidenciou-se aumento das elastâncias estática e dinâmica, da pressão viscoelástica/inomogênea e da variação total das pressões pulmonares.

Os resultados indicam que o comprometimento pulmonar é progressivo, com o estabelecimento de fibrose tecidual, determinando um padrão pulmonar provavelmente do tipo restritivo como consequência da redução da distensibilidade tecidual.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, camundongos, morfologia, mecânica respiratória.

ABSTRACT

In the present work, mice BALB/c were infected intravenously with variable yeast cells of *P. brasiliensis* and were analyzed the morphology and pulmonary mechanics in the course of the experimental infection caused by the fungus, at different occasions (15, 30, 45 and 60 days after infection).

Mice were sedated, anesthetized and mechanically ventilated and static (E_{st}) and dynamic (E_{dyn}) elastances, their differences (ΔE) and resistive (ΔP_1) and viscoelastic/inhomogeneous (ΔP_2) pressures and the total variation of pressures (ΔP_{tot}) of the lungs, were obtained by end-inflation occlusion method. Arterial blood samples were collected for arterial blood gas analysis of the parameters: hydrogenionic potential (pH), partial pressures of oxygen (PaO_2), and carbon dioxide ($PaCO_2$), oxygen saturation (SaO_2), base excess (BE) and bicarbonate (HCO_3). After the collecting data the animals were sacrificed and the lungs were removed and sent for histopathology and for the analysis of the concentration of chemokines.

Histopathology revealed progressive inflammatory response, leading to granuloma formation, with increase in the fungus counts and formation of fibrosis, gradual to the development of infection, compromising the pulmonary tissue. The dosage of chemokines detected the presence of: MIP-1 α , RANTES, MIG and KC, demonstrating significant increase Directly proportional to the time of infection. The presence of mist acidosis followed by metabolic acidosis, indicating alterations more pronounced in the acute phase, were observed in the arterial blood. In the avaluation of pulmonary mechanics showed increases in static and dynamic elastances and

increases in viscoelastic/inhomogeneous pressure and in the total variation of pressures of the lungs.

Results indicate that the lung injury is progressive, with the establishment of tissue fibrosis, probably determining a restrictive functional pattern as a result of lower distensibility of lung tissue.

Key-words: *Paracoccidioides brasiliensis*, mice, morphology, respiratory mechanics.

INTRODUÇÃO

1. PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A Paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica, não contagiosa, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (RESTREPO, 1985). O habitat natural desse fungo é ainda discutido, acredita-se que ele habita o solo e a vegetação de áreas geográficas úmidas, entrando no corpo pelo trato respiratório, por inalação (DEL NEGRO et al., 1982).

Na natureza o *P. brasiliensis* apresenta-se na forma de micélio à temperatura ambiente (23° a 26° C) que produz os conídios, as células infectantes. Uma vez inalados, os propágulos são transformados em células leveduriformes, a temperatura de cerca de 37° C, que constituirão sua forma parasitária nos tecidos do hospedeiro (MC EWEN et al., 1987; RESTREPO et al., 2001).

A infecção causada pelo *P. brasiliensis* é endêmica e tem distribuição geográfica restrita ao continente americano, prevalecendo nas Américas Central e Latina. A maior parte dos casos ocorre do México à Argentina, sendo o Brasil o país de maior prevalência seguido pela Colômbia e Venezuela. Esta doença representa um grande problema de saúde, sendo classificada como a primeira causa de morte por micoses sistêmicas e a oitava entre todas as doenças infecciosas e parasitárias (RESTREPO et al., 2001; COUTINHO et al., 2002).

Cerca de 80% dos casos relatados por Coutinho et al. (1998) aconteceram no Brasil com aproximadamente 200 mortes por ano, com as maiores incidências nos estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (COUTINHO et al., 1998). No Paraná, onde é diagnosticada em quase todo o estado, corresponde à 5ª causa de

óbitos por doenças dessa natureza e é onde está registrada a maior taxa de mortalidade por PCM do Sul (COUTINHO et al., 2002).

Estima-se que a incidência anual da micose em regiões de alta endemicidade situa-se entre 1-3 casos/100.000 habitantes (WANKE & LONDERO, 1994). O número estimado de pessoas infectadas em toda a área endêmica é de 10 milhões (MC EWEN et al., 1995), sendo que aproximadamente 2% desenvolvem a doença (RESTREPO, 1985).

Após o contato inicial do hospedeiro com o fungo, é gerada uma infecção assintomática detectada apenas por teste intradérmico com a paracoccidioidina ou por achado de necropsia, sendo que em áreas endêmicas mais de 60% dos indivíduos assintomáticos podem apresentar teste intradérmico positivo (RESTREPO, 1985).

A PCM acomete regularmente adultos com idades entre 30 e 60 anos e é raramente observada em crianças (3%) e em adultos jovens (10%) (LONDERO & RAMOS, 1990; BLOTTA et al., 1999). Ocorre mais frequentemente em homens que em mulheres (13:1) adultos, o que não é verificado na população pediátrica e pré-púbere (KERR et al, 1984; RESTREPO, 1985). Estudos verificaram que o fungo, sofrendo ação do hormônio feminino 17- β -estradiol, torna-se incapaz de transformar os propágulos em levedura, processo este importante para o estabelecimento da infecção (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1988).

Não existe predileção racial pela PCM que ocorre, com maior freqüência, em indivíduos que exercem ou exerceram atividades ligadas ao solo, particularmente, na agricultura (MARQUES et al., 1983; BLOTTA et al., 1999).

Aproximadamente 70% dos pacientes acometidos são agricultores (BORELLI, 1970; LACAZ et al., 1991; BLOTTA et al., 1999).

O primeiro relato da doença foi feito em 1908, por Lutz, que identificou o fungo e descreveu os dois primeiros casos de PCM em adultos. Em crianças a PCM foi descrita em 1911 por Montenegro. Antes de ter a denominação atual, nome consagrado em 1971, foi denominada de Blastomicose Brasileira, Blastomicose Sul-Americana, Doença de Lutz, Doença de Lutz-Splendore-Almeida, entre outras (LACAZ et al., 1982).

A via de transmissão da doença é a inalatória, com raros relatos de lesões primárias cutâneas, anal ou intestinal (RESTREPO, 1978; DOMMER et al., 1992; MONTENEGRO & FRANCO, 1994). No entanto, existe documentação comprobatória de transmissão acidental por inoculação cutânea do agente em laboratórios (WANKE & LONDERO, 1994).

Após a inalação do fungo, ocorre a formação de complexo primário nos pulmões e nódulos linfáticos hilares (FRANCO et al., 1987; MONTENEGRO & FRANCO, 1994), com disseminação linfática e/ou hematogênica para outros órgãos, simultaneamente (SAROSI & SCOTT, 2000), com três possibilidades evolutivas para essa lesão: regressão, com destruição do fungo e formação de cicatrizes estéreis; regressão, com persistência de fungos viáveis e formação de focos latentes; progressão, com desenvolvimento de sinais e sintomas da doença (FRANCO et al., 1987; 1993; MONTENEGRO & FRANCO, 1994).

Quando ocorre a progressão da infecção, são descritas duas formas clínicas da doença: a forma aguda ou subaguda (3 a 5% de todos os casos) e a forma crônica (mais de 90% dos pacientes). A forma aguda ou subaguda (forma

juvenil) é caracterizada por evolução rápida e grave e acomete crianças, adolescentes e adultos jovens, de ambos os sexos (MENDES, 1994), envolvendo principalmente o sistema retículo-endotelial, evoluindo com deterioração do estado geral com progressão para doença sistêmica (GIRALDO et al., 1976; FRANCO et al., 1987; BRUMMER et al., 1993). A forma crônica (tipo adulto) é a forma mais comum e apresenta duração prolongada, de evolução lenta e gradual, sendo considerada uma reativação de focos latentes do fungo, com lesões granulomatosas envolvendo apenas um órgão (unifocal) ou dois ou mais órgãos (multifocal) (RESTREPO et al., 1973; RESTREPO et al., 1976; LONDERO, 1986; FRANCO et al., 1987; LONDERO & RAMOS, 1990; BRUMMER et al., 1993).

A doença, na sua forma crônica, apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas e imunológicas que vão desde as formas localizadas ou benignas (pólo negativo ou anérgico) até aquelas graves e disseminadas (pólo positivo ou hiperérgico). Estudos demonstram que pacientes com a forma benigna ou localizada da doença apresentam imunidade celular preservada, poucos fungos nas lesões e baixos níveis de anticorpos, enquanto pacientes com a forma grave e disseminada apresentam altos níveis de anticorpos específicos, antígenos fúngicos circulantes, grande quantidade de fungos nas lesões e resposta imune celular deprimida (LACAZ et al., 1982).

Dados clínicos e experimentais indicam que a resposta imune celular é o principal mecanismo de defesa contra a infecção causada pelo *P. brasiliensis*, visto que os anticorpos específicos produzidos em grande quantidade não conferem proteção (CALICH & KASHINO, 1998; KASHINO et al., 2000; BERNARD et al., 2001; FORNARI et al., 2001; MARQUES MELLO et al., 2002).

A progressão da PCM está relacionada a uma série de fatores, que tanto podem estar relacionados com os próprios componentes do fungo quanto ao estado de imunocompetência do hospedeiro (SAN-BLAS et al., 1977a; SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977b; SAN-BLAS, 1982).

A resposta imune celular do hospedeiro frente à infecção causada pelo fungo é caracterizada pela formação de granuloma que impede a disseminação do fungo (FRANCO & MONTENEGRO, 1980; MIYAJI & NISHIMURA, 1983; DE BRITO & FRANCO, 1994). O granuloma paracoccidióidico é resultado de uma reação de hipersensibilidade tardia contra antígenos do agente infeccioso (WILLIAMS & WILLIAMS, 1983; DE BRITO & FRANCO, 1994; CHENSUE et al., 1994; ROMANI, 1997). Estudos demonstram que indivíduos com resposta imune celular deficiente apresentam lesões granulomatosas mal definidas, confluentes e com disseminação fúngica, enquanto que indivíduos imunocompetentes apresentam granulomas bem definidos, capazes de conter a disseminação fúngica (PERAÇOLI et al., 1982; MOSCARDI-BACCHI et al., 1989).

O granuloma pode ser classificado como compacto ou frouxo. O granuloma compacto é bem definido e resulta da formação de nódulos epitelióides maiores havendo fibrose e infiltrado inflamatório com linfócitos, plasmócitos e, às vezes, por eosinófilos, demonstrando aumento da resposta imune celular a antígenos específicos do fungo. O granuloma frouxo é mal definido, apresentando uma quantidade reduzida de células epitelióides e células gigantes, em meio a um infiltrado inflamatório rico em neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, caracterizando uma redução da resposta imune celular (PERAÇOLI et al., 1982; FRANCO & MONTENEGRO, 1980; DE BRITO & FRANCO, 1994).

Estudando as subpopulações de células que poderiam influenciar a resposta granulomatosa, Figueiredo et al. (1992) observaram que animais tratados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 apresentavam alterações no padrão granulomatoso. Os autores concluíram que apesar do granuloma resultar da interação do macrófago com constituintes do fungo, sua evolução é determinada pelos linfócitos T, sendo que as células T CD4+ promoveriam a maturação e diferenciação dos fagócitos mononucleares e as células T CD8+ contribuiriam para a eliminação do fungo. Cano et al. (2000) demonstraram que independentemente da susceptibilidade da linhagem do camundongo à infecção com o fungo, as células T CD8+ estavam envolvidas na destruição e no controle da disseminação do fungo para tecidos extrapulmonares, corroborando os achados de Figueiredo et al. (1992).

Vários estudos clínicos e experimentais sugerem que o macrófago é a principal célula componente do granuloma, visto que a sua ativação pelos linfócitos T produz citocinas e outros fatores que geram um granuloma competente com o objetivo de destruição e contenção do fungo, evitando sua disseminação pelo organismo (CANO et al., 1998; SOUTO et al., 2000; ARRUDA et al., 2002). O processo de ativação dos macrófagos envolve alterações morfológicas e capacitação para desenvolver inúmeras funções como a de apresentar antígenos aos linfócitos Th (ADAMS & MARIANO, 1984), de destruir células tumorais (ADAMS & HAMILTON, 1987) e de fagocitar e desenvolver atividades microbidas (DRAPIER & HIBBS, 1988).

Na ausência de citocinas os macrófagos servem como um meio de proteção através do qual o fungo pode sofrer replicação intracelular e disseminar dos pulmões para outros órgãos, como é observado na Histoplasmose (BRUMMER et al.,

1988a; 1988b; 1990; MOSCARDI-BACCHI et al., 1994; GONZALEZ et al., 2000; WOODS, 2003).

Entre as citocinas liberadas no tecido infectado nas fases iniciais da infecção estão os membros da família das citocinas quimioatraentes, conhecidas como quimiocinas. As quimiocinas são um grupo de pequenas moléculas capazes de induzir quimiotaxia em várias células incluindo os leucócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e fibroblastos (BORISH & STEINKE, 2003).

As citocinas e quimiocinas são proteínas secretadas com funções de crescimento, diferenciação e ativação que regulam e determinam a resposta imune natural e controlam o tráfego imune celular e o arranjo celular dos órgãos imunológicos (BORISH & STEINKE, 2003).

Existem atualmente mais de 40 quimiocinas e 18 receptores para estas moléculas. Originalmente, as quimiocinas foram descritas como citocinas inflamatórias, sendo produzidas no sítio de infecção ou em resposta a um estímulo pró-inflamatório, recrutando e ativando leucócitos que dão início à resposta imune celular (MOSER & LOETSCHER, 2001). Observou-se também que algumas quimiocinas têm papel importante na função homeostática e são expressas em órgãos e tecidos específicos, visto que podem ser produzidas por vários tipos de células e em vários locais (BORISH & STEINKE, 2003). Vale ressaltar que a sinalização via quimiocinas coordena a movimentação celular não apenas durante processos inflamatórios, mas também durante o tráfego de linfócitos, células dendríticas e células tronco hematopoiéticas (MOSER & LOETSCHER, 2001).

Acredita-se que as quimiocinas controlam a migração dos leucócitos para os tecidos. A circulação contínua dos linfócitos pelo sangue, tecidos e vasos

linfáticos de forma organizada os leva aos linfonodos onde encontram os antígenos e são transformados em células de memória que migram para o tecido inflamado para gerar imunidade. Nesta fase os macrófagos e eosinófilos também migram para o tecido (LUSTER, 1998).

As quimiocinas foram detectadas na maior parte dos órgãos durante a inflamação, tais como: pele, cérebro, articulações, meninges, pulmões, trato gastrointestinal, vasos sanguíneos, rins, entre outros. Elas foram também identificadas em vários tipos de células durante a inflamação nestes órgãos, sugerindo que quase todas, se não todas, as células podem secretar quimiocinas, desde que sejam adequadamente estimuladas. O principal estímulo para a produção de quimiocinas é as citocinas pró-inflamatórias (BAGGIOLINI et al., 1994; LUSTER, 1998).

As quimiocinas são agrupadas dentro de quatro subfamílias caracterizadas pela posição de resíduos de cisteínas do N-terminal da proteína: CXC, CC, C e CXXXC (CX₃C). Quando existem duas cisteínas adjacentes, a quimiocina é da família CC e, se existir um aminoácido entre elas, a classificação é CXC. A maior parte das quimiocinas conhecidas faz parte dessas duas famílias. A família C apresenta apenas uma cisteína, enquanto as quimiocinas da família CX₃C apresentam três aminoácidos entre as duas cisteínas. Esses grupos podem ser distinguidos pela célula alvo primária: para a família CXC as células alvo são os neutrófilos e linfócitos e na família CC as células alvo são os monócitos, eosinófilos e as células T (BORISH & STEINKE, 2003).

Uma determinada célula pode expressar múltiplos receptores de quimiocinas, cada um podendo induzir sinais específicos, sugerindo que cada receptor sinaliza através de diferentes caminhos. Esses receptores de quimiocinas são definidos por sua habilidade em sinalizar na ligação de um ou mais membros das quimiocinas, as citocinas quimiotáticas (PREMACK & SCHALL, 1996; BAGGIOLINI et al., 1997; YOSHIE et al., 1997; LUSTER, 1998; ZLOTNIK et al., 1999).

A maior parte dos receptores reconhecem mais de uma quimiocina mas são, quase sempre, restritos a uma única família. A sua nomenclatura segue a origem da família do receptor, por exemplo: para as famílias CC e CXC de quimiocinas humanas, os nomes dos receptores consistem da origem CCR ou CXCR, seguidos por um número (MURPHY et al., 2000).

Na PCM todos os órgãos envolvidos podem desenvolver fibrose, a qual interfere permanentemente no bem-estar e na qualidade de vida dos pacientes (MONTENEGRO & FRANCO, 1994; CAMPOS et al., 1984; 1991).

