

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Paula Cristina de Souza Souto

**“PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL: INFECÇÃO E
DOENÇA EM ANIMAIS INFECTADOS POR UM ISOLADO
ATÍPICO DA CEPA Pb18”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liana Maria Cardoso Verinaud

Campinas, 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

So89p

Souto, Paula Cristina de Souza

Paracoccidioidomicose experimental: infecção e doença em animais infectados por um isolado atípico da cepa Pb18 / Paula Cristina de Souza Souto. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Liana Maria Cardoso Verinaud.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Paracoccidioidomicose. 3. Mutação (Biologia). 4. Micologia. 5. Resposta imune. I. Verinaud, Liana Maria Cardoso. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Experimental Paracoccidioidomycoses infection and disease in animals infected by an atypical isolated of Pb18 strain.

Palavras-chave em inglês: *Paracoccidioides brasiliensis*; Paracoccidioidomycoses; Mutation (Biology); Mycology; Immune response.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Liana Maria Cardoso Verinaud, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, Lucia Helena Faccioli, Rosane Christine Hahn, José Vassalo.

Data da defesa: 13/06/2006.

Campinas, 13 de junho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Liana Maria Cardoso Verinaud (Orientadora)


Assinatura

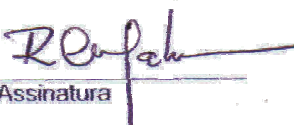
Prof^a. Dr^a. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Lucia Helena Faccioli


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Rosane Christine Hahn


Assinatura

Prof. Dr. José Vassalo


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Assinatura

Prof^a. Dr^a. Selma Giorgio

Assinatura

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, com apoio financeiro da FAPESP (Processos #01/10551-7 e #03/01891-4).

“À medida que adquirimos maior conhecimento, as coisas não ficam mais compreensíveis e sim mais misteriosas.”

Albert Schweitzer

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras.”

Albert Einstein

“O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano.”

Isaac Newton

Aos meus queridos pais, Paulo e Neuza,
e às minhas irmãs, Claudia, Ana e Maria Isabel, que sempre
acreditaram em mim e me apoiaram
em todos os momentos da vida,
dedico este trabalho.

Agradecimentos

A Deus, pela força e por todas as bênçãos recebidas ao longo da vida.

Aos meus pais e as minhas irmãs, por todo o carinho, paciência, companheirismo, apoio e amor que sempre dedicaram a mim. Sem eles essa jornada seria impossível.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Liana Verinaud, pela amizade, compreensão e confiança dedicados durante vários momentos da minha vida profissional e pessoal.

À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

Às minhas companheiras de pesquisa, Vânia, Jacy e Carol, pela amizade, apoio, carinho e principalmente por todos os momentos bons e ruins que passamos juntas e que me fizeram crescer bastante.

Aos meus amigos do coração, Wagner e Thais, por estarem ao meu lado, incentivando e apoiando, em vários momentos importantes do meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus companheiros de laboratório, Camila, Patrícia, Carolina, Rose, Rafael e Jony, pelos momentos agradáveis e de muita risada.

Ao meu querido amigo Luis Antônio Peroni, pela amizade e pelos valiosos auxílios dados para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos de Barra do Garças, principalmente, Marco, Flávia, Fernanda, Eliane, Dona Anísia, Giane, Andréia e Luciana, pela amizade, companheirismo e todos os momentos bons que tornaram a fase final deste trabalho menos desgastante.

À Prof^a. Dr^a. Wirla Tamashiro, por sua preciosa ajuda em vários protocolos experimentais e por sua participação na pré-banca e banca examinadoras desta tese.

Ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva e a bióloga Simone do CIPED/UNICAMP, pelo auxílio na técnica de citometria de fluxo.

À Prof^a. Dr^a. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta, pela participação na análise prévia desta tese.

À Prof^a Dr^a Lucia Helena Faccioli, à Prof^a Dr^a Rosane Christine Hahn e ao Prof. Dr. José Vassallo, pela participação como membros da banca examinadora.

A todos os meus amigos, professores, funcionários e alunos, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, por toda a colaboração e auxílio em muitos procedimentos experimentais e burocráticos.

Aos colegas do Instituto de Ciências e Letras do Médio Araguaia, da Universidade Federal de Mato Grosso, pelo apoio e estímulos importantes para a finalização desta tese.

Enfim, gostaria de agradecer muito a todas as pessoas que de uma forma ou de outra participaram do desenvolvimento deste trabalho e da minha formação profissional.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Antigen Presenting Cell
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain-Heart-Infusion
CCMV	Cowpea Chlorotic Mottle Virus
CFA	Cell Free Antigen
ConA	Concanavalin A
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fc	Fragment crystalline
FcR	Fragment crystalline receptor
FCS	Fetal Calf Serum
gp43	Glicoproteína de 43kDa
gp70	Glicoproteína de 70kDa
IFN-γ	Interferon-gamma
IL12	Interleukin 12
IL4	Interleukin 4
LD50%	Lethal dose 50% kill
LPS	Lipopolysaccharide
MCMV	Murine Cytomegalovirus
MHV-3	Murine hepatitis virus-3
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NO	Nitric oxide
NTG	<i>N</i> -metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
OPD	Orto-Fenil-Diamina
PBS	Phosphate buffered saline
PCM	Paracoccidioidomicose
PHA	Phytohemagglutinin

PMA	Phorbol Meristate Acetate
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride
PVM	Pneumonia Virus of Mice
rRNA	Ribosomal Ribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SPF	Specific patogen free
TCP	Teste do Coxim Plantar
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF	Tumor Necrosis Factor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Cultura de amostras de *P. brasiliensis* cultivadas a 37°C
- Figura 2:** Células de *P. brasiliensis* cultivadas a 37°C
- Figura 3:** Célula fúngica da amostra Pb18UNICAMP após a passagem em animal
- Figura 4:** Cultura de amostras de *P. brasiliensis* cultivadas a 25°C
- Figura 5:** Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) dos CFA de Pb18UNICAMP e Pb18
- Figura 6:** "Immunoblotting" dos CFA de Pb18 e Pb18UNICAMP utilizando anticorpos produzidos em pacientes com paracoccidioidomicose
- Figura 7:** Índice tímico
- Figura 8:** Índice hepático
- Figura 9:** Índice esplênico
- Figura 10:** Celularidade do timo
- Figura 11:** Celularidade do baço
- Figura 12:** Fotomicrografia do timo
- Figura 13:** Fotomicrografia do timo
- Figura 14:** Fotomicrografia do timo de animais infectados com P18UNICAMP
- Figura 15:** Fotomicrografia do timo
- Figura 16:** Fotomicrografia do fígado
- Figura 17:** Fotomicrografia do baço
- Figura 18:** Fotomicrografia de lesões de disseminação
- Figura 19:** Citometria de fluxo dos timócitos
- Figura 20:** Citometria de fluxo dos esplenócitos

- Figura 21:** Volume das patas de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* 24 horas após o Teste do coxim plantar
- Figura 22:** Proliferação celular com o mitógeno ConA
- Figura 23:** Proliferação celular utilizando antígeno de *P. brasiliensis*
- Figura 24:** Concentração de IL 4 no soro de animais inoculados com *P. brasiliensis*
- Figura 25:** Concentração de TNF no soro de animais inoculados com *P. brasiliensis*
- Figura 26:** Concentração de IL4 no sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas
- Figura 27:** Concentração de TNF no sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas
- Figura 28:** Concentração de IFN γ no sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas
- Figura 29:** Concentração de IL4 no sobrenadante de cultura de células do timo estimuladas
- Figura 30:** Concentração de TNF no sobrenadante de cultura de células do timo estimuladas
- Figura 31:** Concentração de IFN γ no sobrenadante de cultura de células do timo estimuladas



RESUMO

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que cresce na forma micelial a temperatura ambiente e na forma de levedura a 35-37°C. Recentemente, no laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp, foi observado que uma amostra da cepa virulenta Pb18 crescia de forma diferente das outras. A análise preliminar desta cultura mostrou que o fungo se apresentava, exclusivamente, em formas intermediárias entre levedura e micélio. Assim, este trabalho teve como objetivo a caracterização parcial deste isolado atípico através da comparação com a cepa selvagem. Para tanto, foram analisados: a morfologia do isolado a 25 e 37°C; a composição de proteínas de parede celular; o desenvolvimento da doença e a resposta imunológica adaptativa em camundongos BALB/c. Os resultados mostraram que este isolado não alterou a sua forma de crescimento, independente da temperatura de cultivo ou da passagem por animal. Através da análise das proteínas de parede celular observou-se ausência de expressão de algumas proteínas e baixa concentração da glicoproteína 43 (gp43) no fungo atípico quando comparado com o selvagem. A infecção causada por este isolado atípico foi mais branda do que aquela observada com a cepa virulenta Pb18, com completa resolução das lesões de disseminação. Entretanto, não foi possível determinar diferenças na avaliação da resposta imune adaptativa dos animais infectados com os diferentes isolados. Apesar da necessidade de mais estudos, estes resultados indicam que o isolado atípico pode vir a ser uma importante ferramenta para o estudo da biologia do fungo e sua relação com o hospedeiro.



ABSTRACT

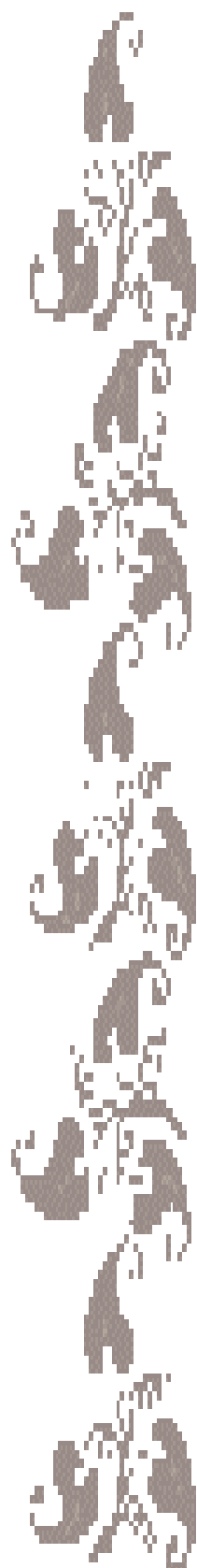
P. brasiliensis is a dimorphic fungus that grows in mycelial phase at room temperature and in yeast form at 35-37°C. Recently, in the Immunopathology Laboratory of the Department of Microbiology and Immunology (Biology Institute/Unicamp), it was observed that a sample of the virulent strain Pb18 grew in a different way from other ones. Preliminary analysis of this culture showed that the isolated exhibited, exclusively, an intermediate form of pseudohyphae. That way, the objective of this work was the partial characterization of the atypical isolated (Pb18PH) through the comparison with the wild strain Pb18. For this, there were analyzed: the morphology of the isolated to 25 and 37°C; the composition of cell wall proteins; the disease development and the adaptative immune response in BALB/c mice. The results showed that Pb18PH didn't alter their growth form, independently of the cultivation temperature or the passage through animal. By the analysis of the cell wall proteins, it was observed that Pb18PH didn't express some proteins and presented low concentration of the glycoprotein 43 (gp43) when compared with the wild one. The infection caused by this atypical isolated was softer than that observed with the virulent strain Pb18. Besides, it was noted the complete resolution of disseminated lesions. However, it was not possible to determine differences in the adaptative immune response evaluation of the animals infected with the different isolated. To despite the need of more studies about this atypical isolated, our results indicate that Pb18PH would come to be an important tool for the study of the fungus biology and their relationship with the host.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Agente Etiológico	2
1.2. A Doença	4
1.3. Modelos Animais	7
1.4. Fatores de Virulência e Mutantes	9
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Animais	19
3.2. Fungos	19
3.3. Comparação morfológica e protéica dos dois isolados	20
3.3.1 Análise morfológica dos isolados mantidos a 37°C ..	20
3.3.2. Determinação do crescimento à temperatura ambiente	21
3.4.3. Avaliação das proteínas de parede e padrão de reconhecimento antigênico	21
3.4. Preparo de antígenos de <i>P. brasiliensis</i> CFA (Cell Free Antigen)	22
3.5. Estudo comparativo da infecção causada pelos isolados	23
3.5.1. Preparo do inóculo	23
3.5.2. Infecção experimental	23
3.5.3. Delineamento experimental	24
3.5.4. Avaliação do peso dos órgãos	24
3.5.5. Avaliação da celularidade do timo e baço	24
3.5.6. Análise histopatológica	24
3.5.7. Detecção do isolado atípico Pb18UNICAMP no timo por imuno- histoquímica.....	25
3.5.8. Detecção de morte celular por apoptose no timo	25
3.5.9. Caracterização das populações de linfócitos T por citometria de fluxo	26
3.6. Avaliação imunológica	27
3.6.1. Resposta de hipersensibilidade celular específica	27

3.6.2. Ensaio de proliferação celular	27
3.6.3. Avaliação da liberação de citocinas na infecção.....	28
3.6.3.1. Obtenção de amostras de soro	29
3.6.3.2. Obtenção de amostras de sobrenadante de cultura de células do baço e do timo	29
3.6.3.3. Dosagem por ELISA	29
3.7. Análise estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Comparação morfológica e protéica dos isolados	32
4.1.1. Análise morfológica dos isolados mantidos a 37°C	32
4.1.2. Determinação da forma de crescimento à temperatura ambiente	34
4.1.3. Avaliação das proteínas de parede e padrão de reconhecimento antigênico	35
4.2. Estudo comparativo da infecção causada pelos isolados	38
4.2.1. Avaliação do peso de órgãos	38
4.2.2. Avaliação da celularidade do timo e baço	41
4.2.3. Análise histopatológica	43
4.2.3.1. Timo	44
4.2.3.2. Fígado e Baço	49
4.2.3.3. Lesões de Disseminação	51
4.2.4. Caracterização das populações de linfócitos T por citometria de fluxo .	53
4.2.4.1. Timo	53
4.2.4.2. Baço	54
4.3. Avaliação imunológica	55
4.3.1. Resposta de hipersensibilidade celular específica	55
4.3.2. Ensaio de proliferação celular	57
4.3.3. Avaliação da liberação de citocinas na infecção	59
4.3.3.1. Citocinas no soro	59
4.3.3.2. Citocinas no sobrenadante de cultura de baço	61
4.3.3.3. Citocinas no sobrenadante de cultura de timo	64
5. DISCUSSÃO	68

6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS	100
Anexo 1	101



1. INTRODUÇÃO

1.1. O Agente Etiológico:

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa crônica causada por um fungo dimórfico denominado *Paracoccidioides brasiliensis* (BRUMMER *et al.*, 1993; GOLDANI & SUGAR, 1995).

Este fungo, no indivíduo infectado ou quando cultivado a 37°C, apresenta-se na forma de levedura, caracterizada macroscopicamente por colônias moles e rugosas que, microscopicamente, são compostas por células ovais ou alongada possuindo múltiplos brotamentos, lembrando uma roda de leme. Já em temperatura ambiente, o *P. brasiliensis* desenvolve-se sob a forma micelar, apresentando-se como colônias brancas, pequenas e irregulares, cobertas por um curto micélio aéreo, sendo esta, a provável forma encontrada no ambiente. Microscopicamente, esta forma é caracterizada por hifas finas e septadas (BRUMMER *et al.*, 1993; GOLDANI & SUGAR, 1995).

Inicialmente o *P. brasiliensis* era classificado, pela sistemática clássica, como um fungo imperfeito do filo Deuteromicota, classe Hyphomycetes, pelo fato de não ser conhecida nenhuma estrutura sexual que permitisse uma classificação mais precisa (SAN-BLAS *et al.*, 2002). Atualmente, apesar de ainda não ter sido descoberto nenhuma estrutura sexual, através da comparação filogenética de dermatófitos e fungos dimórficos, baseada nas seqüências de rRNA da subunidade ribossomal maior (28S), o *P. brasiliensis* foi mais precisamente classificado como pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Onygenales e Família Onygeneceae *sensu*

Iato, juntamente com o *Blastomyces dermatitides* e o *Histoplasma capsulatum* (LECLERC *et al.*, 1994; BAGAGLI *et al.*, 2006).

Apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa, o nicho ecológico do *P. brasiliensis* ainda não é totalmente conhecido. Acredita-se que este possa ser encontrado saprofiticamente na natureza, onde, provavelmente, clamidósporos e conídios do fungo estejam presentes no solo (MEDINA & BODZIAT, 1949) ou em restos vegetais (LACAZ, 1949). Esta hipótese é apoiada pelo fato do fungo já ter sido isolado em solos de regiões endêmicas como Argentina (NEGRONI, 1966), Venezuela (ALBORNOZ, 1971) e Brasil (SILVA-VERGARA, *et al.*, 1998). Entretanto, muitas tentativas semelhantes têm falhado em isolar o fungo do solo (RESTREPO, 1985).

Além do solo, o *P. brasiliensis* já foi isolado nas fezes de alguns animais silvestres como de morcegos frutívoros (*Artibeus lituratus*) (GROSE & TAMSITT, 1965) e pingüim (*Pygoscelis adeliae*) (GARCIA *et al.*, 1993). Recentemente, o *P. brasiliensis* foi também isolado de tecidos de tatus (*Dasypus noveminctus*) que vivem em áreas de alta incidência da doença, sendo este animal indicado como um provável reservatório do fungo (BAGAGLI *et al.*, 1998; SILVA-VERGARA *et al.*, 2000).

Associado aos prováveis reservatórios do fungo muito se tem discutido sobre as principais características ecológicas favoráveis ao *P. brasiliensis*. Neste contexto, regiões de clima úmido, com temperaturas amenas (17 a 24°C), alto índice pluviométrico, altitude média, solo ácido e vegetação abundante parecem ser as melhores regiões para o desenvolvimento do fungo (RESTREPO *et al.*, 2001).

1.2. A Doença:

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica, que foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1908, por Adolpho Lutz, a partir de observações de lesões na boca de dois pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia localizada na cidade de São Paulo (LUTZ, 1908). Atualmente, estima-se que por toda a região endêmica, aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas, apesar da maioria não apresentar sintomas clínicos (RESTREPO *et al.*, 2001).

Geograficamente esta micose está restrita a América Latina, desde o México até a Argentina, constituindo a principal micose sistêmica desta região. Entretanto, esta doença não está distribuída de forma homogênea por todo o continente, encontrando-se restrita a apenas alguns países. Destes, o Brasil é responsável pela grande maioria dos casos reportados (80%), seguido da Colômbia e Venezuela (BRUMMER *et al.*, 1993; GOLDANI & SUGAR, 1995). Nos países onde a doença é endêmica, os casos não são distribuídos homogeneamente pelo território, mas tendem a se concentrar em regiões de florestas úmidas (tropicais ou subtropicais) (BRUMMER *et al.*, 1993). No Brasil, a maior parte dos casos ocorre na região sudeste, mais precisamente no estado de São Paulo (GOLDANI & SUGAR, 1995).

A paracoccidioidomicose raramente acomete crianças (3%) ou adultos jovens (10%). O maior número de casos ocorre principalmente em indivíduos com idades entre 30 e 60 anos de idade. Dentre estes, o maior incidência é observada em trabalhadores rurais (FRANCO *et al.*, 1989; BRUMMER *et al.*, 1993).

Em relação ao sexo dos indivíduos acometidos por esta micose, é observado que a doença é mais freqüente em homens do que em mulheres, com uma relação média de 13:1 nas áreas endêmicas, sendo esta relação muito maior (150:1) na Colômbia, Equador e Argentina (BRUMMER *et al.*, 1993). Entretanto, testes cutâneos feitos em indivíduos saudáveis nas mesmas áreas não mostram diferenças entre os sexos, isto indica que ambos os sexos adquirem infecções subclínicas de forma semelhante, mas a progressão da doença é mais freqüente em homens (GREER & RESTREPO, 1977). Além disso, em crianças acometidas pela doença não são observadas diferenças em relação ao sexo (GREER & RESTREPO, 1977; LONDERO & MELO, 1983; MARQUES *et al.*, 1983; LONDERO & RAMOS, 1990). Estes dados levaram a hipótese de que influências hormonais seriam importantes para o desenvolvimento da paracoccidioidomicose. Este fato foi comprovado por estudos de RESTREPO e colaboradores (1984). Neste trabalho os autores demonstraram que o estrógeno é capaz de inibir a transição do *P. brasiliensis* de sua forma micelial para a forma de levedura. Porém, este mesmo hormônio não foi capaz de impedir a transição reversa, isto é, transformar o fungo da sua forma de levedura para a micelial e nem foi capaz de afetar o crescimento do mesmo ou a formação de multibrotamentos nas leveduras.

A forma de contágio dos indivíduos ainda não foi determinada com exatidão. Pressupõe-se que na cadeia epidemiológica da PCM, o contágio do hospedeiro deva ocorrer pela inalação dos conídios, penetrando nas vias aéreas superiores e instalando-se, inicialmente, nos pulmões. Este foco inicial de infecção pode regredir com a

destruição total dos fungos; regredir com a persistência de fungos viáveis, ou progredir para o desenvolvimento da doença (FRANCO *et al.*, 1989).