Os estudos de Franco et al. (1998), Restrepo et al. (1992), mais os de Kerr et al. (1988a e 1988b), Lenzi et al. (1994), Burger et al. (1996), Silva (1985), Silva e Fazioli (1985) e Silva et al. (1994) descreveram em detalhes as características da resposta inflamatória causada pelo *P. brasiliensis*, mas, também os elementos constitutivos da fibrose (COCK et al., 2000).

A fibrose parece ter início simultaneamente ao processo inflamatório e vai progredindo e se consolidando com a formação do granuloma (FIGUEIREDO et al., 1986; FRANCO et al., 1998; KERR et al., 1988a; 1988b; MONTENEGRO & FRANCO, 1994). Nos estágios avançados da resposta inflamatória ocorre o aumento na produção de algumas citocinas capazes de promover acúmulo de tecido conectivo

(FRIDMAN, 1993; HUNNINGHAKE & KALICA, 1995; MAQUART et al., 1994), o que resulta nas mudanças estruturais e funcionais nos tecidos envolvidos (FRIDMAN, 1993).

Várias citocinas e fatores de crescimento possuem importante papel na persistência da inflamação e na determinação da ocorrência ou não de fibrose. Fatores transformadores de crescimento (TGF) são citocinas complexas e podem ser produzidos por macrófagos, células epiteliais ou mesenquimais. O fator transformador do crescimento alfa (TGF- α) pode promover proliferação epitelial e aumentar produção de colágeno pelo fibroblasto, enquanto o fator transformador do crescimento beta (TGF- β) inibe a replicação de células epiteliais e aumenta a produção de fibronectina (SCHWARZ, 2001).

1.1 – ACOMETIMENTO PULMONAR

As lesões fibróticas mais freqüentes e incapacitantes ocorrem nos pulmões, onde podem aparecer várias anormalidades (ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; CAMPOS et al., 1991; GUTIÉRREZ et al., 1985; LONDERO & SEVERO, 1981).

O macrófago alveolar é a célula predominante no espaço alveolar. Além da função de defesa contra substâncias e microorganismos inalados, há evidências sugerindo que essa célula pode ter um papel na inflamação pulmonar e fibrose, aumentando em número e regulando citocinas (SOUZA et al., 2003).

Geralmente a lesão pulmonar está marcada por um incremento de vários componentes da matriz extracelular como os colágenos tipo I e III, proteoglicanas e glicoproteínas e, em forma tardia, de fibronectina. Esta última exerce efeitos estimulantes e quimiotáticos sobre os fibroblastos os quais induzem a um aumento na produção das fibras de colágeno, causando a fibrose (BÁRCENAS et al., 1999).

Segundo Franco et al. (1998) a fibrose pulmonar na PCM está associada à formação de granulomas e ao aumento no tecido do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e TGF- β , sugerindo um papel importante dessas citocinas na formação da fibrose pulmonar associada a doenças infecciosas granulomatosas crônicas.

Experimentos *in vitro* demonstraram que o TNF- α , TGF- β , interferon gama (IFN- γ) e as interleucinas IL-1 e IL-6, contribuem para a formação de fibrose tecidual (ELIAS et al., 1990; HUNNINGHAKE & KALICA, 1995).

Na PCM os sintomas respiratórios não são específicos e incluem: tosse, expectoração e dispnéia; também são observados: perda de peso, febre e anorexia. As lesões pulmonares evidenciadas pela radiografia de tórax são nodulares, infiltrantes, fibróticas ou cavitárias; geralmente bilaterais (CAMPOS et al., 1991; LONDERO, 1986; LONDERO & RAMOS, 1990; PATIÑO et al., 1987; RESTREPO et al., 1976). Os sinais e sintomas respiratórios são leves e não correspondem à extensão do comprometimento pulmonar revelado pela radiografia (ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; CAMPOS et al., 1991; CORREA et al., 1991; LONDERO & RAMOS, 1990; LONDERO & SEVERO, 1981; RESTREPO et al., 1976).

No trabalho realizado por Paniago (2000) observou-se que 50,7% dos pacientes (n=422) apresentavam comprometimento pulmonar e queixavam-se de tosse, e 91,6% das radiografias torácicas realizadas demonstravam alterações.

Alterações cardiopulmonares e dispnéia podem ser observadas em 60 a 80% dos pacientes refletindo repercussões intensas na função pulmonar (ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; CAMPOS et al., 1991; SAROSI & SCOTT, 2000).

Nos testes de função pulmonar a espirometria mostra, na maioria das vezes, um padrão obstrutivo difícil de ser atribuído a PCM isolada, visto que a maior parte dos pacientes é tabagista crônico (FUNARI et al., 1999) e podem apresentar doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) subjacente.

Lemle et al. (1983b) acompanharam 20 pacientes com diagnóstico de PCM e realizaram espirometria e gasometria arterial antes e depois do início do tratamento específico. Todos foram tabagistas e apresentavam infiltrados difusos na radiografia de tórax. Os resultados encontrados mostraram claramente que de 1 a 2 meses após o início do tratamento específico para PCM em pacientes com a forma pulmonar difusa da doença, a única alteração significativa na função pulmonar foi um aumento na capacidade vital, enquanto que a obstrução bem como a oxigenação do sangue arterial não foram alteradas pela terapia. Os autores concluíram que os infiltrados pulmonares causados pelo *P. brasiliensis* têm pouca influência sobre o componente obstrutivo, que é freqüentemente o principal elemento do distúrbio funcional na forma pulmonar difusa da doença, mas parece ser causado pela DPOC subjacente.

As considerações mais importantes no diagnóstico diferencial da PCM são quanto a Tuberculose. Clinicamente, em ambas, há presença de tosse, dispnéia,

fadiga e perda de peso. O diagnóstico de PCM deve ser suspeitado em pacientes que visitaram ou residiram em áreas endêmicas e nos quais as alterações no parênquima pulmonar forem bilaterais e simétricas e envolverem as três zonas pulmonares de forma similar. Já na Tuberculose as alterações têm distribuição predominante nos segmentos apical e posterior dos lobos superiores e nos segmentos superiores dos lobos inferiores (FUNARI et al., 1999). No entanto, não se deve desconsiderar a possibilidade de Tuberculose na qual a micose coexiste em 10% dos casos (ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; LONDERO & RAMOS, 1990) com base na distribuição de alterações no parênquima pulmonar. A radiografia de tórax pode ser, também, sugestiva de neoplasia, fibrose intersticial idiopática e outras entidades (ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; CAMPOS et al., 1991; LONDERO, 1986; LONDERO & RAMOS, 1990; RESTREPO et al., 1976).

Nos casos mais graves de PCM crônica o dano pulmonar pode causar insuficiência ventilatória (ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; CAMPOS et al., 1991).

2. MECÂNICA RESPIRATÓRIA

A mecânica do sistema respiratório é subdividida em dois sistemas elásticos: os pulmões e a parede torácica. Fazem parte da parede torácica todas as estruturas que se movem durante o ciclo respiratório, à exceção dos pulmões.

Para que haja ventilação, a pressão motriz do sistema, que é aquela gerada pela contração muscular durante a inspiração precisa vencer forças de

oposição, tais como: a) forças elásticas dos tecidos pulmonares e parede torácica (D'ANGELO et al., 1994); b) forças resistivas resultantes do fluxo de gás pelas vias aéreas e movimentação das moléculas constituintes do tecido pulmonar e dos tecidos da parede torácica (D'ANGELO et al., 1994); c) forças viscoelásticas dos tecidos pulmonares e da parede torácica (HILDEBRANDT, 1970); d) forças plastoelásticas responsáveis pela histerese (HILDEBRANDT, 1970); e) forças inerciais, dependentes da massa dos tecidos e dos gases (MEAD, 1961); f) forças gravitacionais (incluídas nas forças elásticas) (MILIC-EMILI, 1977) e g) forças de distorção da parede torácica. Contudo, durante a respiração basal, as forças inerciais e de distorção da parede são consideradas desprezíveis (RODARTE & REHDER, 1986).

A elasticidade é uma propriedade da matéria que permite ao corpo retornar à sua forma original após sofrer deformação por uma força aplicada sobre ele. Os tecidos dos pulmões e do tórax possuem propriedades elásticas e obedecem à lei de Hooke, segundo a qual um corpo é perfeitamente elástico quando, ao sofrer uma força distensora se deforma proporcionalmente, ou seja, a variação de comprimento (ou volume) é diretamente proporcional à força (ou pressão) aplicada até que seu limite elástico seja atingido. Dessa forma, quanto maior for a pressão gerada pelos músculos inspiratórios maior será o volume inspirado e a energia acumulada no sistema. Após cessar a força distensora, os tecidos retraem-se à sua posição original, processando-se, então, a expiração.

A relação entre a variação de volume gasoso mobilizado (ΔV) e a pressão motriz necessária para manter o sistema respiratório insuflado é conhecida como complacência do sistema respiratório (C_{rs}). Logo, $C_{rs} = \Delta V/P_{el,rs}$, onde $P_{el,rs}$

corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório. A complacência do pulmão, segundo West (2002), é em torno de 0,20 l/cmH₂O, sendo uma medida da elasticidade das paredes alveolares e é registrada como a mudança de volume produzida pela mudança na unidade de pressão.

A complacência pode ser interpretada quando o tórax e os pulmões encontram-se em movimento (complacência dinâmica) ou num determinado ponto entre a inspiração e a expiração (complacência estática). Ela é diferente em cada uma das fases da respiração, pois a pressão gerada para a entrada de uma certa quantidade de ar nos pulmões difere da pressão gerada para a saída dessa mesma quantidade de ar, sobretudo na parte mais central dessas fases.

O termo que é freqüentemente usado é elastância, ao invés de complacência. Esta, que corresponde ao inverso da complacência ($E_{rs} = 1/C_{rs}$), é a relação entre a variação de pressão e o volume mobilizado resultante. As elastâncias do pulmão (E_L) e parede torácica (E_w) são adicionadas diretamente: $E_{rs} = E_L + E_w$, enquanto que se somam os inversos das complacências: $1/C_{rs} = 1/C_L + 1/C_w$.

Além das propriedades elásticas dos tecidos pulmonares, os pulmões ainda apresentam um importante fator que contribui para as suas características elásticas: a tensão superficial das moléculas de água que recobrem a zona de troca gasosa. Na interface líquido-ar as moléculas do líquido são atraídas mais fortemente para o interior do líquido do que para a fase gasosa, atuando dessa forma no sentido de diminuir sua área, ou seja, a tensão superficial.

Considerando-se uma esfera, a pressão em seu interior (P) pode ser pré-determinada pela Lei de Laplace, onde a pressão relaciona-se com o raio e com a tensão superficial (T) da seguinte forma: $P = 4T/R$, onde o número quatro

representa duas interfaces ar-líquido (interna e externa). Entretanto, quando somente uma interface está envolvida, como em um alvéolo esférico revestido por líquido na sua face interna, o numerador tem o número 2 em lugar de 4. Considerando-se alvéolos de diferentes tamanhos conectados através de uma via aérea comum, e com tensão superficial semelhante, com base na Lei de Laplace, a pressão nos alvéolos menores seria maior do que nos alvéolos maiores. Conseqüentemente, os alvéolos menores se esvaziariam nos maiores, acarretando colapsos e hiperdistensões dos espaços aéreos. Contudo isso não ocorre nos pulmões normais, pois a tensão superficial do surfactante, líquido de composição protéica e principalmente fosfolipídica secretado pelos pneumócitos tipo II, é consideravelmente menor do que a da solução salina que recobre as mucosas pulmonares. Além disso, a tensão superficial do surfactante alveolar diminui acentuadamente com a aproximação entre as suas moléculas e cresce com o afastamento, ou seja, varia de acordo com o diâmetro dos alvéolos. Dessa forma, há um equilíbrio entre os alvéolos maiores e menores, podendo coexistir 300 milhões de alvéolos com a mesma pressão em seu interior.

Durante a movimentação do sistema respiratório, quando ocorre fluxo de gás, um elemento adicional ao elástico precisa ser vencido pela pressão motriz: a resistência ou pressão resistiva (Pres). A resistência do sistema respiratório (Rrs) pode ser calculada dividindo-se Pres,rs por fluxo aéreo. Pres,rs é a pressão resistiva do sistema respiratório, ou seja, a pressão oferecida por seus componentes resistivos. Semelhantemente à complacência, e pelas mesmas razões, a resistência do sistema respiratório pode ser subdividida em seus componentes pulmonar e de parede torácica.

A resistência pulmonar pode ser subdividida em dois subcomponentes: a resistência das vias aéreas (R_{aw}), que depende do fluxo de ar no interior dos pulmões, e a resistência tecidual (R_{tis}), que é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade (isto é, atrito) pertinente à movimentação do pulmão. A resistência das vias aéreas pode ser influenciada pela geometria da árvore traqueobrônquica, pelo volume pulmonar, pela complacência das vias aéreas, pela densidade e viscosidade do gás inspirado e pela musculatura lisa dos brônquios. A resistência tecidual depende da velocidade do deslocamento, o que é importante tanto durante a inspiração como na expiração. A resistência da parede torácica também é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade pertinente à movimentação de moléculas que constituem os tecidos da parede torácica. A resistência da parede torácica pode chegar a ser responsável por 30% da resistência total do sistema respiratório.

Além dos componentes elásticos e resistivos, o sistema respiratório apresenta também propriedades viscoelásticas, que atuam no tecido pulmonar e na parede torácica (BATES et al., 1988; 1989). A viscoelasticidade foi descrita a partir do comportamento de fios de seda, por Wilhem Weber em 1835. Esse tipo de material obedecia à lei da proporcionalidade entre a força aplicada e o alongamento resultante (Lei de Hooke), porém, apenas por um curto período de tempo após a aplicação da força. Quando a carga era aplicada por um tempo prolongado, o alongamento passava a aumentar continuamente. Substâncias viscoelásticas, quando mantidas sob deformação constante, apresentam uma queda da tensão, chamada de relaxamento de tensão ("*stress relaxation*"), ou simplesmente, relaxamento, quando o corpo é estirado. Por outro lado, sob uma tensão constante, o

corpo tende a se deformar continuamente com o decorrer do tempo, fenômeno chamado “*creep*”. Do ponto de vista morfofuncional, a viscoelasticidade ocorre ao nível do tecido pulmonar e da parede torácica e permite o intercâmbio de energia (pressão) entre o componente elástico e o resistivo (KOCHI et al., 1988). Por exemplo, durante uma pausa inspiratória, a energia potencial (pressão) acumulada no componente elástico pode ser dissipada na forma de calor no componente resistivo.

1. ESTUDO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

O método mais utilizado para estudar a mecânica do sistema respiratório, que vem sendo estudado e aperfeiçoado desde a década de 50, é a técnica da oclusão rápida da via aérea ao final da inspiração que consiste em ocluir as vias aéreas ao final de uma inspiração para medida da mecânica respiratória.

Segundo Mead e Whittenberger (1954) ao ocluir as vias aéreas, as forças dissipativas relacionadas ao fluxo deixam de existir restando apenas as forças relacionadas à elasticidade do sistema respiratório. A alteração da pressão observada imediatamente após a interrupção do fluxo representa a diferença de pressão existente entre a boca e o alvéolo justo antes da interrupção. Realizando-se múltiplas interrupções, em diferentes fases do ciclo respiratório, é possível registrar uma série de mudanças da pressão, que correlacionadas com o gradiente de pressão imediatamente após a oclusão e com as taxas de fluxo imediatamente antes da oclusão, obtêm-se as relações pressão-fluxo dentro do sistema respiratório.

Assim a resistência ao fluxo pode ser medida relacionando a variação de pressão com a variação de fluxo. Essa técnica, no entanto, caiu em desuso por superestimar os valores de resistência (MEAD & WHITTENBERGER, 1954).

Bates et al. (1985) reunindo as informações de Otis et al. (1956), Rattenborg e Holaday (1966) e Mount (1955) rerepresentaram o modelo originalmente proposto por Mount, na forma de um modelo físico composto por elementos elásticos representados por molas e os resistivos expressos por amortecedores. Os autores realizaram uma análise teórica do comportamento não homogêneo do sistema respiratório submetido a uma ventilação mecânica com fluxo inspiratório constante, seguido por uma oclusão súbita das vias aéreas. Imediatamente após a oclusão, ocorre uma queda rápida da pressão traqueal ($\Delta P_{1,rs}$), indo do seu valor máximo ($P_{max,rs}$) até um ponto de inflexão ($P_{i,rs}$), seguida por uma queda lenta ($\Delta P_{2,rs}$) até atingir um platô, que corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório ($P_{el,rs}$).