A maior parte dos indivíduos que entram em contato com o fungo são capazes de conter a infecção e não desenvolvem a doença, condição denominada de paracoccidioidomicose-infecção. Isto é comprovado pelo fato de existir uma alta taxa de indivíduos, residentes nas regiões endêmicas, que possuem teste cutâneo positivo para antígenos do fungo (WANKE & LONDERO, 1994).

A partir de seu estabelecimento, a PCM pode evoluir de duas maneiras: aguda ou crônica. A forma aguda ou juvenil que representa de 3 a 5% dos casos e acomete, especialmente, crianças e adultos jovens, de ambos os sexos, é caracterizada por sua rápida evolução e pelo profundo envolvimento do sistema linfático, especialmente linfonodos e baço, além do acometimento da medula óssea e fígado (BRUMMER *et al.*, 1993).

A forma crônica, por outro lado, é observada em mais de 90% dos pacientes e ocorre principalmente indivíduos adultos, evoluindo lentamente e atingindo principalmente os pulmões. Nos casos onde a doença é multifocal ocorrem lesões extrapulmonares, afetando especialmente as mucosas oral e nasal, pele, linfonodos, e glândulas adrenais (BRUMMER *et al.*, 1993).

A evolução e a gravidade da doença variam largamente entre os pacientes e as várias formas clínicas observadas estão relacionadas aos diferentes níveis de resposta imune do hospedeiro. Os pacientes portadores de formas disseminadas da doença freqüentemente apresentam depressão da resposta imune celular específica, diminuição da reatividade a testes cutâneos e altos níveis de anticorpos contra o

P. brasiliensis. Nestes pacientes, a resposta tecidual é caracterizada pela ocorrência de granulomas frouxos que abrigam um grande número de fungos. Em indivíduos com as formas localizadas da doença, por outro lado, observam-se respostas positivas para provas de hipersensibilidade, baixos níveis de anticorpos específicos e a formação de granulomas epitelióides compactos com poucos fungos (SILVA *et al.* 1981; FRANCO, 1986; FRANCO *et al.*, 1987).

Na PCM, assim como em outras micoses profundas, o mais importante mecanismo de defesa é a resposta imune celular, sendo que sua depressão determina o grau de severidade da doença, tanto em humanos como em modelos experimentais (SILVA *et al.*, 1981; ROBLEBO *et al.*, 1982; BRUMMER *et al.*, 1993; SINGER-VERMES *et al.*, 1993). De fato, pacientes com formas severas da doença, com envolvimento intenso de vários órgãos, lesões progressivas e, eventualmente, evoluindo para óbito, apresentam perda acentuada da resposta imune celular, diminuição do número de linfócitos T e altos títulos de anticorpos específicos (SILVA *et al.*, 1981; BRUMMER *et al.*, 1993; CALICH *et al.*, 1998).

1.3. Modelos Animais:

A utilização de modelos animais para tentar elucidar os mecanismos da doença em humanos tem sido proposto desde a sua descrição por LUTZ (1908). O primeiro trabalho bem sucedido utilizando a infecção experimental foi feito por MONTENEGRO (1927), onde cobaias inoculadas, pela via intratesticular, com uma suspensão de

tecidos humanos infectados apresentaram, em 100% dos casos, uma orquite específica. Desde então, os diversos modelos experimentais utilizados na PCM têm fornecido informações importantes para a compreensão de vários aspectos da doença, além de permitirem o acompanhamento da infecção desde seus estágios iniciais, o que não é possível nos estudos realizados a partir de biópsias e necropsias humanas (KERR *et al.*, 1988).

Modelos animais também têm sido empregados em vários estudos sobre o papel da resposta imune na PCM. Utilizando-se deste recurso, PERAÇOLI (1978), inoculando *P. brasiliensis* pela via intratesticular de hamsters, observou que na infecção generalizada os níveis de resposta imune celular são muito baixos ou negativos, enquanto os títulos de anticorpos permanecem elevados. Esses resultados confirmaram a relação entre a função das células T e os níveis de anticorpos circulantes, anteriormente observada na PCM humana, corroborando a teoria de que os anticorpos não apresentam papel protetor nas micoses em geral.

Atualmente, as espécies mais utilizadas para o estudo da PCM são o hamster e o camundongo. O hamster tem sido usado devido à sua alta susceptibilidade ao *P. brasiliensis*, sendo que, neste animal, o fungo inoculado por via intratesticular produz lesões semelhantes às da doença progressiva humana (COELHO *et al.*, 1982). A utilização do camundongo como modelo experimental fundamenta-se, além de sua facilidade de obtenção e manutenção, na disponibilidade de linhagens isogênicas que permitem a obtenção de resultados altamente confiáveis.

Os camundongos das linhagens BALB/c, B10.A e A/Sn têm sido largamente empregados em estudos sobre PCM. Segundo CALICH *et al.* (1985), que pesquisaram

a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos frente à inoculação intraperitoneal de 5×10^6 *P. brasiliensis*, a linhagem BALB/c apresenta susceptibilidade intermediária à infecção paracoccidiodomicótica, enquanto as linhagens B10.A e A/Sn comportam-se, respectivamente, como pólos de susceptibilidade e resistência ao fungo. A linhagem BALB/c, quando infectada intraperitonealmente com *P. brasiliensis*, apresenta focos granulomatosos pequenos, espalhados por todo o abdômen, compostos por macrófagos, neutrófilos e plasmócitos, com tendência a estabilização e regressão a partir da 4ª semana de infecção. Este modelo mimetiza a forma benigna da PCM humana (BURGER *et al.*, 1996).

1.4. Fatores de Virulência e Mutantes:

Atualmente diversas cepas do *P. brasiliensis*, que variam quanto à virulência, foram isoladas e descritas. Essa variação na virulência é baseada em diferenças entre componentes importantes do fungo que podem funcionar como fatores de virulência.

Normalmente, os estudos sobre fatores de virulência são feitos através da comparação de respostas biológicas utilizando fungos com e sem estes fatores. Tais comparações requereram o isolamento de cepas mutantes obtidas tradicionalmente pelo uso de substâncias químicas, mutagênese induzida por luz ultravioleta ou mesmo isolamento de mutantes espontâneos. Uma desvantagem importante destes estudos comparativos é que o mutante pode ser deficiente não apenas no fator a ser estudado, mas sim, em vários outros fatores (HOGAN *et al.*, 1996).

Neste contexto, alguns componentes do *P. brasiliensis* têm sido apontados como importantes fatores de virulência. São exemplos os componentes da parede celular α -(1,3)-glucana e β -(1,3)-glucana, o antígeno extracelular gp43, além de outros (HOGAN *et al.*, 1996).

O papel dos componentes da parede celular, α -(1,3)-glucana e β -(1,3)-glucana vem sendo investigado há muitos anos e muitos estudos neste campo utilizam mutantes (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977; SAN-BLAS *et al.*, 1983; SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1992).

A α -(1,3)-glucana é encontrada na porção externa da parede celular e sua localização tem levado a freqüentes especulações sobre seu papel protetor contra as defesas do organismo e conseqüente participação como um fator de virulência do *P. brasiliensis*. Muitos trabalhos mostram que leveduras do fungo contêm quase que exclusivamente a α -(1,3)-glucana e, freqüentemente, a baixa concentração deste componente na parede celular de leveduras tem sido correlacionada com baixa virulência (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977; HALLAK *et al.*, 1982). Entretanto, alguns mutantes avirulentos ou de baixa virulência possuem níveis de α -(1,3)-glucana semelhantes a alguns tipos selvagens altamente virulentos (KANETSUNA, 1981; ZACHARIAS *et al.*, 1986). Apesar disto, a importância desta molécula como um fator de virulência tem sido sugerida, principalmente, através de evidência indireta. Vários trabalhos mostram que isolados virulentos de *P. brasiliensis* quando mantidos por longos períodos em cultura *in vitro* apresentam baixos níveis da α -(1,3)-glucana, parede celular mais fina e perda de virulência em vários modelos animais (SAN-BLAS & SAN-

BLAS, 1977; CASTANEDA *et al.*, 1987; BRUMMER *et al.*, 1990; KASHINO *et al.*, 1990). Porém, todas as três características eram recuperadas através da passagem por animal ou pelo cultivo *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (BRUMMER *et al.*, 1990; KASHINO *et al.*, 1990).

Outro papel da α -(1,3)-glucana é o de mascarar a β -(1,3)-glucana presente na parede celular. Assim, a diminuição do conteúdo da primeira além de expor a segunda pode até mesmo alterar a relação parasita hospedeiro (HOGAN *et al.*, 1996).

A β -(1,3)-glucana é capaz de estimular respostas inflamatórias em sítios de infecção, como por exemplo, nos pulmões (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002). Tanto em humanos como também em modelos animais da infecção, infiltrados de células polimorfonucleares e mononucleares são usualmente encontradas em sítios inflamatórios iniciais e também em lesões granulomatosas crônicas. Além disso, β -(1,3)-glucana está envolvida no aumento de níveis séricos de TNF, sendo que cepas de baixa virulência, como o Pb265, induzem níveis maiores de TNF no soro do que cepas virulentas, como o Pb18 (HOGAN *et al.*, 1996).

A relação entre a α -(1,3)-glucana e a β -(1,3)-glucana parece ser muito importante no grau de virulência entre as cepas de *P. brasiliensis*. Cepas avirulentas ou de baixa virulência do fungo induzem respostas inflamatórias mais intensas do que cepas virulentas, provavelmente porque, a parede celular dessas contém menos α -(1,3)-glucana e mais β -(1,3)-glucana do que as cepas virulentas (SILVA *et al.*, 1994).

Outro importante fator de virulência no *P. brasiliensis* é a gp43. A gp43 é uma glicoproteína que pode se apresentar de duas formas, ou como molécula de superfície

celular ou como uma molécula liberada pelo fungo (PUCCIA *et al.*, 1986; PUCCIA *et al.*, 1991). Além disso, esta glicoproteína funciona como um antígeno que é reconhecido pela maior parte dos indivíduos com a paracoccidioidomicose (BLOTTA & CAMARGO, 1993). Apesar do papel da gp43 não ser totalmente compreendido ela é capaz de se ligar a laminina, um componente da matriz extracelular, e parece ser importante para a adesão e invasão de células fúngicas em células hospedeiras (LOPES *et al.*, 1994; HANNA *et al.*, 2000). Recentemente, foi descrito que esta molécula provavelmente funciona como um fator importante para evasão da resposta imunológica do hospedeiro pelo *P. brasiliensis* (FLÁVIA-POPI *et al.*, 2002).

Além dos componentes estruturais do *P. brasiliensis*, um outro fator que parece influenciar na sua virulência, assim como em outros fungos patogênicos, é o dimorfismo. O dimorfismo é a habilidade de mudar a morfologia de uma forma filamentosa multicelular para uma forma unicelular (SAN-BLAS *et al.*, 2002). No *P. brasiliensis* o único fator que desencadeia o dimorfismo parece ser a temperatura (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994).

Em muitas micoses, o desenvolvimento da doença é marcado pela conversão de uma morfologia fúngica não patogênica, conhecida como forma infecciosa, presente no meio ambiente ou na superfície de mucosas, para uma forma morfológicamente distinta, denominada de forma patogênica, em tecidos. Essa associação entre a morfologia e o desenvolvimento da doença sugere fortemente que fungos dimórficos necessitam da morfogenia para a colonização do hospedeiro e desenvolvimento da doença, entretanto, a relação entre a mudança de forma e a virulência ainda permanece obscura (ROONEY & KLEIN, 2002).

A mudança da forma pode favorecer o patógeno através do aumento de sua resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro. A doença pode se instalar em consequência do aumento da sobrevivência do fungo frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro ou mesmo, através da habilidade de modular a resposta do hospedeiro para criar um ambiente favorável à sobrevivência do patógeno e à colonização do hospedeiro (ROONEY & KLEIN, 2002).

Em infecções pelo fungo *Candida albicans*, as células dendríticas parecem ser diferentemente afetadas por hifas e leveduras deste fungo. FÈ D'OSTIANI e colaboradores (2000), estudando a relação entre células dendríticas e as formas de *C. albicans*, mostraram que leveduras do fungo estimulam a produção de interleucina 12 (IL12) pela célula dendrítica levando ao desenvolvimento de uma resposta do tipo T helper 1 (Th1) produtora de interferon gama (IFN- γ), sendo esta associada com uma resposta protetora contra a *C. albicans*. Contrariamente, hifas deste fungo inibem a produção de IL12 pela célula dendrítica, levando a síntese de interleucina 4 (IL4) pelas células T helper 2 (Th2) e ao desenvolvimento da doença.

No caso do *P. brasiliensis*, até o presente momento, poucos relatos associam, de forma clara, a mudança morfológica do fungo com a virulência do mesmo. SAN-BLAS & SAN-BLAS (1977), estudando a estrutura da parede celular do *P. brasiliensis*, observaram que na forma micelial havia uma predominância de β -(1,3)-glucana enquanto que na forma de levedura o principal polissacarídeo presente na parede era a α -(1,3)-glucana. Como discutido anteriormente, esses componentes parecem possuir papéis importantes no grau de virulência de cepas do fungo. Estudos usando diferentes

isolados do fungo sugerem que a α -(1,3)- glucana protege o fungo de enzimas digestivas presentes em macrófagos e outros leucócitos (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977). Ao considerar a parede celular do fungo como um fator de virulência, SAN-BLAS (1982) sugeriu que fagócitos humanos poderiam produzir β -glucanase que seria capaz de digerir apenas a β -(1,3)-glucana presente na parede celular de formas miceliares. Desta forma, a transformação do fungo para a forma de levedura, no começo da infecção, poderia prevenir a ação de enzimas fagocíticas sobre o fungo, levando ao desenvolvimento da doença.

Recentemente foi observado em nosso laboratório que uma amostra da cepa virulenta Pb18 apresentava alterações persistentes na sua forma de crescimento a 37°C, isto é, as células fúngicas encontravam-se em formas intermediárias de crescimento entre levedura e micélio, normalmente pouco observadas nas culturas de *P. brasiliensis* conduzidas a essa temperatura.

Considerando o surgimento desta alteração espontânea em uma das amostras da cepa virulenta Pb18 e sabendo que a morfologia do fungo pode influenciar na virulência do mesmo, o presente trabalho teve por objetivos à caracterização parcial deste isolado, buscando a obtenção de um modelo experimental para futuros estudos sobre a biologia do fungo e sua relação com o hospedeiro durante o desenvolvimento da paracoccidiodomicose.



2.OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral:

♦ Caracterizar parcialmente o isolado atípico da cepa virulenta Pb18, espontaneamente surgido no laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp, através da análise comparativa com a cepa selvagem.

E como objetivos específicos:

♦ Estudar morfologia e a composição de proteínas do isolado atípico através da:

- (i) Análise macroscópica e microscópica das culturas fúngicas mantidas a 37°C;
- (ii) Determinação do crescimento à temperatura ambiente; e
- (iii) Avaliação das proteínas de parede através da técnica de SDS-PAGE e do padrão de reconhecimento antigênico.

♦ Estudar a evolução da infecção em modelo animal através de:

- (i) Avaliação do peso dos órgãos-alvo;
- (ii) Avaliação da celularidade do timo e do baço;
- (iii) Análise histopatológica dos órgãos-alvo;
- (iv) Determinação da capacidade do isolado atípico em invadir o timo;
- (v) Avaliação dos níveis de morte celular por apoptose no timo; e
- (vi) Caracterização das populações de linfócitos T presentes no timo e no baço por citometria de fluxo.

- ◆ Avaliar a resposta imunológica de animais inoculados com os isolados através de:
 - (i) Análise da resposta de hipersensibilidade celular específica;
 - (ii) Ensaio de proliferação celular; e
 - (iii) Avaliação da participação de citocinas na infecção.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais:

Camundongos machos, obtidos do CEMIB – UNICAMP a partir de colônias livres de patógenos específicos (S.P.F.), da linhagem BALB/c e com oito semanas de idade foram utilizados neste estudo.

Testes realizados a cada três meses, desde 1989, para detecção de infecções nestas colônias apresentaram resultados negativos para os seguintes patógenos: coronavírus (MHV-3), Sendai vírus, vírus da pneumonia do camundongo (PVM), vírus da coriomeningite linfocítica (CCMV), Adenovírus, Polyoma vírus, K-vírus, Citomegalovírus Murino (MCMV), Rotavírus, Ectromelia, *Mycoplasma pulmonis*, ectoparasitas e endoparasitas. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em unidades isoladoras flexíveis tipo Trexler (TREXLER, 1959), com água e ração estéreis, fornecidas *ad libitum*, e com um ciclo de fotoperíodo de 12h/12h.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas propostas pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (CEEa/Unicamp).

3.2. Fungos:

Neste estudo foram utilizados dois isolados da cepa Pb18: o isolado original procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FCM-USP) e isolado atípico, denominado Pb18UNICAMP, obtido neste laboratório. Os

dois isolados foram mantidos em meio de cultivo Fava Netto, à temperatura de 37°C, e com repiques quinzenais.

A patogenicidade da cepa fúngica selvagem (Pb18) foi estimada por SINGER-VERMES *et al.* (1989), através da determinação da LD50% e análise histopatológica do local de inoculação e lesões de disseminação durante 24 semanas em camundongos B10.A.

3.3. Comparação morfológica e protéica dos dois isolados:

A comparação entre os isolados foi realizada através de (i) análise morfológica dos isolados mantidos a 37°C, (ii) determinação da forma de crescimento à temperatura ambiente e (iii) avaliação das proteínas de parede e padrão de reconhecimento antigênico.

3.3.1. Análise morfológica dos isolados mantidos a 37°C:

Normalmente a identificação de um fungo é feita através da observação das características da cultura e das células fúngicas. Assim, a análise morfológica dos isolados mantidos a 37°C foi feita através da análise macroscópica e microscópica das culturas fúngicas dos dois isolados.

A descrição macroscópica levou em consideração características relatadas na literatura como a presença colônias de coloração creme com textura mole e rugosa (BRUMMER *et al.*, 1993; GOLDANI & SUGAR, 1995).

Para a análise microscópica, células fúngicas, obtidas antes e após a passagem em animal, foram ressuspensas em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), pH7.2, agitadas em agitador tipo Vórtex e coradas pela coloração vital Azul de Algodão (SANO *et al.*, 1993).

Para a recuperação do fungo a partir de órgãos de animais infectados com Pb18 e Pb18UNICAMP, no 7º dia p.i. o baço dos animais infectados foi retirado assepticamente, pesado e macerado. O pellet obtido após a centrifugação do macerado foi ressuspendido em 1 ml de PBS, plaqueado em meio BHI enriquecido modificado por SINGER-VERMES *et al* (1992) e incubado a 37°C por cerca de 15 dias.

3.3.2. Determinação do crescimento à temperatura ambiente:

Com o conhecimento prévio de que o fungo *P. brasiliensis*, quando cultivado em temperatura ambiente, cresce na forma miceliar caracterizada macroscopicamente por colônias brancas, pequenas e irregulares, cobertas por um curto micélio aéreo (BRUMMER *et al.*, 1993; GOLDANI & SUGAR, 1995), amostras de Pb18 e Pb18UNICAMP foram cultivadas a 25°C para a comparação entre as duas colônias.

3.3.3. Avaliação das proteínas de parede e padrão de reconhecimento antigênico:

A avaliação das proteínas de parede das amostras Pb18 e Pb18UNICAMP foi feita através da técnica de SDS-PAGE, conforme descrito por LAEMMLI (1970). Para tanto, 500 µg/mL dos CFAs (Cell Free Antigen) de cada uma das amostras, após dosagem protéica, foram separadas em gel de poliacrilamida na presença de dodecil

sulfato de sódio 12%. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 60V por 16 horas e, em seguida, as proteínas foram visualizadas através do método de impregnação pela prata.

Para comparação do padrão de reconhecimento antigênico do *pool* de anticorpos obtidos de pacientes, proteínas fúngicas dos dois isolados presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybound-C/Amersham) através de uma corrente elétrica de 30V durante 2 horas utilizando-se tampão de transferência contendo tris 0,125M e glicina 0,192M. Em seguida, a membrana foi “bloqueada” com leite em pó desnatado (Molico) 5% diluído em Tampão Tris Salina (TBS), durante duas horas. A membrana foi então incubada durante a noite com o *pool* anticorpo primário obtido de pacientes (gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Heloísa Blotta, do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP). Após esta etapa, a membrana foi recoberta com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina humana por 1 hora e a reação foi revelada utilizando-se 3-3 Diamino-benzidina (0,6mg/ml) e H₂O₂ (1ul/ml) em tampão tris HCl 50mM pH 7,6.

3.4. Preparo de antígenos de P. brasiliensis CFA (Cell Free Antigen):

Para o preparo do CFA dos dois isolados foi utilizada a metodologia descrita por CAMARGO *et al.* (1991). Inicialmente, células fúngicas com 7 dias de cultivo foram ressuspensas em 1 mL de solução salina tamponada estéril acrescida de phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF). A seguir, a suspensão foi agitada por 10 minutos em Vórtex, centrifugadas por 10 minutos a 6.000 x g e o sobrenadante, contendo os

antígenos de parede (CFA), foi coletado. A dosagem protéica do material foi realizada de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976).