Com base no modelo de Bates et al. (BATES et al., 1988) a queda de pressão que ocorre imediatamente após a oclusão das vias aéreas, durante a insuflação pulmonar com fluxo constante, fornece a variação de pressão do sistema respiratório que seria obtida na ausência de desigualdades da constante de tempo e *stress relaxation*, ou seja, o componente viscoso ou homogêneo do sistema respiratório. A queda mais lenta de pressão, que ocorre subseqüentemente até atingir o platô, reflete a pressão dissipada em decorrência da viscoelasticidade e/ou inhomogeneidade do sistema, as quais são determinadas, respectivamente, pelo *stress relaxation* e *pendelluft* (BATES et al., 1985; 1988).

Stress relaxation é a capacidade do pulmão de se adaptar a uma insuflação mantida, apresentando redução da pressão em função do tempo. Quando permanece sob um comprimento constante (volume), o pulmão pode alterar sua tensão com o tempo, de forma que o gradiente de pressão diminui progressivamente. O *stress relaxation* ocorre após alterações súbitas do comprimento (ZIN et al., 1983). O *stress relaxation* depende do realinhamento da matriz extracelular e de perdas de energia nos tecidos pulmonares e na interface ar-líquido (HORIE & HILDEBRANDT, 1971). Já o *pendelluft* é a transferência de um pequeno volume de gás dos compartimentos pulmonares de maior pressão para os compartimentos de menor pressão, representando o reajuste estático das diferenças regionais no volume pulmonar resultantes das desigualdades de constante de tempo (BATES et al., 1985; OTIS et al., 1956).

No pulmão, vários fatores contribuem para o *stress relaxation*, tais como o fenômeno de abertura e fechamento das vias aéreas e espaços alveolares, e as perdas de energia nos tecidos e na interface ar-líquido. As fibras de colágeno e elastina, isoladamente, apresentam pouca adaptação ao estiramento, mas o arranjo da matriz fibro-elástica apresenta contribuição significativa para esse fenômeno. Alguns autores ressaltam o papel da interface ar-líquido como o principal determinante do *stress relaxation* no pulmão (HORIE & HILDEBRANDT, 1971).

As razões do comportamento não homogêneo da parede torácica não são completamente esclarecidas. A parede torácica pode se comportar como um sistema de dois compartimentos, um de baixa complacência, representado pela caixa torácica e outro de complacência mais elevada, o abdômen (PESLIN et al., 1975). Além disso, a pressão intrapleural não é uniforme em toda a cavidade torácica, sendo

afetada pela contração do diafragma e pela movimentação do abdômen (D'ANGELO et al., 1974). As propriedades mecânicas do sistema respiratório podem sofrer influência da parede abdominal, ajudando a explicar a queda não homogênea da pressão pleural após oclusão das vias aéreas. A abertura extensa da parede abdominal leva ao aumento da elastância e da resistência, provavelmente secundário à redistribuição de volumes gasosos no pulmão (ZIN et al., 1989).

O primeiro estudo em animais realizado de acordo com o proposto por Bates et al. (1985) com subdivisão dos componentes pulmonar e de parede, foi realizado por Saldiva et al. (1987). Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram a contribuição significativa da parede torácica para as desigualdades do sistema respiratório (AULER et al., 1987, ZIN et al., 1989), comprovando que elas podem ser atribuídas aos componentes de pulmão e parede.

O método de oclusão das vias aéreas após insuflação com fluxo constante não é capaz de determinar a contribuição relativa do *pendelluft* (desigualdades de constantes de tempo) e do *stress relaxation* (componente viscoelástico) para o desenvolvimento da queda lenta observada na pressão traqueal (BATES et al., 1985; BATES et al., 1988; KOCHI et al., 1988). No entanto, vários autores acreditam ser a maior contribuição representada provavelmente pelo *stress relaxation* (BATES et al., 1988; KOCHI et al., 1988; SIMILOWSKI & BATES, 1991).

No final dos anos 80, foi demonstrada, através do método de oclusão ao final da inspiração, a dependência das resistências pulmonares em relação ao fluxo e volume (KOCHI et al., 1988b). Em condições de isovolume, a resistência pulmonar intrínseca do pulmão ($R_{in,L}$) e do sistema respiratório ($R_{in,rs}$) aumentam linearmente com o aumento do fluxo, enquanto que a resistência adicional ($\Delta R_{in,L}$ e

$\Delta R,rs$), determinada pela dissipação de energia para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo, diminui exponencialmente. Esse comportamento se reflete na resistência pulmonar total ($R_{tot,L}$) que é maior em baixos fluxos do que em fluxos intermediários. Na situação de isofluxo, aumentando-se o volume, $R_{init,L}$ e $R_{init,rs}$ decrescem, enquanto que $R_{tot,L}$ e $\Delta R,rs$ aumentam (KOCHI et al., 1988b; D'ANGELO et al., 1989). As propriedades mecânicas da parede torácica, por sua vez, também apresentam dependência em relação às variações de fluxo e volume (KOCHI et al., 1988b).

Em 1988, o modelo de oclusão ao final da inspiração foi validado através de estudos experimentais utilizando cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural. Ao medir diretamente a pressão alveolar, comprovou-se ser esta homogênea através dos pulmões, apresentando pico de pressão coincidente com o ponto de inflexão (P_i) observado na curva de pressão traqueal. Logo, a pressão alveolar mostrava comportamento semelhante ao encontrado na segunda fase da pressão traqueal, a de queda lenta. Tal observação indica que a variação de pressão responsável pela queda lenta (ΔP_2) ocorre em consequência a um fenômeno distal ao alvéolo, ou seja, no tecido pulmonar. Logo, ΔP_2 é uma manifestação do comportamento tecidual de adaptação ao estresse (BATES et al., 1988; SALDIVA et al., 1992). Bates et al. (1988) mostraram que a heterogeneidade de distribuição da ventilação não é importante na determinação de ΔP_2 .

Apesar das diversas técnicas que analisam a mecânica do sistema respiratório, nos últimos anos o método da oclusão ao final da inspiração vem sendo bastante utilizado no estudo da mecânica respiratória tanto em animais quanto em

humanos anestesiados (BATES et al., 1985; AULER et al., 1987; SALDIVA et al., 1987; D'ANGELO et al.,1989; D'ANGELO et al.,1994).

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi analisar a morfologia e a mecânica pulmonares no curso da infecção experimental induzida pelo *P. brasiliensis*.

Hipóteses:

- De que forma se desenvolve o processo inflamatório?
- Quais são as quimiocinas envolvidas no processo e como se expressam?
- Há desenvolvimento de fibrose tecidual?
- A mecânica respiratória sofre quais alterações?
- Como acontece o acometimento pulmonar?

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CULTURA DE FUNGO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Foram usadas leveduras viáveis do *Paracoccidioides brasiliensis*, especificamente a amostra virulenta Pb18 do fungo. As células do fungo foram cultivadas em meio de Fava-Netto (1961) a 36,5°C por um período de 14 dias para a obtenção de leveduras.

As leveduras do fungo obtidas do meio de cultura foram separadas dos grumos por agitação mecânica com auxílio de pérolas de vidro e lavadas com solução estéril de salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,1M, pH 7,2. Em seguida foi realizada uma estimativa da concentração fúngica, utilizando câmara de Neubauer, a fim de obter uma suspensão contendo 1×10^7 células viáveis/ml, em PBS estéril.

2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem suscetível à infecção pelo *P. brasiliensis*, BALB/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, ficaram alocados no Biotério da Universidade Católica de Brasília (UCB) em gaiolas de polipropileno e mantidos em estantes

climatizadas, com ciclo 12 horas claro/escuro e livre acesso à água e ração *ad libitum*.

3. INOCULAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram anestesiados com éter e, posteriormente, inoculados por via endovenosa (e.v.) a partir do plexo venoso retro-orbital, com 100µl da suspensão descrita acima de 1×10^7 células/ml do *P. brasiliensis* por animal, no Laboratório de Patologia da Universidade de Brasília.

4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os camundongos BALB/c (n=55) foram divididos em dois grupos: experimental (inoculados com o fungo, n=40) e controle (normais, n=15) e foram avaliados com 15, 30, 45 e 60 dias para a coleta dos dados, conforme demonstrado na tabela 1. Posteriormente à coleta dos dados, os animais foram sacrificados.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade de Brasília (UnB).

Tabela 1 – Distribuição dos animais nos grupos de acordo com os procedimentos realizados após a inoculação com o *P. brasiliensis*.

DIAS APÓS A INOCULAÇÃO	GRUPO EXPERIMENTAL			GRUPO CONTROLE		
	n	PROCEDIMENTO		n	PROCEDIMENTO	
15	05	Mecânica Respiratória		03	Mecânica Respiratória	
	03	Gasometria Arterial		02	Gasometria Arterial	
	05	Análise Histopatológica e Dosagem de Quimiocinas	01	Análise Histopatológica e Dosagem de Quimiocinas		
30	05	Análise Histopatológica e Dosagem de Quimiocinas	02	Análise Histopatológica e Dosagem de Quimiocinas		
	05	Análise Histopatológica e Dosagem de Quimiocinas	02	Análise Histopatológica e Dosagem de Quimiocinas		
45	05	Análise Histopatológica e Dosagem de Quimiocinas	02	Análise Histopatológica e Dosagem de Quimiocinas		
	05	Mecânica Respiratória	02	Mecânica Respiratória		
60	03	Gasometria Arterial		01	Gasometria Arterial	
	03	Análise Histopatológica e	02	Análise Histopatológica e		
		Dosagem de Quimiocinas		Dosagem de Quimiocinas		
PERDAS		06		00		
TOTAL		40		15		

5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES

Foi realizada ao 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação dos animais com o *P. brasiliensis*. Foram retirados, dos animais sacrificados (18 do grupo experimental e 07 do grupo controle, n=25), fragmentos do pulmão que foram fixados em formol a 10% por 6 horas, seguidos de desidratação em álcool 70% e clarificação em xilol. Posteriormente foram inclusos em blocos de parafina e seccionados com um micrótomo em cortes de cerca de 5µm de espessura. Os cortes foram então dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. Em seguida foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao 80%). Os cortes reidratados foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), desidratados com concentrações crescentes de álcool (80% ao absoluto), lavados com xilol e cobertos com lamínulas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e utilizadas para observação das lesões granulomatosas e presença do fungo, foram também coradas com prata para a contagem fúngica e com tricromo de Masson para a quantificação de colágeno.

6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE PULMÃO

Foi realizada ao 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação dos animais com o *P. brasiliensis*. Foram pesados 100 mg do pulmão direito (de 18 animais do grupo experimental e 07 do grupo controle, n=25) e homogeneizados em 0.9 ml de uma solução para extração de citocinas (NaCl 0.4 M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetonio 0.1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0.05%, 0.5% de BSA, 20 KI aprotinina), numa relação de 10% peso/volume, e posteriormente centrifugados a 3000g durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi utilizado para detecção de quimiocinas teciduais pelo método de ELISA.

7. DETECÇÃO DE QUIMIOCINAS NO PULMÃO

Para a dosagem das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CXCL1-3/KC e CXCL9/MIG foram utilizados kits murinos específicos (DuoSet R&D SYSTEMS) onde foram seguidas as instruções do fabricante. Basicamente, 100 μ l/poço do anticorpo de captura (5,5 μ l/ml) diluído em PBS estéril foram adicionados a cada placa (NUNC FLAT, 96-well, FALCON). Estas foram vedadas e incubadas a 4°C *overnight*. O conteúdo de cada placa foi retirado e esta foi lavada 3 vezes (300 μ L/poço) com um tampão de lavagem (PBS/TWEEN 20 0,05%). Após este procedimento, adicionou-se 300 μ l/poço do tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por, no mínimo, uma hora.

Repetiu-se o procedimento de lavagem e adicionou-se 100 μ l/poço das amostras, lavado bronco-alveolar ou tecido, e padrões, diluídos em tampão de diluição (BSA 0,1% em PBS 1x). As placas foram novamente incubadas *overnight*. Repetiu-se o procedimento de lavagem e foram adicionados 100 μ l/poço do anticorpo de detecção biotinilado (5,55 μ l/ml) diluído em tampão de diluição (o mesmo das amostras e padrões). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Após mais um procedimento de lavagem, adicionou-se 100 μ l/poço de estreptavidina – HRP 1:200 em tampão de diluição e incubou-se as placas à temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente as placas foram lavadas e adicionou-se 100 μ l/poço do substrato OPD (em tampão citrato pH 5 com adição de H₂O₂). As placas foram incubadas por 20-30 minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período observou-se a formação de cor e foram adicionados 50 μ l/poço de H₂SO₄ 1M para interromper a reação. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 492 nm.

A fim de detectar quimiocinas teciduais em animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15, 30, 45 e 60 dias utilizou-se o método de ELISA.

8. MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Nos dias 15 e 60 após a inoculação dos animais com o *P. brasiliensis* um total de 10 animais do grupo experimental e 05 animais do grupo controle (n=15) foram selecionados ao acaso e submetidos à análise da mecânica ventilatória no

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os animais foram conduzidos para a UFRJ de transporte aéreo, no mesmo dia da coleta dos dados da mecânica respiratória. Posteriormente à coleta dos dados, os animais foram sacrificados.

Para a coleta dos dados os animais foram pesados (balança digital Filizola, modelo MF-6) e sedados com Diazepam (3-5 mg/kg) e, em seguida, anestesiados com Thionembutal (20 mg/kg). Esta dose foi suficiente para manter o animal anestesiado durante todo o procedimento que tinha duração máxima de 20 minutos.

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos estendidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueostomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com trietiliodeto de galamina (2 mg/kg, através de administração intra-peritoneal).

Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente (V_T) de 0,2 ml.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdômen, abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão

abdominal foi estendida lateralmente, para esquerda e para direita, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Justo antes da perfuração do diafragma foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O, a fim de evitar o desenvolvimento de colapso pulmonar e atelectasias.

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e corte superior, abaixo da clavícula.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração durante as medidas. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ($V_T = 0,2$ ml) e fluxo ($V' = 1$ ml/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (KOCHI et al., 1988a, 1988b; SIMILOWSKI et al., 1989).

O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por Mortola e Noworaj (1983), para medida de fluxo aéreo (V'), sendo o respirador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O pneumotacógrafo é constituído por uma cânula metálica com duas saídas laterais conectadas a um transdutor diferencial de pressão, Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA), para medida de fluxo aéreo e volume corrente. Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de

pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão traqueal (P_{tr}).

Uma vez que não existiram modificações abruptas no diâmetro do circuito, os erros de medida da resistência ao fluxo foram evitados (CHANG & MORTOLA, 1981; LORING & MEAD, 1982). O espaço morto do equipamento foi 0,3 ml. Todos os sinais foram condicionados e amplificados num polígrafo Beckman tipo R (Beckman, Schiller Park, IL, EUA). Os sinais de pressão e fluxo foram passados através de filtros Bessel de 8 polos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) de analógico para digital e armazenados num computador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá).

Durante os experimentos evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

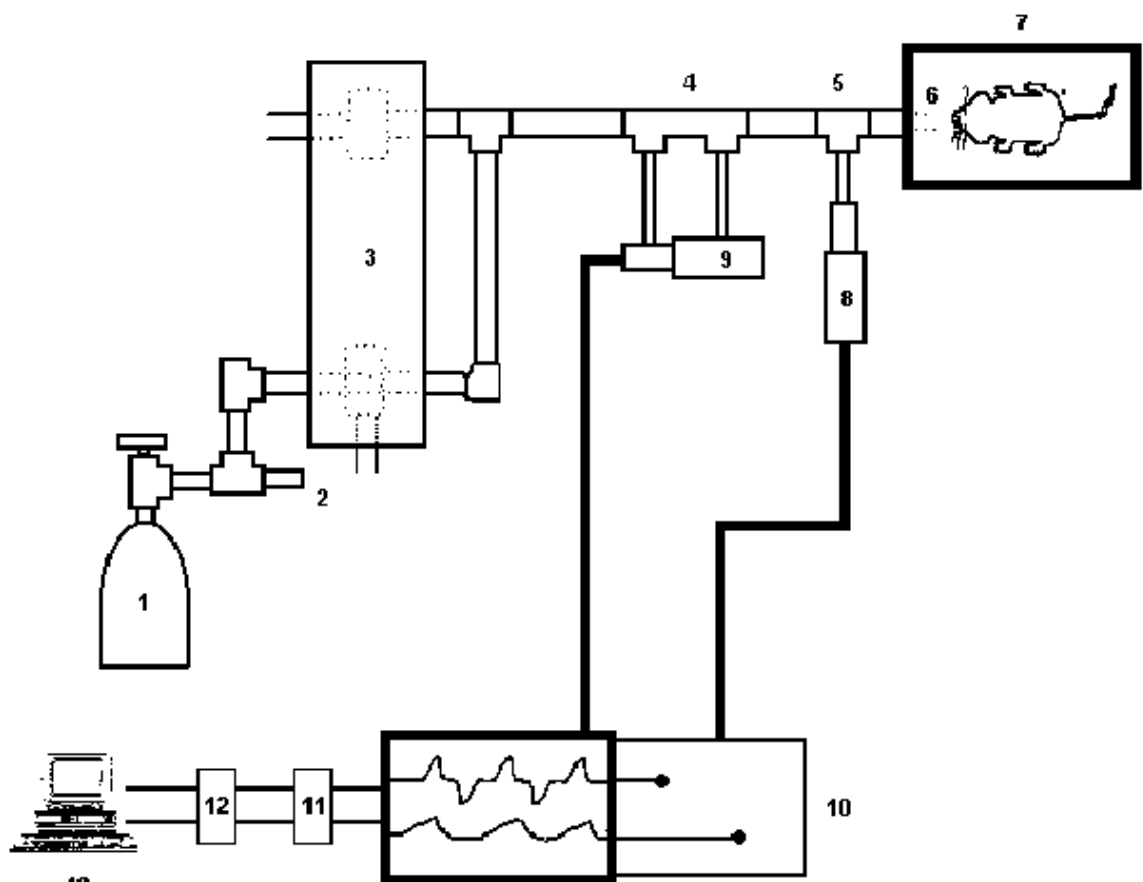


Figura 1 – Montagem experimental consistindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Rotâmetro.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça T para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.

- 8 - Transdutor de pressão traqueal.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo/volume.
- 10 - Polígrafo de oito canais com amplificação dos sinais de V' e P_{tr} .
- 11 - Filtros.
- 12 - Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 13 - Microcomputador.

8.1. MÉTODO UTILIZADO PARA ESTUDO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Método de Oclusão ao Final da Inspiração

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (BATES et al., 1985), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inhomogêneo do sistema respiratório.

No animal com o tórax aberto, a P_{tr} é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão ($P_{i,L}$) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ($P_{el,L}$). A diferença de pressão ($\Delta P_{1,L}$) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{max,L}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ($P_{i,L}$), corresponde ao

componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão (ΔP_2), representada pela queda lenta, do P_i ao platô ($P_{el,rs}$), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (“stress relaxation”) e/ou inhomogêneo (“pendelluft”) do tecido pulmonar. A soma de $\Delta P_{1,L}$ e $\Delta P_{2,L}$ fornece a variação total de pressão no pulmão ($\Delta P_{tot,L}$).

As elastâncias estática ($E_{st,L}$) e dinâmica ($E_{dyn,L}$) do pulmão podem, então, ser obtidas dividindo-se $P_{el,L}$ e $P_{i,L}$, respectivamente, pelo volume corrente. $\Delta E_{,L}$ é a diferença entre $E_{dyn,L}$ e $E_{st,L}$.

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de $P_{i,L}$ e $P_{el,L}$. Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi et al. (KOCHI et al., 1988a e 1988b).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_{1,L} = P_{max,L} - P_{i,L}$$

$$\Delta P_{2,L} = P_{i,L} - P_{el,L}$$

$$\Delta P_{tot,L} = \Delta P_{1,L} + \Delta P_{2,L}$$

$$E_{st,L} = P_{el,L} / V_T$$

$$E_{dyn,L} = P_{i,L} / V_T$$

$$\Delta E_{,L} = E_{dyn,L} - E_{st,L}$$

Onde:

$\Delta P_{1,L}$ = variação de pressão relativa ao componente viscoso pulmonar

$\Delta P_{2,L}$ = variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar

$\Delta P_{tot,L}$ = variação total de pressão pulmonar

$P_{max,L}$ = pressão pulmonar máxima

$P_{i,L}$ = pressão pulmonar no ponto de inflexão

$P_{el,L}$ = pressão de retração elástica pulmonar

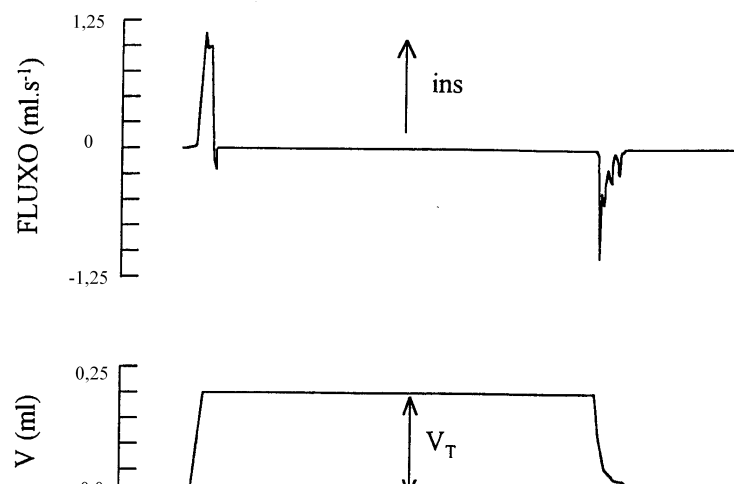
$E_{st,L}$ = elastância estática do pulmão

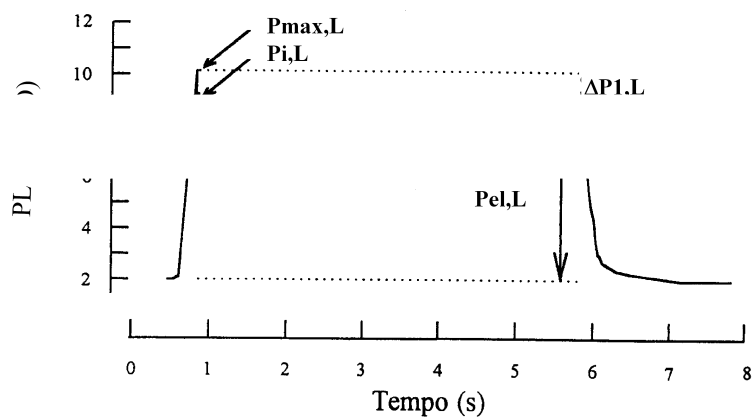
$E_{dyn,L}$ = elastância dinâmica do pulmão

$\Delta E_{,L}$ = variação de elastância pulmonar

V_T = volume corrente

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar ao sistema com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $R = \Delta P / V'$, a





resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A R_{eq} , constante até fluxos de 26 ml/s, foi de 0,08 cmH₂O/ml/s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta P_{eq} = R_{eq} \cdot V'$) foi subtraída de $\Delta P_{tot,L}$, e $\Delta P_{1,L}$, de forma que os resultados refletem propriedades mecânicas intrínsecas.

Figura 2 – Método de Oclusão ao Final da Inspiração - Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V_T) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões são ventilados com volume corrente de 0,2 ml e fluxo aéreo de 1 ml/s. O platô é alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das

vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P_{1,L}$) que corresponde a $P_{max,L} - P_{i,L}$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P_{2,L}$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representada pela pressão de retração elástica pulmonar ($P_{el,L}$). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da inspiração (PEEP) de 2 cmH₂O. $P_{máx,L}$ = pressão máxima pulmonar alcançada e $P_{i,L}$ = pressão no ponto de inflexão pulmonar. Os parâmetros da mecânica respiratória foram obtidos através da média do registro de 15 ciclos respiratórios, pelo método da oclusão ao final da inspiração.

9. GASOMETRIA ARTERIAL

A gasometria arterial é um exame invasivo que fornece os valores que permitem analisar os gases sanguíneos e o equilíbrio ácido-base, no sangue arterial (PASCOAL, 2005). É utilizada para auxiliar na avaliação e interpretação de possível hipoxemia, através de medidas da pressão arterial parcial de O₂ (PaO₂) e da saturação arterial da hemoglobina pelo O₂ (SaO₂). Valores normais de uma gasometria arterial são: pH 7,35 a 7,45; PaO₂ 80 a 100 mmHg; PaCO₂ 35 a 45 mmHg; BE -2 a +2; HCO₃ 22 a 28 mEq/L; SaO₂ >95% (VIEGAS, 2002).

Passados 15 e 60 dias após a inoculação dos animais com o *P. brasiliensis* um total de 06 animais do grupo experimental e 03 animais do grupo

controle (n=09), foram selecionados ao acaso e sacrificados através da punção de todo o sangue arterial (desangramento) diretamente do ventrículo esquerdo, para análise gasométrica.

Foi utilizada, para a coleta do sangue arterial, seringa descartável de 1ml, previamente heparinizada, em volume suficiente para ocupar o espaço morto da seringa e preencher o interior da agulha.

Posteriormente foi processada em um analisador de gás computadorizado e automatizado (AVL, Omini-7), devidamente calibrado segundo especificações do mesmo.

Devido à falta de estudos experimentais realizados com camundongos que avaliassem a gasometria arterial, os valores de referência utilizados são os mesmos para humanos, visto que ambos são mamíferos.

10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizada a análise descritiva para caracterização da amostra e a ANOVA One-way, calculadas no SPSS 10.0 (Statistical Package for Social Sciences) para Windows, para analisar a morfologia e a mecânica pulmonares no curso da infecção experimental induzida pelo *P. brasiliensis*. Para avaliar as diferenças entre os grupos foi utilizado o teste *Post Hoc* de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm EPM (erro padrão da média).

RESULTADOS

1. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES

Em resposta à infecção causada pela inoculação endovenosa do *P. brasiliensis* observou-se nos pulmões dos animais uma resposta inflamatória progressiva que se associou à disseminação e proliferação do fungo pelo organismo, exibindo diferentes estágios evolutivos, exibindo um padrão granulomatoso com tendência à fibrose tecidual gerando comprometimento pulmonar. Os dados referentes à análise histopatológica estão demonstrados na tabela 2.

No 15º dia de infecção a inflamação surgiu em resposta à presença do fungo e observamos múltiplas lesões, com tamanhos variados, compostas em sua maioria por células do sistema mononuclear fagocitário. Estas lesões observadas em diferentes áreas do pulmão apresentaram variações no tamanho e na quantidade das células envolvidas. Embora de aspecto circunscrito pouco era a diversidade dessas células, podendo-se observar leveduras do fungo no interior das lesões (+/++++), já com formação de granulomas (+/++++) levando ao comprometimento da área pulmonar (até 20% das áreas analisadas), porém sem formação de fibrose (ausência de colágeno), conforme demonstrado na figura 03.

Posteriormente, aos 30 dias de infecção, o comprometimento pulmonar foi mais extenso (até 40% das áreas analisadas) e as lesões exibiam nítida diferenciação morfológica dos fagócitos, podendo notar-se de monócitos recém-migrados até células epitelióides e mesmo células gigantes multinucleadas, e as lesões eram caracterizadas pela organização dessas células (figura 04). Presença de granulomas confluentes (+/++++), com várias leveduras nas lesões (+/++++).

Pequenas áreas contendo fibrose (+/++++) são observadas através da formação de colágeno.

Com o progredir da infecção (45 dias) o comprometimento pulmonar acentuou-se (até 80% da área analisada), o que foi determinado pela presença de granulomas confluentes (++++/++++) com várias leveduras nas lesões (++++/++++). Áreas contendo fibrose são observadas através da formação de colágeno (+/++++) e também houve início de necrose (+/++++), demonstrados na figura 05.

Aos 60 dias de infecção as lesões apresentaram-se confluentes tornando assim o comprometimento pulmonar mais extenso (até 90% da área analisada) e observou-se um padrão mais frouxo da lesão granulomatosa (++++/++++), onde no centro, notou-se grande quantidade de fungos (++++/++++) que pareciam se dividir livremente (figura 06). Neste ponto da infecção houve variação na extensão do comprometimento pulmonar, com maior confluência das lesões, associada a maior quantidade de fungo. A fibrose apresentou-se mais acentuada (+++/+), através da formação de colágeno, com uma grande área de consolidação, com aumento nas áreas de necrose (+/++++).

A formação de lesões granulomatosas é o que geralmente caracteriza o curso da infecção induzida pelo *P. brasiliensis*, cuja evolução se dá pela diferenciação de fagócitos mononucleares e, com o passar do tempo, por uma confluência destas lesões.

Tabela 2 - Resultados semi-quantitativos dos achados histopatológicos dos pulmões de 25 camundongos (18 do grupo experimental e 07 do grupo controle).

Tempo após inoculação	n (controle)	n (experimental)	Granulomas	Presença de polimorfonucleares	Presença de mononucleares	Ne
15 dias	01	05	+	-	++	
30 dias	02	05	++	+	+++	
45 dias	02	05	++++	++	+++	
60 dias	02	03	++++	++	+++	

* Não é comprometimento total do pulmão, mas das áreas analisadas.

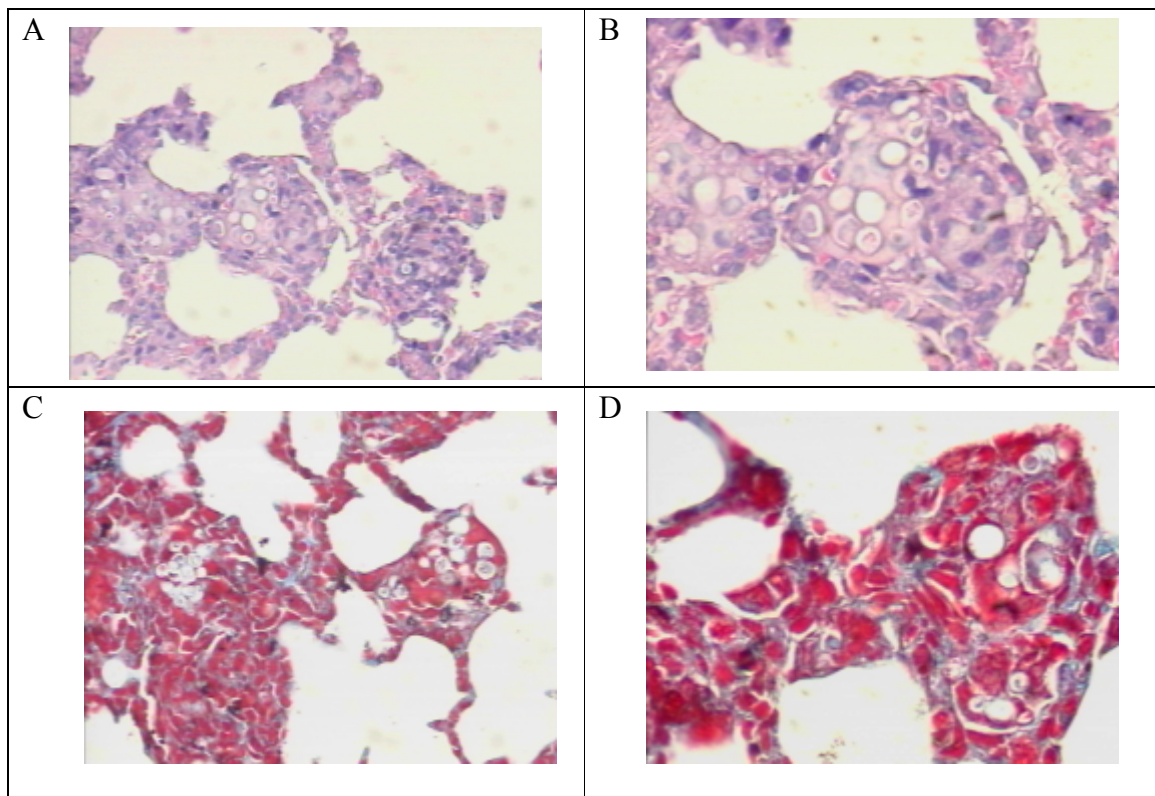


Figura 03 - Fotomicrografia de lesões em pulmões de 05 camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, após 15 dias, apresentando pequenos granulomas, com poucas leveduras nas lesões (a e b). Não foi observado áreas com formação de colágeno (c, d). (a, b, coloração com HE e c,d com tricromo de Masson, aumento originais de 200x para a, c e 400x para b, d).