3.5. Estudo comparativo da infecção causada pelos isolados:

3.5.1. Preparo do inóculo:

Para o preparo das suspensões fúngicas, as amostras Pb18 e Pb18UNICAMP foram semeadas em meio de cultura Fava Netto e coletadas sete dias depois, em sua fase de crescimento exponencial. As células fúngicas foram ressuspensas em PBS estéril pH 7.2, agitadas em agitador tipo Vórtex, em dois ciclos de 15 segundos cada, centrifugadas por 10 minutos a 300xg e lavadas por 2 vezes em PBS.

O número total de células presente nas suspensões foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e o número final ajustado para 1×10^7 fungos/ml, sendo a viabilidade determinada pela coloração vital Azul de Algodão (SANO *et al.*, 1993).

3.5.2. Infecção experimental:

Camundongos BALB/c foram inoculados, pela via intraperitoneal, com 5×10^6 *P. brasiliensis* das amostras Pb18 ou Pb18UNICAMP, contidos em 0,5 ml de solução salina estéril. Animais controle foram inoculados com solução salina estéril e sacrificados ao longo do período experimental, servindo como controle para a comparação com os animais infectados.

3.5.3. Delineamento experimental:

Lotes de animais inoculados com as amostras Pb18 e Pb18UNICAMP bem como os controles foram anestesiados, pesados, submetidos à sangria pelo plexo braquial e sacrificados por deslocamento cervical às 24 horas e aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias após a inoculação.

3.5.4. Avaliação do peso dos órgãos:

Para a avaliação do peso de cada órgão, o timo, baço e fígado retirado dos animais ao longo da infecção foram lavados em PBS, secos em papel de filtro e pesados. Os resultados foram expressos em índice dos órgãos obtido pela equação:

$$\text{Índice} = \text{peso do órgão (em gramas)} / \text{peso do animal (em gramas)} \times 100.$$

3.5.5. Avaliação da celularidade do timo e baço:

Para a avaliação da celularidade do timo e do baço, os órgãos, utilizados para a citometria de fluxo, foram, imediatamente após o sacrifício, macerado em meio de cultivo RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FCS). A partir da suspensão celular foi estimado o número total de células através da contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer.

3.5.6. Análise histopatológica:

Para a análise histopatológica, os órgãos foram fixados em solução de formalina tamponada 10% por 24 horas, lavados em água corrente, desidratados em gradiente crescente de álcool e embebidos em Histosec. Após a inclusão, o material foi

submetido a microtomia para obtenção de cortes finos (4 μ m) que foram desparafinizados, hidratados em gradiente decrescente de álcool e corados por hematoxilina-eosina.

3.5.7. Detecção do isolado atípico Pb18UNICAMP no timo por imuno-histoquímica:

Com o objetivo de determinar se o isolado Pb18UNICAMP também era capaz de invadir o timo, cortes histológicos do órgão foram desparafinizados, hidratados em gradiente decrescente de etanol e lavados com solução salina antes da reação. Em seguida a peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação por 30 minutos em PBS contendo 3% de peróxido de hidrogênio. Após a pré-absorção com soro normal de camundongo, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-Pb18 produzido em coelho (gentilmente cedido pela Dr^a. Lucila Costallat Ricci do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP) overnight a 4°C. Seguido este estágio a reação foi revelada usando o kit ABC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, desidratados e montados em Permount.

3.5.8. Detecção de Morte Celular por Apoptose no Timo:

Para a detecção dos níveis de apoptose no timo, foi utilizado o Kit TUNEL (Boehringer, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Esta técnica baseia-se na identificação da fragmentação de DNA nuclear através da ligação de um

nucleotídeo marcado com fluoresceína mediada por uma enzima deoxinucleotidil transferase terminal.

3.5.9. Caracterização das populações de linfócitos T por citometria de fluxo:

A caracterização das populações de linfócitos T no timo e no baço foram feitas por citometria de fluxo. Para tanto, às 24 horas e aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias p.i., os órgãos foram coletados, lavados em meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, macerados em 2 ml de meio com auxílio de peneiras e êmbolos estéreis. A suspensão celular obtida foi centrifugada por 10 minutos a 300xg a 4°C e o botão de células resultantes foi ressuspens o em meio de cultivo. Nas amostras de baço procedeu-se, ainda, a lise das hemácias.

O número de células presentes na suspensão foi estimado por contagem em câmara de Neubauer e o número ajustado para 5×10^6 células/ml. Foram utilizados 200µl desta suspensão (1×10^6 células) para a citometria de fluxo, os quais foram incubados volume/volume com soro normal de rato (diluição 1:10 em PBS) sob refrigeração por 15 minutos para bloqueio. A suspensão foi centrifugada, o sobrenadante descartado, o botão de células ressuspens o e incubado com 1µl de anticorpo anti-CD8 marcado com ficoeritrina e anticorpo anti-CD4 marcado com isotiocianato de fluoresceína (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), sob refrigeração e ao abrigo de luz por 30 minutos. Após a marcação, a suspensão foi centrifugada, lavada por 3 vezes em PBS e, finalmente, ressuspensa em 1ml de solução fixadora de paraformaldeído 0,1% em PBS. A coleta de dados foi feita no citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) e a análise dos

dados utilizou o programa EXPO (Applied Cytometry Systems, Dinnington, Sheffield, England).

3.6. Avaliação imunológica:

3.6.1. Resposta de hipersensibilidade celular específica:

A resposta de hipersensibilidade celular específica contra antígenos de *P. brasiliensis* foi avaliada através do teste do coxim plantar (TCP) a partir do 7º dia de inoculação dos animais com o isolado Pb18 e com o isolado Pb18UNICAMP, conforme descrito por MOSCARDI & FRANCO (1980). Para tanto, 24 horas antes do sacrifício foram injetados 0,05 ml de antígeno CFA (80µg/ml) de Pb18 e 0,05 ml de solução salina estéril, respectivamente, no coxim plantar esquerdo (pata teste) e coxim plantar direito (pata controle). O mesmo protocolo foi utilizado para os animais inoculados com o isolado Pb18UNICAMP. No momento do sacrifício o volume das patas foi medido com o auxílio de um paquímetro. Para confirmar a positividade do teste as patas foram retiradas, fixadas em formol tamponado 10%, desidratadas em gradiente de álcool, cortadas e coradas por hematoxilina–eosina.

3.6.2. Ensaio de proliferação celular:

O ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando-se células obtidas do baço dos animais controle e animais experimentalmente infectados com os dois isolados de *P. brasiliensis*. Para isso, o baço foi retirado, macerado em meio de cultura RPMI 1640 e as hemácias lisadas com tampão Tris-NH₄Cl. Após determinação do

número de células viáveis e ajuste da concentração, as células foram plaqueadas em placa de 96 “wells” e cultivadas, em estufa de CO₂ a 37°C, com Concanavalina A (ConA) por 3 dias, com duas concentrações de CFA [0,0028 µg/µl (CFA1) e 0,0056 µg/µl (CFA2)] obtidas tanto da amostra Pb18 como da Pb18UNICAMP por 5 dias e apenas com meio de cultura. A proliferação foi determinada através do método de redução do “3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide” (MTT), onde 10 µl de MTT foram adicionados em cada “well” e a placa incubada por 4 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Em seguida, 100 µl da solução HCl 0,01M / SDS 10% foram acrescentados em cada “well” e a cultura incubada “overnight” a 37°C. A absorbância desta reação foi então determinada em leitor de ELISA a 540nm, sendo a medida da incorporação do MTT proporcional ao número de células viáveis em cada “well”. Assim, a proliferação celular induzida por ConA ou pelo antígeno CFA foi comparada com as respectivas células não estimuladas, sendo o resultado expresso em porcentagem de proliferação.

3.6.3. Avaliação da liberação de citocinas na infecção:

Com o objetivo de analisar e comparar qual o padrão de citocinas estava sendo produzida durante a infecção pelas amostras Pb18 e Pb18UNICAMP, foram pesquisadas as citocinas IL4, TNF e IFN-γ no soro e em culturas de células do baço e do timo.

3.6.3.1. Obtenção de amostras de soro:

O soro dos animais infectados com Pb18 ou Pb18UNICAMP e controles foram obtidos através da sangria pelo plexo braquial durante o sacrifício dos animais e armazenados a -70°C para posterior dosagem das citocinas por ELISA.

3.6.3.2. Obtenção de amostras de sobrenadante de cultura de células do baço e do timo:

Os sobrenadantes utilizados para a dosagem de citocinas foram obtidos das culturas celulares utilizadas para o ensaio de linfoproliferação. Assim, antes da adição do MTT nas culturas, uma parte dos sobrenadantes destas foram retirados e armazenados a -70°C para posterior dosagem das citocinas por ELISA.

3.6.3.3. Dosagem por ELISA:

A dosagem de citocinas foi realizada no soro e no sobrenadante de cultura celular timo e baço às 24 horas e aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias pi, utilizando os kits BD OptEIA™ Set Mouse.

As placas foram sensibilizadas com anticorpos de captura (anti-TNF ou anti-IL4 ou anti-IFN γ) durante toda a noite a 4°C e lavadas com PBS-Tween 20 0,05%. Findo este período, procedeu-se, então, o bloqueio dos sítios livres com tampão de bloqueio (PBS com 10% de soro fetal bovino) por 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem, os padrões recombinantes, em diluições crescentes para construção das curvas e as amostras foram adicionadas à placa e estas incubadas por 2 horas a 37°C. Em seguida, realizou-se nova lavagem e foi realizada então a detecção da

reação utilizando a solução de detecção (anticorpos de detecção associados a avidina-HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi então revelada através da adição do substrato (H_2O_2) em tampão citrato-ácido cítrico com o cromógeno orto-fenil-diamina (OPD) e após 30 minutos a reação foi parada utilizando H_2SO_4 2N. A absorbância foi lida em 492nm.

3.7. Análise estatística:

O método de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett ou pelo Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni, foi utilizado para análise dos resultados obtidos. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p era menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad InStat versão 3.0 (1997).



4. RESULTADOS

4.1. Comparação morfológica e protéica dos isolados:

4.1.1. Análise morfológica dos isolados mantidos a 37°C:

A análise macroscópica das culturas fúngicas mantidas a 37°C mostrou ausência de diferenças entre a amostra atípica e a cepa Pb18. Em ambos isolados, as culturas apresentavam-se com colônias de coloração creme, com textura mole, rugosa e aparência cerebriforme (Figura 1).