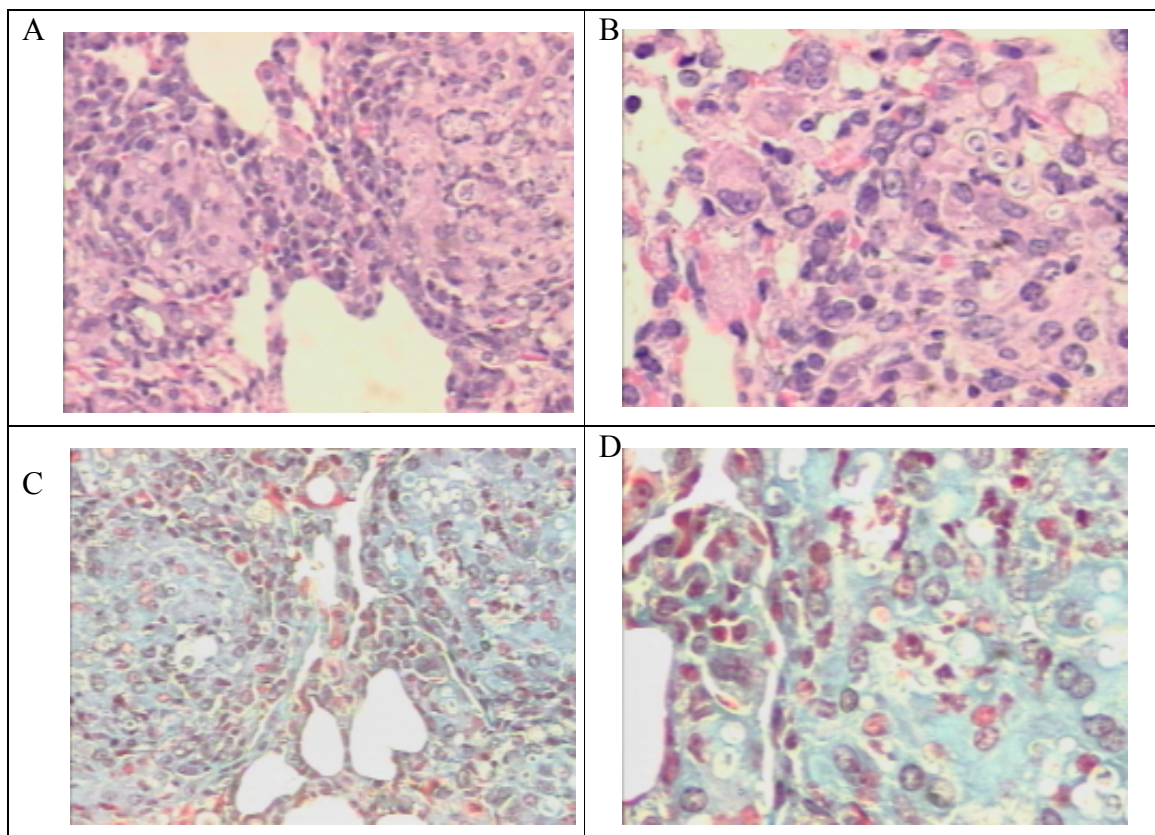


Figura 04 - Fotomicrografia de lesões em pulmões de 05 camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, após 30 dias, apresentando granulomas confluentes, com várias leveduras nas lesões (a e b). Pequenas áreas contendo fibrose são observadas através da formação de colágeno (c, d).

(a, b, coloração com HE e c,d com tricromo de Masson, aumento originais de 200x para a, c e 400x para b, d).

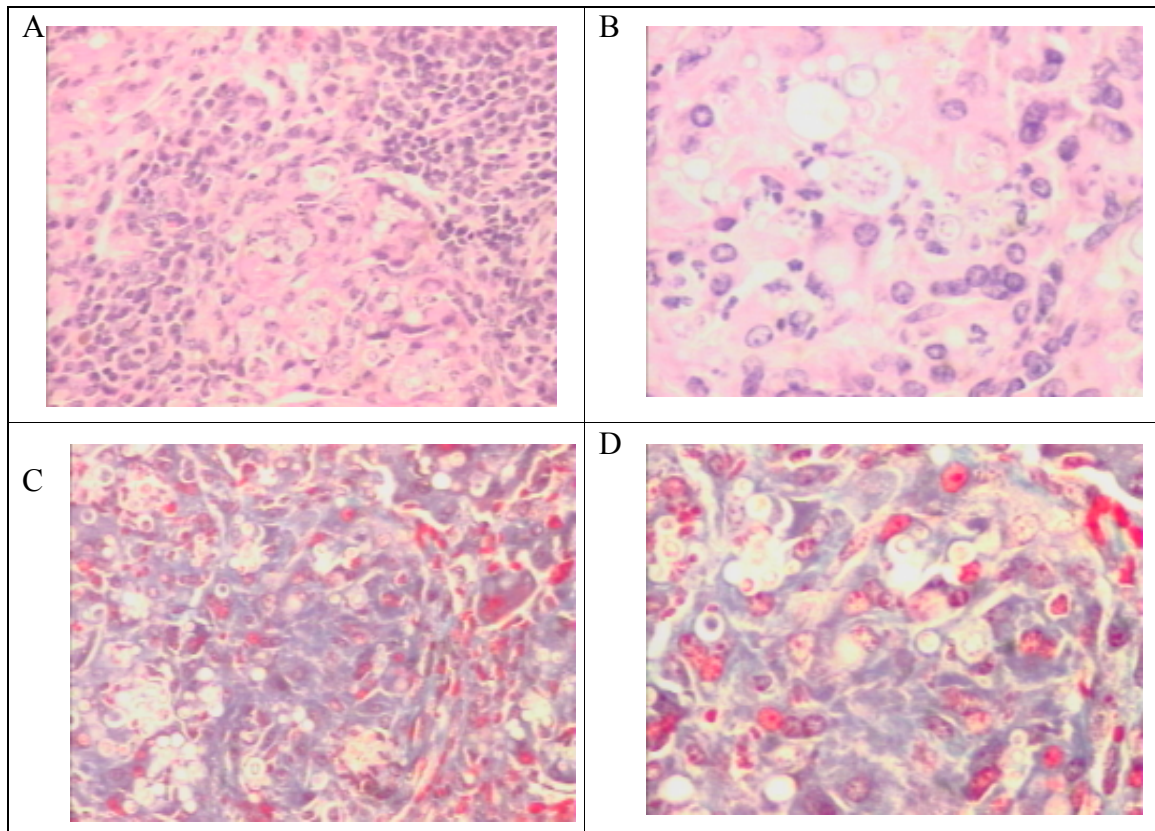


Figura 05 - Fotomicrografia de lesões em pulmões de 05 camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, após 45 dias, apresentando granulomas confluentes, com várias leveduras nas lesões (a e b). Áreas

contendo fibrose são observadas através da formação de colágeno (c, d). (a, b, coloração com HE e c,d com tricromo de Masson, aumento originais de 200x para a, c e 400x para b, d).

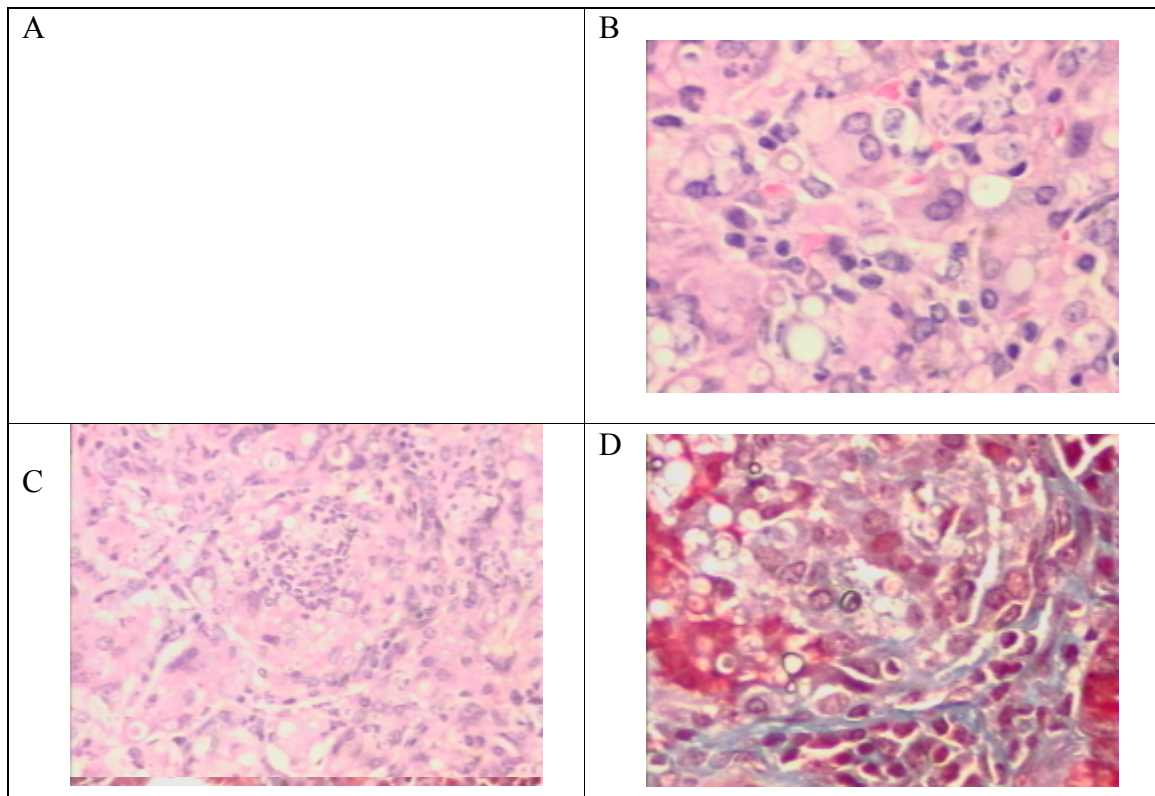


Figura 06 - Fotomicrografia de lesões em pulmões de 03 camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*, após 60 dias, apresentando granulomas confluentes, com várias leveduras nas lesões (a e b). Áreas

contendo fibrose são observadas através da formação de colágeno (c, d). (a, b, coloração com HE e c,d com tricromo de Masson, aumento originais de 200x para a, c e 400x para b, d).

2. DETECÇÃO DE QUIMIOCINAS NO PULMÃO

A quimiocina KC (CXCL1-3) é quimioatraente para neutrófilos (REMICK et al., 2001; COATES & McCOLL, 2001). Sua dosagem demonstrou aumento progressivo à medida que a doença foi se cronificando (figura 07), com diferenças significativas quando comparado o grupo infectado após 15 dias com o grupo controle ($p < 0,001$), bem como para os grupos infectados após 30, 45 e 60 dias quando comparados com o grupo controle ($p < 0,001$ para todos) e também quando comparado o grupo infectado após 15 dias com o grupo infectado após 60 dias ($p < 0,001$).

Figura 07 – Detecção da quimiocina KC (CXCL1-3) do pulmão direito de 07 animais controle e 18 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05), 30 (n=05), 45 (n=05) e

60 (n=03) dias. Os valores correspondem à média \pm EPM. EPM: erro padrão da média. *** Valores significativamente diferentes com $p < 0,001$.

A quimiocina MIP-1 α (CCL3) está relacionada à expressão de adesão de moléculas e migração de células inflamatórias para o pulmão, juntamente com a CXCL1-3/KC, ambas são quimioatraentes para neutrófilos (REMICK et al., 2001; COATES & McCOLL, 2001).

Houve diferença significativa (figura 08) quando comparado o grupo infectado após 15 dias com o grupo controle ($p < 0,001$), bem como quando comparados os grupos infectados após 30, 45 e 60 dias ($p < 0,05$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente) e também quando comparado o grupo infectado após 15 dias com o grupo infectado após 60 dias ($p < 0,001$).

Figura 08 – Detecção da quimiocina MIP-1 α (CCL3) do pulmão direito de 07 animais controle e 18 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05), 30 (n=05), 45 (n=05) e

60 (n=03) dias. Os valores correspondem à média \pm EPM. EPM: erro padrão da média. * Valores significativamente diferentes com $p < 0,05$; ** valores significativamente diferentes com $p < 0,01$; *** valores significativamente diferentes com $p < 0,001$.

Já a RANTES (CCL5) tem papel importante em doenças granulomatosas, ela atrai células mononucleares (SOUTO et al., 2003). Sua dosagem (figura 09) demonstrou diferença significativa quando comparado o grupo infectado após 15 dias com o grupo controle ($p < 0,001$), também foi significativa a diferença quando comparados os grupos infectados após 30, 45 e 60 dias ($p < 0,01$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) com o grupo controle.

Figura 09 – Detecção da quimiocina RANTES (CCL5) do pulmão direito de 07 animais controle e 18 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05), 30 (n=05), 45 (n=05) e 60 (n=03) dias. Os valores correspondem à média \pm EPM. EPM: erro padrão da média. * Valores significativamente diferentes com $p < 0,05$; ** valores significativamente diferentes com $p < 0,01$; *** valores significativamente diferentes com $p < 0,001$.

A quimiocina MIG (CXCL) é quimioatraente para macrófagos (FARBER, 1997). Houve diferença significativa (figura 10) quando comparados os grupos infectados após 15, 30, 45 e 60 dias com o grupo controle ($p < 0,001$ para todos), bem como quando comparado o grupo infectado após 15 dias com o grupo infectado após 60 dias ($p < 0,05$).

Figura 10 – Detecção da quimiocina MIG (CXCL9) do pulmão direito de 07 animais controle e 18 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05), 30 (n=05), 45 (n=05) e

60 (n=03) dias. Os valores correspondem à média \pm EPM. EPM: erro padrão da média. * Valores significativamente diferentes com $p < 0,05$; *** valores significativamente diferentes com $p < 0,001$.

3. MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Os camundongos infectados pelo *P. brasiliensis*, via endovenosa, apresentaram resposta inflamatória progressiva com conseqüente comprometimento da mecânica respiratória.

A mecânica respiratória foi avaliada no 15º e no 60º dia após a infecção. Os camundongos devidamente sedados, anestesiados, traqueostomizados e sob ventilação artificial foram submetidos aos procedimentos de registros dos parâmetros usados para avaliação das propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas do pulmão. O método utilizado foi o de oclusão ao final da inspiração.

De acordo com o método foram geradas pausas de 5 segundos após a oclusão, tomando especial cuidado para manter o fluxo aéreo e o volume corrente praticamente constantes (tabela 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e infectado (após 15 e após 60 dias) no que tange ao fluxo aéreo e ao volume corrente.

Tabela 3 – Volume corrente e fluxo aéreo de animais controle e infectados com *P. brasiliensis*.

Animais	n	Volume (ml)	Fluxo (ml/s)
Controle	05	0,20 ± 0,01	1,00 ± 0,00
PB 15 dias	05	0,20 ± 0,00	1,01 ± 0,00
PB 60 dias	05	0,21 ± 0,01	1,00 ± 0,00

Os valores correspondem à média ± EPM. EPM, erro padrão da média; volume, volume corrente; fluxo, fluxo inspiratório.

Na tabela 4 estão apresentados os valores das pressões resistiva ($\Delta P1$), viscoelástica e/ou inhomogênea ($\Delta P2$) e da variação total das pressões (ΔP_{tot}) do pulmão dos grupos estudados.

Tabela 4 – Variação de pressão resistiva ($\Delta P1$), viscoelástica e/ou inhomogênea ($\Delta P2$) e total (ΔP_{tot}) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis*.

Animais	n	$\Delta P1,L$ (cmH₂O)	$\Delta P2,L$ (cmH₂O)	$\Delta P_{tot,L}$ (cmH₂O)
Controle	05	1,03 ± 0,21	1,02 ± 0,15	2,05 ± 0,30
PB 15 dias	05	1,16 ± 0,22	1,61 ± 0,36	2,77 ± 0,30 *
PB 60 dias	05	1,03 ± 0,14	2,36 ± 0,83 *	3,39 ± 0,73 *

Os valores correspondem à média ± EPM. EPM, erro padrão da média; variação da pressão resistiva do pulmão, $\Delta P1,L$; variação da pressão viscoelástica e/ou inhomogênea do pulmão, $\Delta P2,L$; variação da pressão total do pulmão, $\Delta P_{tot,L}$. *

Valores significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$).

A variação pressórica após a interrupção do fluxo aéreo nos dá parâmetros para avaliar a existência de alterações em vias aéreas, porém, não foram observadas alterações significantes na variação da pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas ($\Delta P1$) (figura 11).

Quando avaliamos os valores médios da pressão viscoelástica ($\Delta P2$) observamos que comparando o grupo infectado após 60 dias com o grupo controle os valores encontrados foram estatisticamente significativos ($p= 0,002$), mostrando que houve alterações de pressão dissipada para vencer os componentes viscoelásticos e/ou inomogêneos (figura 12).

Figura 11 – Pressões resistivas ($\Delta P1$) do pulmão de animais controle e infectados com *P. brasiliensis* após 15 e após 60 dias.

Figura 12 – Pressões viscoelásticas/inomogêneas (ΔP_2) do pulmão de 05 animais controle e 10 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05) e após 60 (n=05) dias.

* Valores significativamente diferentes do grupo controle (p=0,002).

Quanto à variação total das pressões (ΔP_{tot}) foi evidenciado que houve diferença significativa entre o grupo infectado após 15 dias com o grupo controle ($p=0,04$). E também quando comparamos o grupo infectado após 60 dias com o grupo controle ($p=0,001$) (figura 13).

Figura 13 – Variações totais das pressões (ΔP_{tot}) do pulmão de 05 animais controle e 10 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05) e após 60 (n=05) dias. * Valores significativamente diferentes do grupo controle (p=0,04 e p=0,001, respectivamente).

A figura 14 mostra a variação total das pressões, bem como as variações das pressões resistivas (ΔP_1) e viscoelásticas/inomogêneas (ΔP_2).

Figura 14 – As barras claras representam as pressões resistivas ($\Delta P1$) e as barras escuras as pressões viscoelásticas/inomogêneas ($\Delta P2$) do pulmão de 05 animais controle e 10 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05) e após 60 (n=05) dias. A

coluna inteira representa a variação de pressão total (ΔP_{tot}). * Valores significativamente diferentes do grupo controle ($p=0,04$ e $p=0,001$, respectivamente).

Os valores das elastâncias estática (Est) e dinâmica (Edyn) e as diferenças entre as elastâncias (ΔE) do pulmão, em ambos os grupos: controle e infectado, estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Elastância dinâmica (Edyn,L) e estática (Est,L) e diferenças entre as elastâncias dos pulmões de animais controle e infectados com *P. brasiliensis*.

Animais	n	Edyn,L (cmH₂O/ml)	Est,L (cmH₂O/ml)	ΔE,L (cmH₂O/ml)
Controle	05	22,80 ± 2,49	17,69 ± 2,25	5,11 ± 0,87
PB 15 dias	05	35,21 ± 4,87	27,10 ± 3,32	8,11 ± 1,77
PB 60 dias	05	46,51 ± 13,30 *	34,93 ± 8,84 *	11,58 ± 4,49 *

Os valores correspondem à média ± EPM. EPM, erro padrão da média; elastância dinâmica do pulmão, Edyn,L; elastância estática do pulmão, Est,L; diferenças entre as elastâncias do pulmão, ΔE ,L. * Valores significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$).

Houve aumento nos valores das elastâncias, porém, este foi significativo apenas quando comparado o grupo infectado após 60 dias com o grupo controle

tanto na elastância estática ($p=0,01$) (figura 15) quanto na dinâmica ($p=0,007$) (figura 16) e também na diferença entre as elastâncias ($p=0,004$) (figura 17).

O aumento das elastâncias (Est e Edyn) possui aspecto gradativo quando se analisa esses parâmetros nos grupos infectados após 15 e 60 dias, seguindo a evolução da infecção.

Figura 15 – Elastância estática (Est) do pulmão de 05 animais controle e 10 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05) e após 60 (n=05) dias. * Valores significativamente diferentes do grupo controle ($p=0,001$).

Figura 16 – Elastância dinâmica (Edyn) do pulmão de 05 animais controle e 10 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05) e após 60 (n=05) dias. * Valores significativamente diferentes do grupo controle (p=0,007).

Figura 17 – Diferença entre as elastâncias estática e dinâmica (ΔE) do pulmão de 05 animais controle e 10 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05) e após 60 (n=05) dias. * Valores significativamente diferentes do grupo controle ($p=0,004$).

A figura 18 mostra as elastâncias dinâmica (E_{dyn}), estática (E_{st}), bem como a diferença entre elas (ΔE).

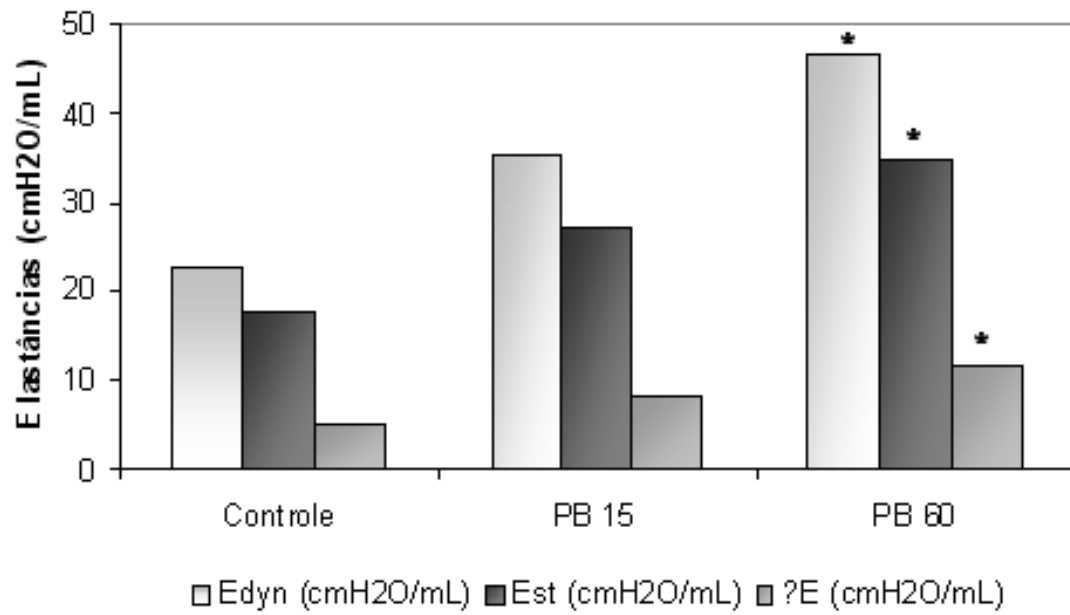


Figura 18 – Elastância estática (Est), dinâmica (Edyn) e diferença entre as elastâncias (ΔE) do pulmão de 05 animais controle e 10 infectados com *P. brasiliensis* após 15 (n=05) e após 60 (n=05) dias. *Valores significativamente diferentes do grupo controle ($p=0,007$, $p=0,01$ e $p=0,004$, respectivamente).

4. GASOMETRIA ARTERIAL

A gasometria arterial foi coletada após 15 e 60 dias da inoculação dos animais com o *P. brasiliensis*, em animais do grupo infectado e animais do grupo controle. Os dados referentes à gasometria arterial, em ambos os grupos: controle e infectado, estão demonstrados na tabela 6.

Houve redução significativa na PaO₂, no pH, na SaO₂ e no HCO₃ na gasometria coletada no 15º dia quando comparado o grupo infectado com o grupo controle (p=0,036; p=0,000; p=0,05; p=0,002, respectivamente). Houve diminuição no pH e no HCO₃ na gasometria coletada no 60º dia quando comparado o grupo infectado com o grupo controle (p=0,000 e p=0,001). Ocorreu diferença significativa no pH e na SaO₂ das gasometrias coletadas no 15º e no 60º dias e ambas estão abaixo dos valores dos controles (p=0,010 e p=0,044). Estes dados mostram uma alteração na gasometria arterial com diferença significativa em todos os valores, à exceção da PaCO₂, com a progressão da doença.

Quando avaliamos os valores gasométricos encontrados, observamos que os animais controle encontravam-se dentro dos limites de normalidade em todos os parâmetros avaliados. Já os animais infectados, 15 dias após a infecção,

apresentaram quadro de acidose mista demonstrado pela hipercapnia (\uparrow PaCO₂), acidose (\downarrow pH) e deficiência de bases (\downarrow BE e HCO₃). Já os animais infectados, após 60 dias apresentaram quadro de acidose metabólica, demonstrado pela hipoxemia (\downarrow PaO₂), acidose (\downarrow pH), baixa saturação periférica de O₂ (Sa O₂) e deficiência de bases (\downarrow BE e HCO₃), porém, as repercussões foram menos intensas do que na fase aguda da infecção.

Tabela 6 – Valores gasométricos de animais controle e infectados com *P. brasiliensis*.

	Controle (n = 03)	PB 15 dias (n = 03)	PB 60 dias (n = 03)
PaO₂ (mmHg)	84,03 ± 1,00	60,83 ± 6,37 *	68,50 ± 12,50
PaCO₂ (mmHg)	42,30 ± 2,86	57,63 ± 11,50	39,47 ± 7,52
pH	7,42 ± 2,51	7,05 ± 3,60 * **	7,15 ± 1,53 * **
SaO₂ (%)	95,83 ± 0,76	71,27 ± 7,35 * **	86,67 ± 6,50 **
BE (mmol/l)	0,00 ± 1,73	-16,07 ± 1,44 *	-15,17 ± 1,04
HCO₃ (mmol/l)	23,50 ± 1,32	14,43 ± 2,10 *	12,93 ± 1,68 *

Os valores correspondem à média ± EPM. EPM: erro padrão da média; PaO₂, pressão parcial do oxigênio arterial; PaCO₂, pressão parcial do gás carbônico arterial; pH, potencial hidrogeniônico; SaO₂, percentagem de hemoglobina saturada pelo oxigênio; BE, excesso de base; HCO₃, Íon bicarbonato.

* Valores significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$). ** Valores significativamente diferentes entre o grupo infectado após 15 dias e o grupo infectado após 60 dias ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

No presente trabalho avaliamos as alterações da mecânica respiratória paralelamente à resposta inflamatória tecidual pulmonar. De acordo com os resultados encontrados a infecção experimental induzida pela inoculação por via endovenosa de leveduras do *P. brasiliensis* apresentou comprometimento pulmonar progressivo de padrão granulomatoso, concordantes às observações de Figueiredo et al. (1986).

Os primeiros relatos sobre o padrão da lesão da PCM foram descritos em vários modelos experimentais utilizando *hamsters* (GUIMARÃES, 1964; IABUKI & MONTENEGRO, 1979), cobaias (BRITO & FAVA-NETTO, 1963) e camundongos (MOSCARDI & FRANCO, 1981). Nestes modelos experimentais, embora se tenha obtido resposta inflamatória granulomatosa, sabe-se que sua evolução depende da via de inoculação, da virulência e da quantidade do fungo inoculada e, ainda, das particularidades do hospedeiro (IABUKI et al., 1982).

Na PCM humana e experimental várias descobertas sugerem que macrófagos estimulados por células T desempenham um papel fundamental na resistência do hospedeiro ao *P. brasiliensis*. Quando o fungo penetra no hospedeiro, ele interage com diversas células efetoras (macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, monócitos) e, para a colonização efetiva, deve resistir aos mecanismos microbicidas do hospedeiro (BRUMMER, 1994).

O processo inflamatório granulomatoso da PCM pode ser dividido em três fases distintas: fase monocítica-neutrofílica, fase pré-granulomatosa e fase granulomatosa. A fase monocítica-neutrofílica, fase inicial da formação do granuloma na PCM experimental, depende principalmente do componente polissacarídeo

β -glucana da parede celular do fungo, o qual demonstrou uma capacidade de atração e organização concêntrica de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares ao foco inflamatório. A interação desses fagócitos com os polissacarídeos da parede do fungo induz a secreção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que estimula a migração e diferenciação dos monócitos (FIGUEIREDO et al., 1986; 1993; SILVA et al., 1985; 1994). Na fase pré-granulomatosa ocorre mobilização de mais macrófagos para o sítio inflamatório, os quais tendem a sofrer diferenciação para as chamadas células epitelióides e fundir seus citoplasmas formando as células gigantes multinucleadas, caracterizando um granuloma do tipo epitelióide. Na fase granulomatosa, infiltrados de linfócitos T são detectados ao redor deste granuloma, sendo que a maioria destes linfócitos tem fenótipo CD4+ com poucos CD8+ (ADAMS, 1976; KERR et al., 1988; FRANCO et al., 1993; DE BRITO & FRANCO, 1994), além de fibroblastos, plasmócitos, mastócitos e eosinófilos.

No presente estudo observamos o desenvolvimento do processo inflamatório a partir da interação do fungo com o hospedeiro evoluindo com a formação de granulomas, com a participação de diversas células efetoras, passando pelas três fases descritas anteriormente. Vimos, também, que o comprometimento pulmonar foi acentuando-se gradativamente com várias lesões confluentes apresentando grandes quantidades de fungo em seu interior. Esses resultados corroboram os de Bocca et al. (1998).

Com a progressão da infecção ocorre o aumento na produção de algumas citocinas (FRIDMAN, 1993; HUNNINGHAKE & KALICA, 1995; MAQUART et al., 1994), dentre elas TNF- α e TGF- β (FRANCO et al., 1998), que estão associadas à

formação de tecido conectivo, gerando alterações estruturais e funcionais no tecido envolvido (FRIDMAN, 1993).

Entre as citocinas produzidas pelos macrófagos alveolares, o TGF- β é um dos reguladores mais potentes da inflamação e síntese de tecido conjuntivo *in vitro* e *in vivo*. Além disso, também é um potente quimioatraente para fibroblasto, induzindo-o a sintetizar colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (FRANCO et al., 1998).

O processo fibrótico parece resultar de interação complexa entre fibroblastos e macrófagos. Os fibroblastos migram para as áreas de lesão e são estimulados a secretar colágeno e outras proteínas da matriz. Essas células também liberam várias proteases, que possuem a capacidade de degradar e remodelar tais proteínas. O estímulo que ativa o fibroblasto a remodelar o pulmão pode incluir componentes do sangue, como a fibrina, produtos de degradação da matriz e mediadores que são liberados por macrófagos e células do parênquima pulmonar (WARD & HUNNINGHAKE, 1998; SOUZA et al., 2003).

Na análise histopatológica dos pulmões dos camundongos infectados com *P. brasiliensis*, via endovenosa, observamos um início discreto na formação de fibrose tecidual que foi evoluindo e apresentou-se mais acentuada e com grande área de consolidação na fase crônica. O mesmo foi evidenciado no estudo de Tuder et al. (1985) que observaram uma proliferação de fibras de reticulina seguida da deposição de colágeno denso, gerando a fibrose nos pulmões dos pacientes com PCM.

Franco et al. (1998) relataram que a fibrose pulmonar teve início 08 semanas após a infecção dos camundongos com *P. brasiliensis*, via intranasal,

diferentemente do que ocorreu no presente estudo onde observamos o início do surgimento da fibrose com 30 dias (04 semanas) após a infecção endovenosa.

A quantidade de colágeno depositada depende da extensão do dano celular, da intensidade de proliferação de fibroblastos e de substâncias efetoras presentes na inflamação, além de hipoperfusão vascular e alteração da PaO₂, que ocorrem durante a lesão pulmonar (SOUZA et al., 2003).

Restrepo et al. (1992) elucidaram que a fibrose pode ser iniciada após a interação do fungo com as células de defesa, induzindo a proliferação de fibrina acompanhada da deposição de colágeno. Todo esse processo ocorre, geralmente, após a formação do granuloma.

No tecido pulmonar as alterações causadas pelo desenvolvimento gradual de fibrose interferem diretamente na sua função.

A liberação de quimiocinas e a expressão de seus receptores participam da cascata de eventos inflamatórios que resulta no acúmulo de leucócitos, formação de granuloma e controle da disseminação fúngica (SOUTO et al., 2003).

O mecanismo pelo qual os antígenos do *P. brasiliensis* induzem a expressão de quimiocinas e de seus receptores nos pulmões de camundongos, ainda é desconhecido.

Logo após a infecção com o *P. brasiliensis* este interage com os macrófagos alveolares e induz a liberação de citocinas e quimiocinas, que atraem os neutrófilos, as primeiras células a chegarem ao sítio inflamatório (KERR et al., 1988).

Avaliando a expressão de quimiocinas e seus receptores no curso da infecção pelo *P. brasiliensis* em camundongos, Souto et al. (2003) encontraram uma associação entre a produção de KC e MIP-1 α e a infiltração de neutrófilos nos

pulmões dos animais durante a fase aguda da infecção além de encontrar altos níveis de RANTES, MCP-1, IP-10 e MIG simultaneamente à infiltração de células mononucleares nos pulmões. Os autores também observaram o aumento de macrófagos na fase aguda após a infecção com *P. brasiliensis* o que pode ser devido aos níveis aumentados de MCP-1 e RANTES, que têm papel importante em doenças granulomatosas. Os achados em nosso estudo corroboram esses dados no que diz respeito à detecção das quimiocinas KC, MIG e RANTES que aumentaram de forma significativa com a progressão da infecção. A quimiocina KC, quimioatraente para neutrófilos, teve sua expressão aumentada gradativamente à infecção, já MIG e RANTES, ambas quimioatraentes para macrófagos, foram as que apresentaram expressão mais acentuada na fase aguda provavelmente por serem responsáveis pela interação dos macrófagos com os componentes do fungo e essenciais para a formação do granuloma.

No estudo realizado por Fornazim et al. (2003) foi observado o envolvimento de citocinas inflamatórias e de MIP-1 α no acúmulo local e na ativação de células nos pulmões de pacientes com PCM. Os autores encontraram grande quantidade de MIP-1 α no lavado broncoalveolar e nos macrófagos alveolares sobrenadantes, o que indicava um papel potencial desta quimiocina na regulação da migração e ativação de células inflamatórias para os sítios de infecção causados pelo *P. brasiliensis*. Em nosso estudo detectamos, também, a presença de MIP-1 α nos pulmões dos camundongos infectados, porém, esta foi encontrada em menor quantidade quando comparada com as demais quimiocinas analisadas, o que não diminui a sua importância na resposta inflamatória.