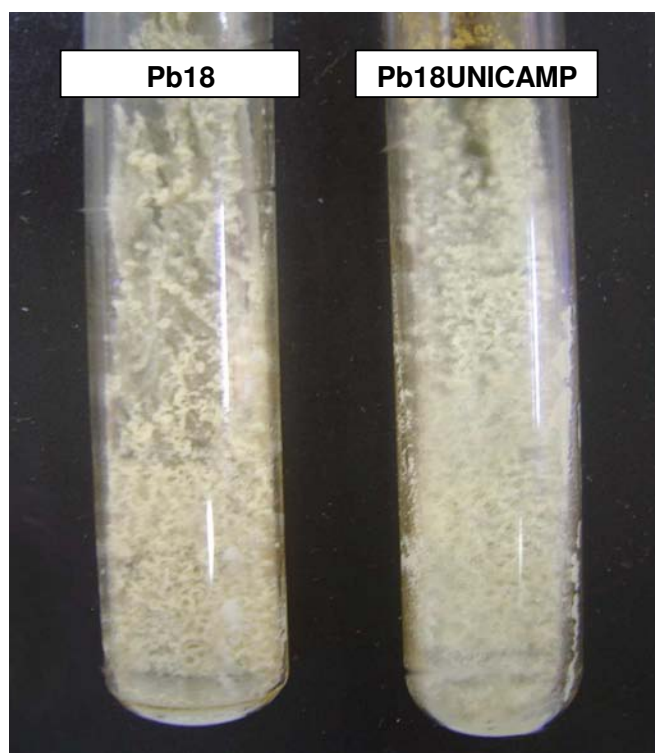


Figura 1: Cultura de amostras de *P. brasiliensis* cultivadas a 37°C. Note que nos dois frascos de cultura é possível observar colônias de coloração creme e aparência cerebriforme.

Já a observação microscópica das células fúngicas presentes nas duas amostras da cepa Pb18 mostrou que o isolado selvagem apresentava crescimento na forma de levedura (Figura 2A) quando cultivado a 37°C, conforme o esperado, enquanto que o isolado atípico Pb18UNICAMP, quando cultivado a esta mesma temperatura, apresentava crescimento em formas intermediárias da transição de levedura para micélio (Figura 2B).

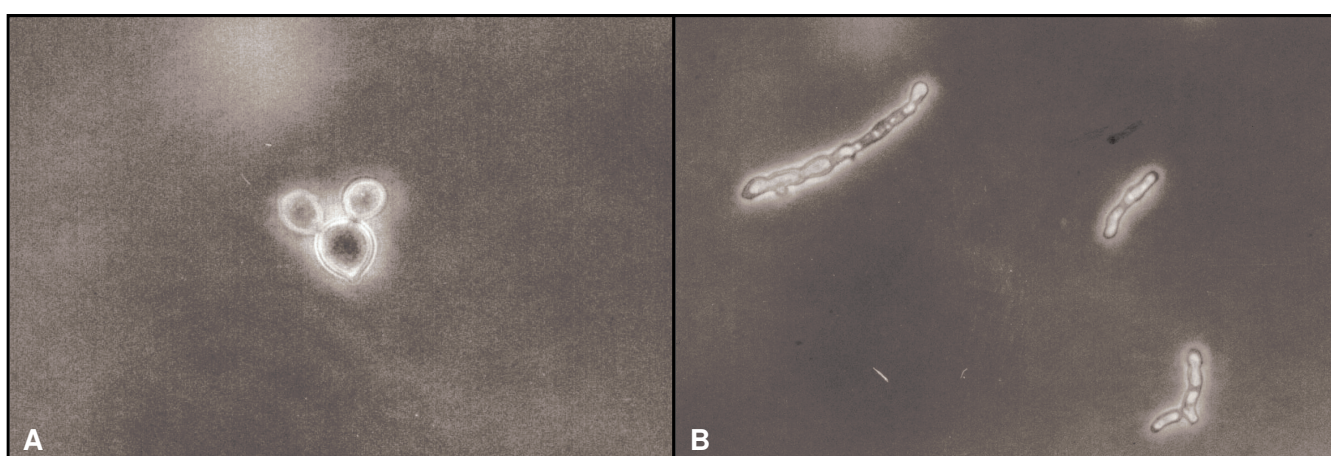


Figura 2: Amostras de *P. brasiliensis* cultivadas a 37°C. (A): Pb18 e (B): Pb18UNICAMP. Aumento: 400x

Com o objetivo de investigar a possibilidade de reversão para o estágio leveduriforme, a amostra Pb18UNICAMP foi inoculada em animal e recuperada do baço após 7 dias de infecção, através do plaqueamento do macerado deste órgão em meio BHI enriquecido modificado por SINGER-VERMES *et al* (1992). O resultado obtido mostrou que a passagem por animal não foi capaz de modificar a forma apresentada por esta amostra (Figura 3).

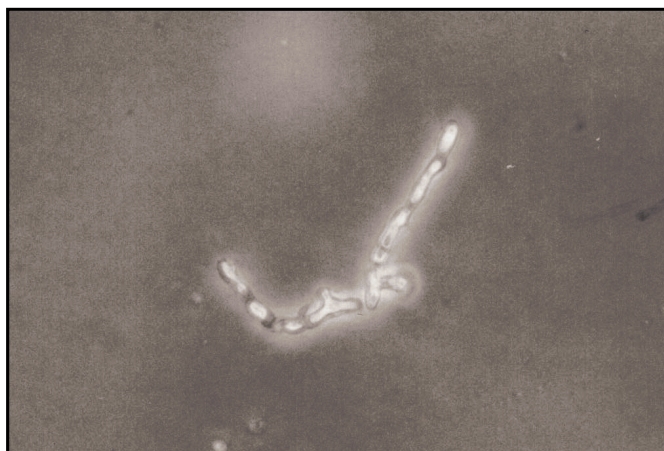


Figura 3: Célula fúngica da amostra Pb18UNICAMP após a passagem em animal. Aumento: 400x

4.1.2. Determinação da forma de crescimento à temperatura ambiente:

Uma das características mais importantes do *P. brasiliensis* é o dimorfismo térmico. Assim, para determinar se o isolado atípico era capaz de modificar sua forma conforme a temperatura, amostras do fungo obtidas antes e após passagem em animal foram cultivadas a 25°C. Como esperado, a amostra P b18 reverteu seu crescimento para forma miceliar característica, enquanto que a amostra Pb18UNICAMP não modificou a sua forma de crescimento, apresentando colônias cerebriiformes semelhante ao observado quando cultivado a 37°C (Figura 4).

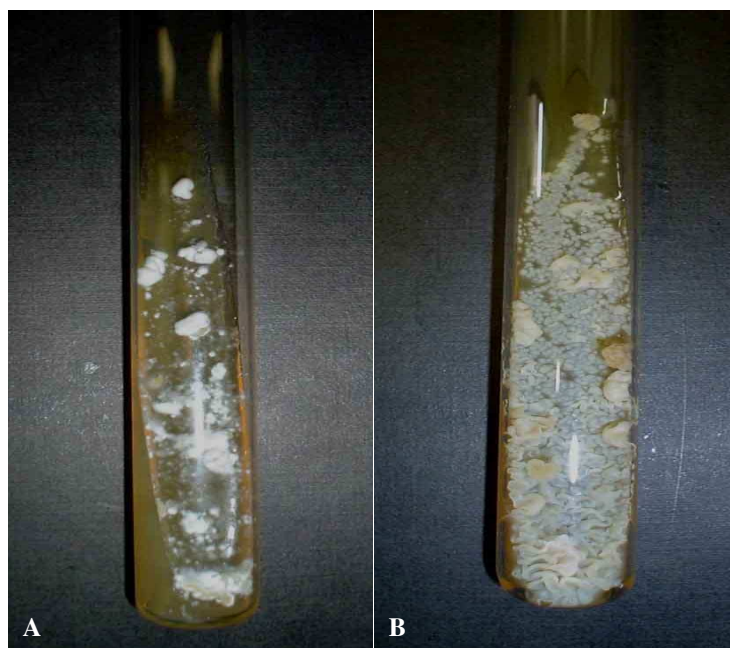


Figura 4: Cultura de amostras de *P. brasiliensis* cultivadas a 25°C. 1 mês. (A): Pb18. Note a presença de colônias brancas, pequenas e irregulares. (B): Pb18UNICAMP. Nesta cultura é possível observar a presença de colônias de coloração creme, textura mole, rugosa e aparência cerebriforme.

4.1.3. Avaliação das proteínas de parede e padrão de reconhecimento antigênico:

A observação de morfologias distintas levou-nos à análise de expressão protéica das duas amostras. Os resultados obtidos mostraram diferenças também em relação à composição de proteínas presentes na parede das células. Como pode ser observado na figura 5, apenas a amostra Pb18 expressa proteínas com peso molecular de 32, 39, 50, 70, 90 kDa. Além disso, apesar de ambos isolados expressarem a banda correspondente à gp43, nota-se que a cepa Pb 18 apresenta uma quantidade maior de

expressão desta. Outra diferença na expressão de proteínas foi detectado em uma proteína com peso molecular de 38 kDa, mais expressa na amostra Pb18UNICAMP.