Nossos estudos demonstraram que as lesões no parênquima pulmonar evoluíram em paralelo com as alterações na mecânica respiratória mensuradas pelo método de oclusão no final da inspiração. Esses achados podem ser os responsáveis pelos distúrbios funcionais observados em pacientes com PCM crônica, de acordo com estudos anteriores (DEL NEGRO et al., 1982; LEMLE et al., 1983a; 1983b; AFONSO et al., 1979).

Quando avaliamos a progressão da PCM pulmonar através da mecânica respiratória observamos aumentos significativos das pressões dissipadas nos componentes viscoso, viscoelástico e/ou inhomogêneo, na variação total das pressões e também nas elastâncias estática e dinâmica, correlacionados ao aumento gradativo da celuridade e resposta inflamatória.

Tais achados diferem dos resultados encontrados por Shikanai-Yasuda et al. (1997) que afirmam que em seu trabalho não observaram alteração de elastância em ratos infectados com *P. brasiliensis*. Os dados encontrados por eles parecem ser simultâneos com o surgimento da fibrose do parênquima e com a destruição alveolar e sugerem que esse pode ser o fator principal das disfunções pulmonares em pacientes com PCM crônica. Tal discordância se deve, provavelmente, à metodologia empregada para a mensuração dos parâmetros da mecânica respiratória.

As alterações na mecânica pulmonar vêm acompanhadas da infiltração progressiva de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar e pela deposição de colágeno e fibras elásticas, evidenciados na análise histopatológica e descritas por vários autores (MONTENEGRO & FRANCO, 1994; CAMPOS et al., 1984; 1991; ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; GUTIÉRREZ et al., 1985; LONDERO &

SEVERO, 1981; FIGUEIREDO et al., 1986; FRANCO et al., 1998; KERR et al., 1988a; 1988b). Sugere-se que aspectos funcionais seriam compatíveis com padrão restritivo visto que o tecido fibroso reduz a distensibilidade tecidual, característica essencial da restrição da função pulmonar (WEST, 2002).

Em um modelo experimental de Silicose foram observadas alterações progressivas histológicas e funcionais, caracterizadas pelo desenvolvimento de fibrose e pelo aumento da elastância e resistência pulmonares (FAFFE et al., 2001), similar ao que aconteceu na PCM.

A fibrose pulmonar idiopática também gera alterações na mecânica pulmonar como conseqüência do processo inflamatório progressivo que leva à fibrose intersticial e à reorganização da arquitetura pulmonar (NAVA & RUBINI, 1999), corroborando nossos resultados.

Existem poucos trabalhos que abordam o estudo da função pulmonar na PCM (AFONSO et al., 1979; TUDER et al., 1985; FUNARI et al., 1999; DEL NEGRO et al., 1982; LEMLE et al., 1983a; 1983b; SHIKANAI-YASUDA et al., 1997) e estes visam as repercussões sistêmicas das lesões pulmonares apresentando dados radiológicos, espirométricos, hemodinâmicos e oximétricos em humanos. O presente estudo representa a primeira descrição da morfologia e mecânica pulmonares no curso da infecção experimental induzida pelo *P. brasiliensis* em camundongos, onde a análise da mecânica respiratória foi feita pelo método de oclusão no final da inspiração. Ressaltamos que o método da interrupção do fluxo ao fim da inspiração pressupõe cuidados especiais, sendo os mais importantes o controle do fluxo e do volume inspirado, que influenciam nos parâmetro da mecânica respiratória (KOCHI et al., 1988; D'ANGELO et al., 1989).

Shikanai-Yasuda et al. (1997) afirmam em seu estudo que a obstrução e restrição são os achados mais freqüentes na avaliação espirométrica de pacientes com PCM crônica.

Afonso et al. (1979) avaliaram as alterações funcionais pulmonares através de avaliação espirométrica e gasométrica de 36 pacientes portadores de PCM. Os resultados encontrados evidenciam que 7 dos pacientes apresentaram teste normal, 17 eram obstrutivos puros, 9 eram mistos e 3 restritivos puros. No grupo de pacientes sem alterações espirométricas foi observada hipoxemia em quase todos os pacientes, o que também foi observado nos demais grupos, sendo um pouco mais acentuada nos grupos com obstrução e misto e bem mais acentuada no grupo de padrão restritivo.

A hipoxemia pode gerar, em casos mais graves, a insuficiência respiratória, que pode ser observada em pacientes com PCM crônica (ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; CAMPOS et al., 1991).

Um dos métodos utilizados para avaliar a existência de hipoxemia bem como de mensurar seu grau é a gasometria arterial. No presente estudo realizamos a gasometria arterial e observamos que a hipoxemia foi mais acentuada na fase aguda do que na fase crônica da doença, fato este evidenciado pelas alterações da PaO₂ e da SaO₂. Estes dados são similares aos de Afonso et al. (1979).

As principais causas de hipoxemia são a presença de espaço morto alveolar, vaso e broncoconstrição reflexa e deficiência de produção de surfactante, com conseqüente colapso alveolar. A presença de áreas hipoperfundidas, mas com ventilação normal, causa desequilíbrio na relação ventilação/perfusão (efeito espaço

morto), além disso, pode haver desvio de fluxo sangüíneo para áreas não embolizadas, promovendo predomínio da perfusão sobre a ventilação (efeito shunt) (POVOA, 1996). Na prática, observa-se uma combinação entre as causas.

Na PCM a hipoxemia pode ser causada pela presença de fibrose pulmonar que gera um aumento da barreira alvéolo-capilar dificultando a relação ventilação-perfusão, alterando o padrão respiratório e conseqüentemente interferindo na mecânica respiratória. Segundo Entzian et al. (1990) a substituição do colágeno tipo III por tipo I, que é mais rígido, pode ser responsável por problemas nas trocas gasosas e alterações fisiológicas, que ocorrem nos estágios tardios de fibrose.

A gasometria arterial evidencia, também, as repercussões sistêmicas do processo inflamatório causado pelo *P. brasiliensis*. Observamos um quadro de acidose metabólica durante todo o processo avaliado, porém, com alterações mais intensas no início da resposta do hospedeiro à presença do fungo do que na fase mais tardia.

Todas estas alterações são conseqüência da grande proliferação de células (células efetoras, citocinas e quimiocinas) em resposta à presença do fungo que é mais intensa na fase inicial da infecção, que culmina com alterações morfológicas e vai se cronificando e gerando as alterações funcionais evidenciadas pela mecânica respiratória e que demonstram uma restrição à insuflação pulmonar devido à fibrose cicatricial e às seqüelas pelas lesões pulmonares.

O presente trabalho contradiz dados anteriores da literatura que cita estudos que relatam que os pacientes crônicos apresentam padrão ventilatório do tipo obstrutivo sobrepondo-se ao padrão misto ou restritivo (AFONSO et al., 1979; LEMLE et al., 1983a; 1983b). Sugerimos que o padrão ventilatório que encontramos

na PCM experimental é do tipo restritivo devido à fibrose, que gerou os aumentos nas elastâncias, restringindo a distensão do tecido pulmonar. No entanto, não avaliamos os volumes e as capacidades pulmonares o que nos permitiria afirmar, ou não, esta hipótese com precisão. Os estudos citados anteriormente foram realizados com humanos e não com animais e utilizaram a espirometria como teste para avaliar a função pulmonar e não realizaram a avaliação da mecânica respiratória, fato este que pode interferir no resultado alcançado.

O modelo experimental utilizado, modelo murino, é vantajoso, pois possibilita avaliar a resposta de animais geneticamente idênticos a um estímulo, no caso a infecção pelo *P. brasiliensis*. Este modelo ainda é pouco utilizado mas é extremamente fidedigno e permite que se trabalhe com um número reduzido de animais, visto que a resposta de todos é idêntica. Com ele, é possível acompanhar todo o processo, desde a inoculação até a cronificação da doença, acompanhando todas as fases o que não é possível em humanos. Por isso, sugerimos que este seja empregado para futuros estudos que visem não só a avaliação de parâmetros, mas também estudos que busquem seu acompanhamento e tratamento adequados.

CONCLUSÕES

- Camundongos infectados por via endovenosa com leveduras do *P. brasiliensis* apresentaram reação inflamatória pulmonar de padrão granulomatoso.
- O comprometimento pulmonar na PCM é progressivo, associa-se a aumento na quantidade de fungos das lesões, com o estabelecimento de fibrose tecidual e com aumento na expressão de quimiocinas.
- A resposta inflamatória pulmonar avaliada pela gasometria arterial demonstrou um quadro inicial de acidose mista, seguido por um quadro de acidose metabólica, evidenciando alterações mais acentuadas na fase aguda do que na fase crônica.
- As lesões no parênquima pulmonar evoluíram em paralelo com as alterações na mecânica pulmonar mensuradas pelo método de oclusão no final da inspiração e demonstram aumento nas elastâncias estática e dinâmica.
- Sugerimos que o estabelecimento da fibrose tecidual, na PCM crônica, gerou um padrão pulmonar do tipo restritivo como consequência da redução da distensibilidade tecidual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. **Am. J. Pathol.**, 84:164-191, 1976.

ADAMS, D. O.; MARIANO, P. Activation of mononuclear phagocytes for destruction of tumor cells as model for study of macrophage development. In: Gordon, A. S.; Silber, R.; Lobner, J. (eds.). Contemporary Topics in Hematology-Oncology. New York, Plenum Publishing Corp., v.3, p.69. 1984.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin, J. I.; Goldsteins, I. M.; Snyderman, R. S. (eds.). Inflammation: Basic principles and clinical correlates. New York, Raven Press, 1987.

AFONSO, J. E.; NERY, L. E.; ROMALDINI, H.; BOGOSSIAN, M.; RIBEIRO-RATTO, O. Função Pulmonar na Paracoccidiodomicose (Blastomicose Sul-Americana). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 21:269-280, 1979.

ÂNGULO-ORTEGA, A.; POLLAK, L. Paracoccidiodomycosis. In: Baker, R. D. (eds.). The pathological anatomy of the mycosis. Human infections with fungi, actinomycetes and algae. Springer-Verlag, Berlin, p-507-560, 1971.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, 103:185-195, 2002.

AULER Jr. J. O.; ZIN, W. A.; CALDEIRA, M. P.; CARDOSO, W. V.; SALDIVA, P. H. Pre- and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. **Chest**, 92:984-990, 1987.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annu. Rev. Immunol.**, 15:675-705, 1997.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotatic cytokines – CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.**, 55:97-179, 1994.

BÁRCENAS, C.; COCK, A. M.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Determinación de colágeno tipo I y III y la producción de fibronectina em um modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por conidias de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Assoc. Colomb. Alerg. Immunol.**, 8(3):64-64, 1999.

BATES, J. H. T.; DECRAMER, M.; CHARTRAND, D.; ZIN, W. A.; BODDENER, A.; MILI-EMILIC, J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J. Appl. Physiol.**, 59:732-737, 1985.

BATES, J. H. T.; BACONNIER, P.; MILI-EMILIC, J. Theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **J. Appl. Physiol.**, 6(5): 2204-2214, 1988.

BATES, J. H. T.; ABE, T.; ROMERO, P. V.; SATO, J. Measurement of alveolar pressure in closed chest dog during flow interruption. **J. Appl. Physiol.**, 67(1): 488-492, 1989.

BERNARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, 13:248-252, 2001.

BLOTTA, M. H. S. L.; MAMONI, R. L.; OLIVEIRA, S. J.; NOUÉR, S. A.; PAPAORDANOU, P. M. O. GOUVEIA, A.; CAMARGO, Z. P. C. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil. A Clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 61: 390-394, 1999.

BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, 161:3056-3063, 1998.

BLOTTA M. H.; MAMONI, R. L.; OLIVEIRA, S. J.; NOUER, S. A.; PAPAORDANOU, P. M.; et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** , 61:390-394, 1999.

BORELLI, D. Prevalence of systemic mycoses in Latin America, p. 59-64. *In Proc. Int. Symp. Mycoses. Publ. No. 205. Pan American Health Organization, Washington, D.C. 1970.*

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 111:460-475, 2003.

BRITO, T.; FAVA-NETTO, C. Disseminated experimental South America blastomycosis of guinea pig; a pathologic and immunologic study. **Path. Et. Microbiol.**, 26:29-43, 1963.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J. Immunol.**, 140:2786-2789, 1988a.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. **Int. J. Immunopharmacol.**, 10:945-952, 1988b.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect. Immunol.**, 57:2289-2294, 1989.

BRUMMER, E.; SUN, S. H.; HARRISON, J. L.; PERLMAN, A. M.; PHILPOTT, D. E.; STEVENS, D. A. Ultrastructure phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. **Infect. Immunol.**, 58:2628-2636, 1990.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6: 89-117, 1993.

BRUMMER, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells, p.213-223, 1994. In: Franco, M.; Lacaz, c. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. (eds.). Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Fla.

BURGER, E.; MIYAJI, M.; SANO, A. et al. Histopathology of paracoccidioidomycosis infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 55:235-242, 1996.

CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, 31:615-623, 1998.

CAMPOS, E. P.; PADOVANI, C. R.; CATANEO, A. M. J. Paracoccidioidomycose: estudo radiológico e pulmonar de 58 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 33:267-276, 1991.

CAMPOS, E. V.; SARTORI, J. C.; HETCH, M. L.; FRANCO, M. F. Clinical and serologic features of 47 patients with paracoccidioidomycosis treated by amphotericin B. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 26:179-236, 1984.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Imun.**, 66:800-806, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; COSTA, T. A.; MENGEL, J. O.; SIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; ANDRE, D. C.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, 68: 352-359, 2000.

CHANG, H. K.; MORTOLA, J. P. Fluid dynamics factors in tracheal pressure measurement. **J. Appl. Physiol.**, 51:218-225, 1981.

CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K.; RUTH, J.; LINCOLN, P.; KUO, M. C.; KUNKEL, S. L. Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. **Am. J. Pathol.**, 145: 1105-1113, 1994.

COATES, N. J.; McCOLL, S. R. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **J. Immunol.**, 166:5176-5182, 2001.

COCK, A. M.; CANO, L. E.; VÉLEZ, D.; ARISTIZÁBAL, B. H.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, 42(2):59-66, 2000.

CORREA, A. L.; RESTREPO, A.; FRANCO, L.; GOMEZ, I. Coexistência de lesiones extrapulmonares y patologia pulmonar silente. Descripcion de 64 pacientes. **Acta Med. Col.**, 16:304-308, 1991.

COUTINHO, Z.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, 18:1441-1454, 2002.

COUTINHO, Z.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Mortalidade por paracoccidioidomicose. Brasil 1980-1995. **II Congresso Brasileiro de Micologia**. Rio de Janeiro. Brasil. Resumo A57, 1998.

D'ANGELO, E.; CALDERINI, E.; TORRI, G.; ROBATTO, F. M.; BONO, D.; MILIC-EMILI, J. Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume, and time. **J. Appl. Physiol.**, 67:2556-2564, 1989.

D'ANGELO, E.; PRANDI, E.; TAVOLA, M.; CALDERINI, E.; MILIC-EMILI, J. Chest wall interrupter resistance in anesthetized paralyzed humans. **J. Appl. Physiol.**, 77:883-887, 1994.

D'ANGELO, E.; SANT'AMBROGIO, G.; AGOSTONI, E. Effect of diaphragm activity or paralysis on distribution of pleural pressure. **J. Appl. Physiol.**, 37:311-315, 1974.

DE BRITO, T.; FRANCO, M. F.; Granulomatous inflammation. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, 36:185-192, 1994.

DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIRIOLLO, A. M. **Paracoccidioidomycose** (blastomycose Sul-americana). SP. 3 ed. p 161-168, 1982.

DOMER, J. E.; MURPHY, W.; DEEPE, G. S.; FRANCO, M. Immunomodulation in the mycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, 30: 157-166, 1992.

DRAPIER, J. C.; HIBBS Jr, J. B. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophages effector cells. **J. Immunol.**, 140:2029-2035, 1988.

ELIAS, J. A.; FREUNDLICH, J. B.; KERR, J. A.; ROSENBLOOM, J. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. **Chest**, 97:1439-1445, 1990.

ENTZIAN, P.; HUCKSTADT, A.; KREIPE, H.; BARTH, J. Determination of serum concentrations of type III procollagen peptide in mechanically ventilated patients. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 142:1079-1082, 1990.

FAFFE, D. S.; SILVA, G. H.; KURTZ, P. M. P.; NEGRI, E. M.; CAPELOZZI, V. L.; ROCCO, P. R. M.; ZIN, W. A. Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. **J. Appl. Physiol.**, 90:1400-1406, 2001.

FARBER, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, 61:246-257, 1997.

FAVA-NETTO, C. Contribuição para o estudo da Blastomicose de Lutz (Blastomicose Sul-Americana). **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, 21:122-132, 1961.