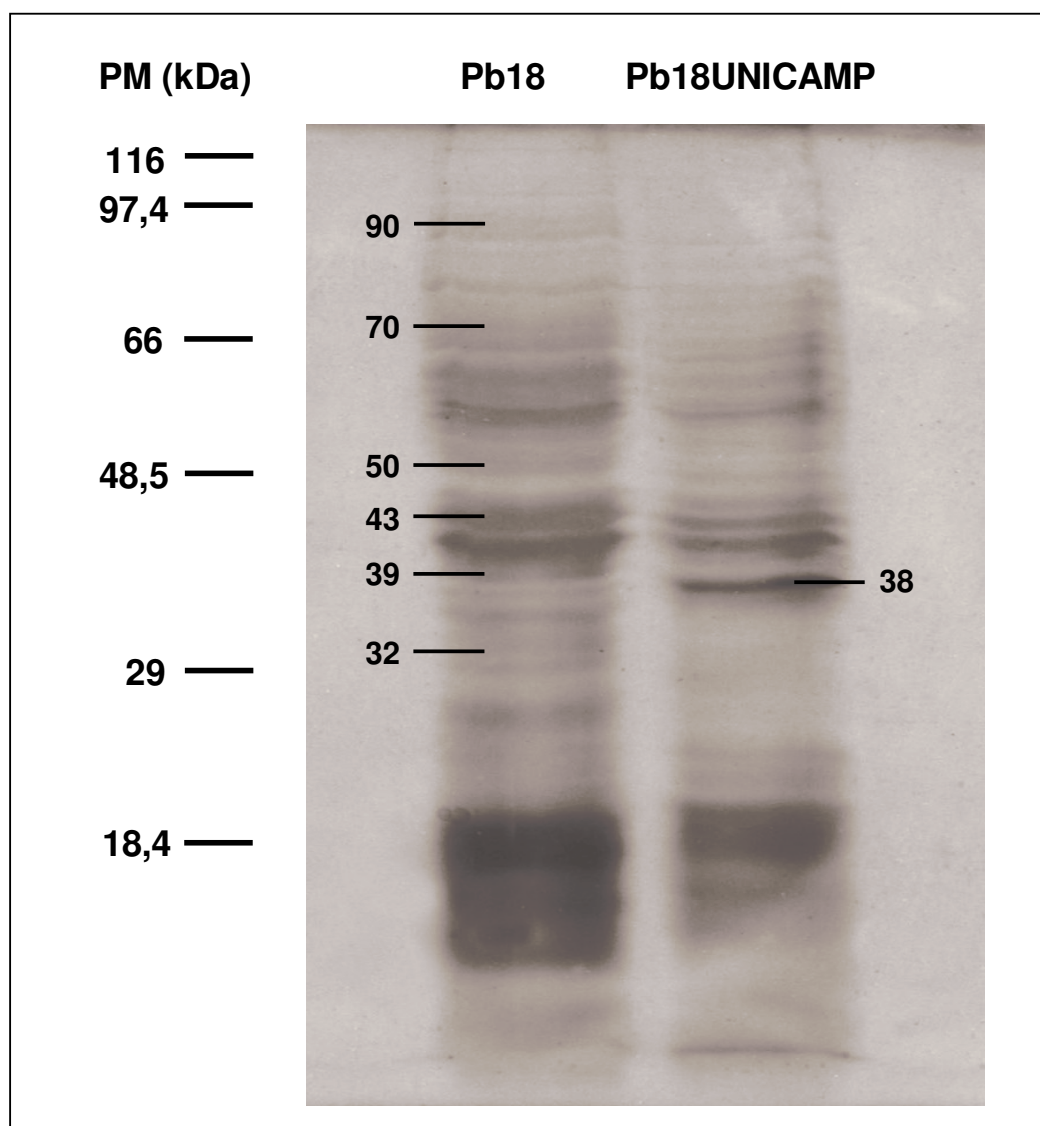


Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) dos CFA de Pb18UNICAMP e Pb18. Coloração: Impregnação pela prata.

O ensaio para a determinação do padrão de reconhecimento antigênico das proteínas de parede celular das duas amostras por um pool de anticorpos de pacientes com paracoccidioidomicose mostrou que estes anticorpos reconheceram mais proteínas da parede celular da cepa Pb18 do que do Pb18UNICAMP. Como pode ser notado na figura 6, o pool de anticorpos de pacientes foi capaz de reconhecer várias proteínas do isolado Pb18, dentre elas a correspondente a gp43. Entretanto, o mesmo não ocorreu com as proteínas do Pb18UNICAMP. Neste caso os anticorpos apenas reconheceram uma proteína com peso molecular entre 90 e 116kDa.

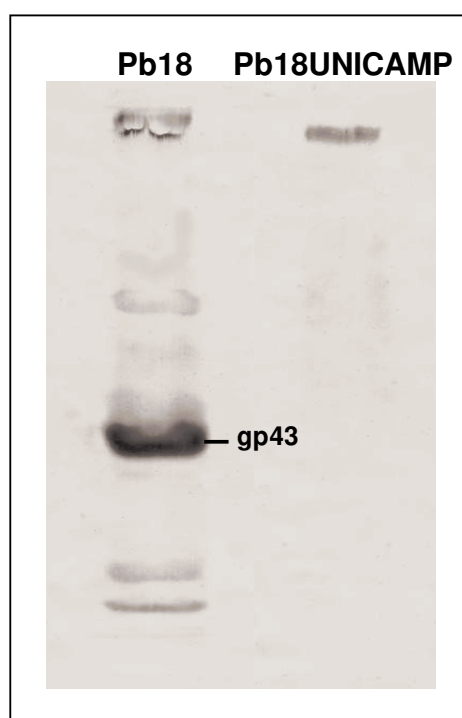


Figura 6: "Immunoblotting" dos CFA de Pb18 e Pb18UNICAMP utilizando anticorpos produzidos em pacientes com paracoccidioidomicose. Note a presença de uma banda marcada com peso molecular entre 90 e 116kDa na amostra Pb18UNICAMP.

4.2. Estudo comparativo da infecção causada pelos isolados de P. brasiliensis:

4.2.1. Avaliação do peso de órgãos:

O timo, baço e fígado, sabidamente afetados durante a paracoccidiodomicose experimental, foram escolhidos para avaliar a infecção pelo isolado atípico comparativamente à infecção causada pela cepa selvagem.

Como pode ser observado na figura 7A, nos animais inoculados com a cepa Pb18, o peso do timo começou a diminuir logo às 24 horas após a inoculação e persistiu de maneira crescente até o 7º dia, quando representava cerca de 1/3 do observado nos animais controles. Após este período, observou-se uma recuperação do órgão, sendo que aos 14 dias pós-inoculação, o peso médio dos timos era de cerca de 2/3 do encontrado em animais não inoculados, persistindo este padrão até o final do período experimental. Já nos animais inoculados com Pb18UNICAMP (Figura 7B), o peso do timo dos animais infectados não sofreu alterações marcantes quando comparado com os animais controle.

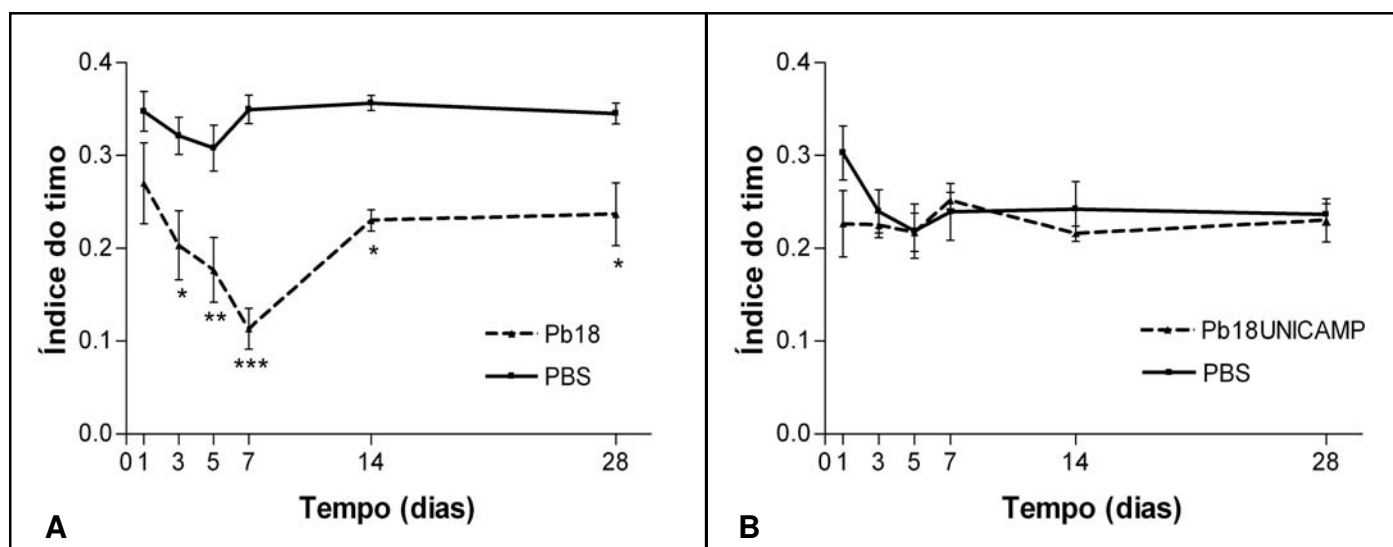


Figura 7: Índice tímico. (A) Pb18: A análise estatística (ANOVA) revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0,0001$), enquanto que o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni mostrou diferenças significantes no índice do timo nos dias 3, 5, 7, 14 e 28 pós-inoculação, quando comparados com os animais controle. **(B) Pb18UNICAMP:** A análise estatística não revelou variações significativas neste grupo. Os valores apresentados representam a média do índice encontrado em 4 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

A mesma diferença de resultados foi observada para o fígado. Nos animais infectados com Pb18, o peso do órgão aumentou de modo exponencial a partir do 3º dia de inoculação atingindo ao 7º dia o seu pico. A partir deste período o aumento hepático tornou-se menos pronunciado. Entretanto, até o final do período experimental, o peso do fígado manteve-se acima do observado nos animais controle (Figura 8A). Já os animais infectados com o isolado atípico Pb18UNICAMP não mostraram estas diferenças quando comparados com os respectivos controles (Figura 8B).

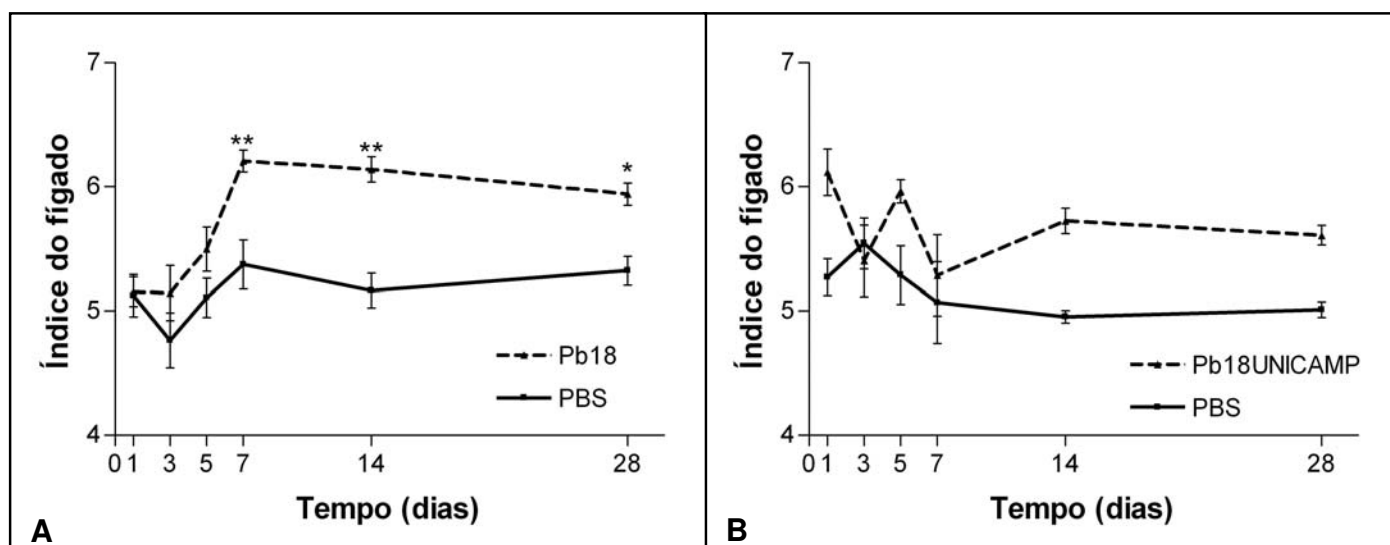


Figura 8: Índice hepático. (A) Pb18: A análise estatística (ANOVA) revelou variações significativas neste grupo ($p=0,0003$), enquanto que o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni mostrou diferenças significativas no índice do fígado nos dias 7, 14 e 28 pós-inoculação, quando comparados com os animais controle. **(B) Pb18UNICAMP:** A análise estatística não revelou variações significativas neste grupo. Os valores apresentados representam a média do índice encontrado em 4 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Em relação ao baço as observações foram semelhantes às encontradas no fígado. Nos animais inoculados com Pb18 observou-se que o peso esplênico aumentou de modo exponencial a partir do 3º dia de infecção, atingindo ao 7º dia cerca de três vezes o encontrado em animais não infectados. A partir deste período o aumento deste órgão tornou-se menos pronunciado. Entretanto, ao final do período experimental, o peso do baço manteve-se acima do observado em animais controle (Figura 9A). Os resultados dos animais inoculados com Pb18UNICAMP mostraram novamente que as diferenças entre os pesos esplênicos dos animais infectados e controles não foram significativas (Figura 9B).