FIGUEIREDO, F., ALVES, L. M. C.; ROSSI, M. A. Tumor necrosis factor production *in vitro* and *in vivo* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clin. Exp. Immunol.**, 93:189-194, 1993.

FIGUEIREDO, F.; BOCCA, A. L.; SILVA, C. L. Role of CD4+ and CD8+ T cells in granulomatous reaction induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. In: **XIX Congresso**

Internacional da Academia Internacional de Patologia, Madri, Espanha, abstract 577, 1992.

FIGUEIREDO, F.; SILVA, C. L.; ALVES, L. M. C. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 19:651-657, 1986.

FORNARI, M. C.; BAVA, A. J.; GUERENO, M. T.; BERARDI, V. E.; SILAF, M. R.; NEGRONI, R.; DIEZ, R. A. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 8:1036-1038, 2001.

FORNAZIM, M. C.; BALTHAZAR, A.; QUAGLIATO, Jr. R.; MAMONI, R. L.; GARCIA, C.; BLOTTA, M. H. S. L. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. **Eur. Respir. J.**, 22:895-899, 2003.

FRANCO, L.; NAJVAR, L.; GOMEZ, B. L.; RESTREPO, S.; GRAYBILL, J. R.; RESTREPO, A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 58:424-430, 1998.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. G. Anatomia patológica. In: Del Negro, G.; Lacaz, C. S.; Fiorillo, A. M. (eds.). Paracoccidioidomicose. São Paulo, Savier, Edusp, 1980.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, A. S.; DILLON, N. L.; MOTA, N. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 20:129-132, 1987.

FRANCO, M.; PERAÇOLI, M. T.; SOARES, A.; MONTENEGRO, R.; MENDES, R. P.; MEIRA, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Trop. Med. Mycol.**, 5:115-149, 1993.

FRIDMAN, S. L. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. **N. Engl. J. Med.**, 355: 1835, 1993.

FUNARI, M.; KAVAKAMA, J.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CASTRO, L. G. M.; BERNARD, G.; ROCHA, M. S.; CERRI, G. G.; MÜLLER, N. L. Chronic pulmonary Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis): high resolution CT findings in 41 patients. **AJR**, 173:59-64, 1999.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNÁNDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model base don the study of 46 patients. **Mycopathol.**, 58:63-70, 1976.

GONZALEZ, A.; de GREGORI, W.; VÉLEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. F. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine

macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immunol.*, 68:2546-2552, 2000.

GUIMARÃES, F. N. Inoculações em hamsters da blastomicose sul-americana (doença de Lutz), da blastomicose queiloideana (doença de Lobo) e da blastomicose dos índios do Tapajós-Xingu. *Hospital*, 66:581-593, 1964.

GUTIÉRREZ, F.; SILVA, M.; PELAEZ, F.; GOMEZ, I.; RESTREPO, A. The radiological appearances of pulmonary paracoccidioidomycosis and the effect of ketoconazole therapy. *J. Pneumol.*, 11:1-12, 1985.

HILDEBRANDT, J. Pressure-volume data of cat lung interpreted by a plastoelastic linear viscoelastic model. *J. Appl. Physiol.*, 28:365-372, 1970.

HORIE, T.; HILDEBRANDT, J. Dynamic compliance, limit cycles, and static equilibrium of excised cat lung. *J. Appl. Physiol.*, 31:423-430, 1971.

HUNNINGHAKE, G. W.; KALICA, A. R. Approaches to the treatment pulmonary fibrosis. *Am. J. Crit. Care Med.*, 151:915-918, 1995.

IABUKI, K.; DEFAVERI, J.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T.; GERUSA, N. S. M. Paracoccidioidomycose experimental. In: Del Negro, G.; Lacaz, C. S.; Fiorillo, A. M. (eds.). Paracoccidioidomycose. São Paulo, Sarvier-Edusp, p.69-84, 1982.

IABUKI, K.; MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in "Syrian" hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence specific antigens and serum levels of antibodies. **Mycopathol.**, 67:131-141, 1979.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence or IFN-gamma production. **J. Interferon Cytokine Res.** 20:89-97, 2000.

KERR, I. B.; ARARIPE, J. R.; OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H. L. Paracoccidioidomycosis: a seqüencial histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 30:336-350, 1988.

KERR, I. B.; ARARIPE, J. R.; OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H.L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally infected rats. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 30:336-350, 1988a.

KERR, I. B.; OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H. L. Connective matrix organization in chronic granulomas of experimentl paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, 103:11-20, 1988b.

KERR, I. B.; SCHAEFFER, G.V.; MIRANDA, D. S. Sex hormones and susceptibility of the rat to paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, 88:149-154, 1984.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W. A. et al. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. **J. Appl. Physiol.**, 64: 2636-2646, 1988.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W. A. et al. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J. Appl. Physiol.**, 64: 441-450, 1988b.

LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A.; DEL NEGRO, G.; SIQUEIRE, A. M. Aspectos clínicos gerais. Formas polares de paracoccidiodomicose. Particularidades clínicas, infanto-juvenil. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORILLO, A. M. (eds) **Paracoccidiodomicose**. São Paulo: Sarvier, Edusp, 141-147, 1982.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidiodomicose, p. 248-261. *In* Micologia médica, 8th ed. Sarvier Editora, São Paulo, Brazil, 1991.

LEMLE, A.; WANKE, B.; MANDEL, M. B. Pulmonary localization of paracoccidiodomycosis: lung function studies before and after treatment. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 25:73-78, 1983a.

LEMLE, A.; WANKE, B.; MIRANDA, J. L.; KROPF, G. L.; MANDEL, M. B.; MANDEL, S. Pulmonary function in paracoccidiodomycosis (south American blastomycosis). **Chest**, 83:827-828, 1983b.

LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; MIYAJI, M. et al. Fibrosis patterns of lesions developed by athymic and euthymic mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 27:2301-2308, 1994.

LONDERO, A. T. Paracoccidioidomicose. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **J. Pneumol.**, 12:41-57, 1986.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Paracoccidioidomicose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul, **J. Pneumol.**, 16:129-132 1990.

LONDERO, A. T.; SEVERO, L. C. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, 75:65-74, 1981.

LORING, S. H.; MEAD, J. Action of the diaphragm on the rib cage inferred from forced-balance analysis. **J. Appl. Physiol.**, 53:756-760, 1982.

LUSTER, A. D. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, 338:436-445, 1998.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hynoblastomycoses americanas. **Brasil-Med.**, 22: 121-124, 1908.

MAQUART, F. X.; GILLERY, P.; BOREL, J. P. Cytokines and fibrosis. **Eur. J. Dermatol.**, 4:91-97, 1994.

MARQUES, S. A.; FRANCO, M. F.; MENDES, R. P.; SILVA, N. C. A.; BACILI, C.; CURCELLI, E. D.; FERACIN, A. C. M.; OLIVEIRA, C. S.; TAGLIARINI, J. V.; DILLON, N. L. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo – Brasil). **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, 25: 87-92, 1983.

MARQUES MELLO, L.; SILVA-VERGARA, M. I.; RODRIGUES Jr, V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* presents a Th2 immune response characterized by high interleukin- and interleukin-5 production. **Hum. Immunol.**, 63:149-154, 2002.

MC EWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, 26:305-306, 1995.

MC EWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATINO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, 25:165-175, 1987.

MEAD, J. Mechanical properties of lungs. **Physiol. Rev.**,41:281-330, 1961.

MEAD, J.; WHITTENBERGER, J. L. Evaluation of airway interruption technique as a method for measuring pulmonary air-flow resistance. **J. Appl. Physiol.**, 6:408-416, 1954.

MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, Cap. 16, p. 233-258, 1994.

MILIC-EMILI, J. Ventilation. In: West, J.B. (eds.) Regional differences in the lung. New York, N.Y., Academy Press Inc.; p.167-199, 1977

MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Granuloma formation and killing functions of granuloma in congenitally athymic nude mice infected with *Blastomyce dermatides* and *Paraccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, 82:129-141, 1983.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology, p.131-147, 1994. In: Franco, M.; Lacaz, C. S.; Restrepo-Moreno and Del Negro, G. (eds.), Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, Cap. 9, p. 131-150, 1994.

MORTOLA, J. P.; NOWORAJ, A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J. Appl. Physiol.**, 55(1): 250-253, 1983.

MOSCARDI, M.; FRANCO, M. F. Paracoccidioidomicose experimental do camundongo. II-Infecção intraperitoneal após sensibilização prévia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 23:204-211, 1981.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of Paracoccidioides brasiliensis multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J. Med. Microbiol.**, 40:159-164, 1994.

MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. In situ localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, 27:149-158, 1989.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nature Immunol.**, 2:123-128, 2001.

MOUNT, L. E. The ventilation flow - resistance and compliance of rat lungs. **J. Appl. Physiol.**, 127:157-167, 1955.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; HERBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J. J.; POWER, C. A. Internacional Union of Pharmacology. SSII. Nomenclatura for Chemokine Receptors. **Pharmacological Reviews**, 52(1):145-176, 2000.

NAVA, S.; RUBINI, F. Lung and chest wall mechanics in ventilated patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. **Thorax**, 54:390-395, 1999.

OTIS, A. B.; MCKERROW, C. B.; BARTLETT, R. A.; MEAD, J.; MCILROY, M. B.; SELVERSTONE, N. J. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. **J. Appl. Physiol.**, 8:427-443, 1956.

PANIAGO, A. M. M. M. Paracoccidiodomicose: estudo clínico e epidemiológico de casos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU-UFMS). Campo Grande, 2000. 170 p. Dissertação de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz.

PASCOAL, C. P. Gasometria Arterial – Especialização em Fisioterapia Respiratória em UTI com ênfase em Clínica Médica Hospital Gloria, 2005 (<http://www.capscurso.com.br/docs/GASOMETRIA%20ARTERIAL.pdf>)

PATIÑO, M. M.; GOMEZ, I.; SILVA, M.; ROBLEDO, J.; GUTIERREZ, F.; RESTREPO, A. El espectro de las manifestaciones radiológicas de la paracoccidioidomicosis. **Acta Med. Colomb.**, 12:230-236, 1987.

PERAÇOLI, M. T.; MOTA, N. G.; MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster. Morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. **Mycopathologia**, 79:7-17, 1982.

PESLIN, R.; PAPON, J.; DUVIVER, C.; RICHALET, J. Frequency response of the chest: modeling and parameter estimation. **J. Appl. Physiol.**, 39:523-534, 1975.

POVOA, R. Tromboembolismo pulmonar. Quadro clínico e diagnóstico. **Arq Bras Cardiol.**, 67 (3), 1996.

PREMACK, B. A.; SCHALL, T. J. Chemokine receptors: Gateways to inflammation and infection. **Nat. Med.**, 2:1174-1178, 1996.

RATTENBORG, C. C.; HOLADAY, D. A. Constant flow inflation of the lungs. Theoretical analysis. **Acta. Anaesthesiol. Scand.**, 23:S211-223, 1966.

REMICK, . G.; GREEN, L. B.; NEWCOMB, D. E.; GARG, S. J.; BOLGOS, G. L.; CALL, D. R. CXC chemokine redundancy ensures local neutrophil recruitment during acute inflammation. **Am. J. Pathol.**, 159:1149-1157, 2001.

RESTREPO, A. Immune response in paracoccidioidomycosis: study of 16 patients before and after treatment. **Saboraudia.**, 21:35-39, 1978.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, a puzzle still unsolved. **Sabouraudia.**, 23: 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, 46:346-353, 1984.

RESTREPO, A.; GREER, D. L.; VASCONCELLOS, M. Paracoccidioidomycosis, a review. **Review Med. Trop. Vet. Mycol.**, 8: 97-123, 1973.

RESTREPO, A.; ROBLEDO, M.; GIRALDO, R.; HERNÁNDEZ, H.; SIERRA, F.; GUTIÉRREZ, F.; LONDOÑO, F.; LÓPEZ, R.; CALLE, G. The Gamut of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Med.**, 61: 33-42, 1976.

RESTREPO, S.; TOBON, A. M.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *P. brasiliensis* conidia. **J. Vet. Mycol.**, 30:173-184, 1992.

RESTREPO, A.; McEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, 39:233-241, 2001.

RODARTE, J. R.; REHDER, K. Dynamics of respiration. In: Macklem PT, Mead J (eds). **Handbook of Physiology**. The respiratory system. Mechanics of breathing. The American Physiological Society, Bethesda, 1986; v.3, p.131-144.

ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. **Curr. Opin. Immunol.**, 9: 484-490, 1997.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, 56:711-713, 1988.

SALDIVA, P. H.; ZIN, W. A.; SANTOS, R. L.; EIDELMAN, D. H.; MILIC-EMILI, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J. Appl. Physiol.**, 72:302-306, 1992.

SALDIVA, P. H.; CARDOSO, W. V.; CALDEIRA, M. P.; ZIN, W. A. Mechanics in rats by end-inflation occlusion and single-breath methods. **J. Appl. Physiol.**, 63:1711-1718, 1987.

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host parasite relationships. **Mycopathol.**, 79: 159-182, 1982.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall structure and virulence – a review. **Mycopathol.**, 62: 77-86, 1977b.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; SERANO, L. E. Host-parasite relationships in the yeast like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. **Infect. Immun.**, 15: 343-346, 1977a.

SAROSI, A. G.; SCOTT, F. D. **Fungal Diseases of the lung**. USA. 3 ed. p 1049-1058, 2000.

SCHWARZ, M. A. Acute lung injury: cellular mechanisms and derangements. **Paediatr. Respir. Rev.**, 2:3-9, 2001.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; PEREIRA, P. M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.; DUARTE, M. I. S.; ASSIS, C. M.; GERALDES, E. A.; SALDIVA, P. H. Lung tissue mechanics in the early stages of induced paracoccidioidomycosis in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30:1175-1179, 1997.

SILVA, C. L.; ALVES, L. M.; FIGUEIREDO, F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistense of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology**, 140:1189-1194, 1994.

SILVA, C. L.; FAZIOLI, R. A. A *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide having granuloma-inducing toxic and macrophage-stimulating activity. **J. Gen. Microbiol.**, 131: 1497-1501, 1985.

SILVA, C. L. Granulomatous reaction induced by lipids isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 79:70-73, 1985.

SIMILOWSKI, T.; LEVY, P.; CORBEIL, C.; ALBALA, M.; PARIENTE, R.; DERENNE, J. P. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. **J. Appl. Physiol.**, 67:2219-2229, 1989.

SIMILOWSKI, T.; BATES, J. H. T. Two-compartment modeling of respiratory system mechanics at low frequencies: gas redistribution or tissue rheology? **Eur. Respir. J.**, 4:353-358, 1991.

SOUTO, J. T.; ALIBERTI, J. C.; CAMPANELLI, A. P.; LIVONESIS, M. C.; MAFFEI, C. M.; FERREIRA, B. R.; TRAVASSOS, L. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. **Am. J. Pathol.**, 163:583-590, 2003.

SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEIFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.*, 156:1811-1820, 2000.

SOUZA, A. B.; SANTOS, F. B.; NEGRI, E. M.; ZIN, W. A.; ROCCO, P. R. M. Remodelamento do tecido pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. **J. Pneumol.**, 29(4):235-245, 2003.

TUDER, R.M.; EL IBRAHIM, R.; GODOY, C. E.; DE BRITO, T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia.**, 92: 179-188, 1985.

VIEGAS, C. A. A. Gasometria Arterial. **J. Pneumol.**, 28(3):233-238, 2002.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, D. S.; RESTREPO, A. M.; DEL NEGRO, G. Eds. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, FL: CRC Press. Cap 7, p.109-120, 1994.

WARD, P. A.; HUNNINGHAKE, G. W. Lung inflammation and fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 157:123-129, 1998.

WEST, J. B. **Fisiologia Respiratória**. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2002.

WILLIAMS, G. T.; WILLIAMS, W. J. Granulomatous inflammation – a review. **J. Clin. Pathol.**, 36: 723-733, 1983.

WOODS J. P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. **Curr. Opin. Microbiol.**, 6:327-331, 2003.

YOSHIE, O.; IMAI, T.; NOMIYAMA, H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. **J. Leukol. Bio.**, 62:634-644, 1997.

ZIN, W. A.; PENGELLY, L. D.; MILI-EMILIC, J. Partition of respiratory mechanics in anesthetized cats. **J. Appl. Physiol.**, 24: 708-713, 1983.

ZIN, W. A.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. R.; SAKAE, R. S.; CARVALHO, A. L.; SALDIVA, P. H. Effects of abdominal opening on respiratory system mechanics in ventilated rats. **J. Appl. Physiol.**, 66:2496-2501, 1989.

ZLOTNIK, A.; MORALES, J.; HEDRICK, J. A. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. **Crit. Rev. Immunol.**, 19:1-47, 1999.