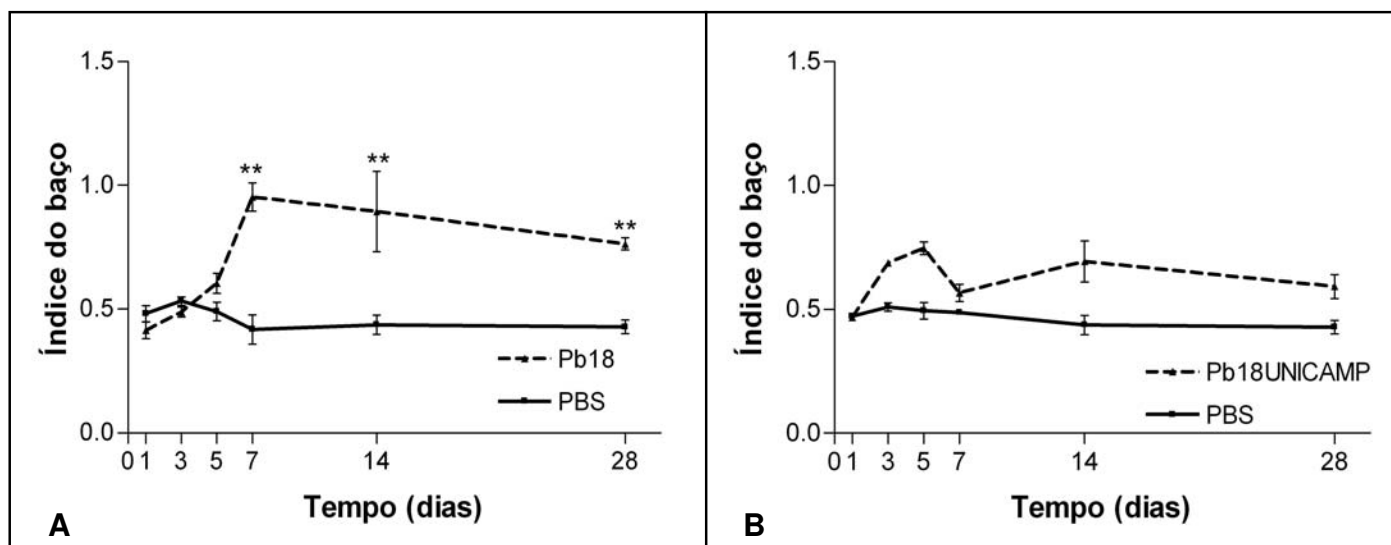


Figura 9: Índice esplênico. (A)Pb18: A análise estatística (ANOVA) revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p<0,0001$), enquanto o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni mostrou diferenças significantes no índice do baço observado no 7º, 14º e 28º dia pós-inoculação, quando comparados com os animais controle. **(B)Pb18UNICAMP:** A análise estatística não revelou variações significativas neste grupo. Os valores apresentados representam a média do índice encontrado em 4 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. (** $p<0,01$)

4.2.2. Avaliação da celularidade do timo e baço:

Semelhante ao observado no peso do timo, a infecção pelo *P. brasiliensis* levou a uma significativa redução no número de células presentes no timo apenas nos animais infectados com a cepa Pb18 (Figura 10). Nestes animais a celularidade do timo diminui já às 24 horas de infecção atingindo um pico de diminuição celular aos 3 dias pós-inoculação. A partir deste ponto o número de células aumenta novamente, entretanto, até o final do período experimental este número não atinge os valores observados nos animais controles.

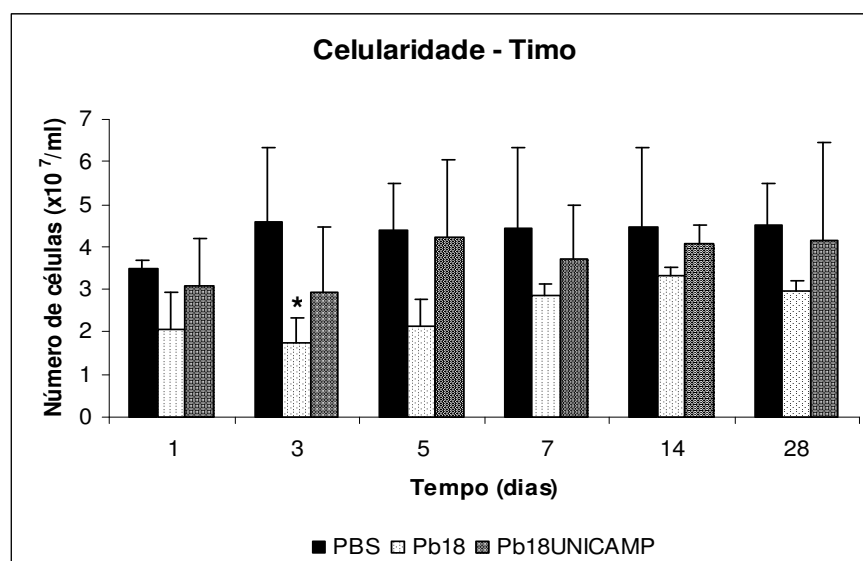


Figura 10: Celularidade do timo. A análise estatística (ANOVA) revelou variações significativas neste grupo ($p=0,0132$), enquanto o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni mostrou diminuição significativa no 3º dia pós-inoculação nos animais inoculados com Pb18, quando comparado com os animais controle. Os valores apresentados representam a média do índice encontrado em 4 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. (* $p<0,05$)

Em relação ao número de células do baço os resultados obtidos também são semelhantes aos do peso deste órgão. Como pode ser observado na figura 11, o número de células do baço em animais inoculados com a cepa Pb18 foi significativamente maior do que o de animais controles principalmente aos 14 e 28 dias pós-infecção. Enquanto que em animais inoculados com a amostra Pb18UNICAMP não apresentaram alterações significativas no número de células do baço quando comparado com os animais controles. Através da comparação entre a celularidade no baço dos animais inoculados com as diferentes amostras mostrou que no 14º dia de infecção o aumento no número de células no baço dos animais inoculados com Pb18 foi significativamente maior do que nos inoculados com a cepa Pb18UNICAMP.

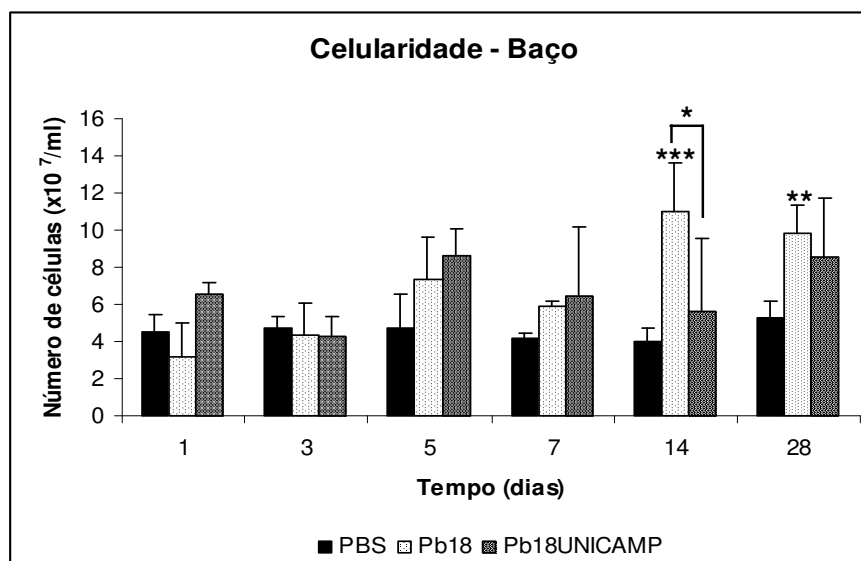


Figura 11: Celularidade do baço. A análise estatística (ANOVA) revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0,0001$), enquanto o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni mostrou aumento significativo no 14º e 28º dia pós-infecção nos animais inoculados com a cepa Pb18, quando comparados com os animais controle. Além disso, nota-se uma diferença significativa entre os dois grupos de animais infectados aos 14 dias de infecção. Os valores apresentados representam a média do índice encontrado em 4 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2.3. Análise histopatológica:

A análise histopatológica dos órgãos mostrou diferenças marcantes entre os animais inoculados com as diferentes amostras.

4.2.3.1. Timo:

A análise histopatológica do timo mostrou que os animais inoculados com a amostra Pb18UNICAMP não apresentaram as alterações observadas nos animais inoculados com a cepa Pb18.

Logo às 24 horas de infecção notou-se a presença de histiócitos nos dois grupos de animais infectados, entretanto, apesar de presentes no timo dos animais inoculados com o isolado atípico, estas células não se apresentavam em quantidade suficientemente grande para constituir um padrão de “céu estrelado” como observado nos animais infectados com a amostra Pb18 (Figura 12).

Além disso, no timo dos animais inoculados com a cepa Pb18, notou-se a completa perda da delimitação corticomedular aos 3 dias pós-inoculação que se manteve até os 7 dias de infecção. Já os animais infectados com o isolado atípico não apresentaram esse tipo de alteração durante o período experimental (Figura 12).

Outra diferença observada foi em relação à presença de infiltrado inflamatório sub-capsular (Figura 13). Nos animais inoculados com a amostra Pb18 foi possível observar a partir dos 3 dias de infecção a infiltração de neutrófilos, pequenos linfócitos, células mononucleares e alguns eosinófilos na região sub-capsular. Já nos animais inoculados com o Pb18UNICAMP não se notou a presença de infiltrado inflamatório neste órgão.

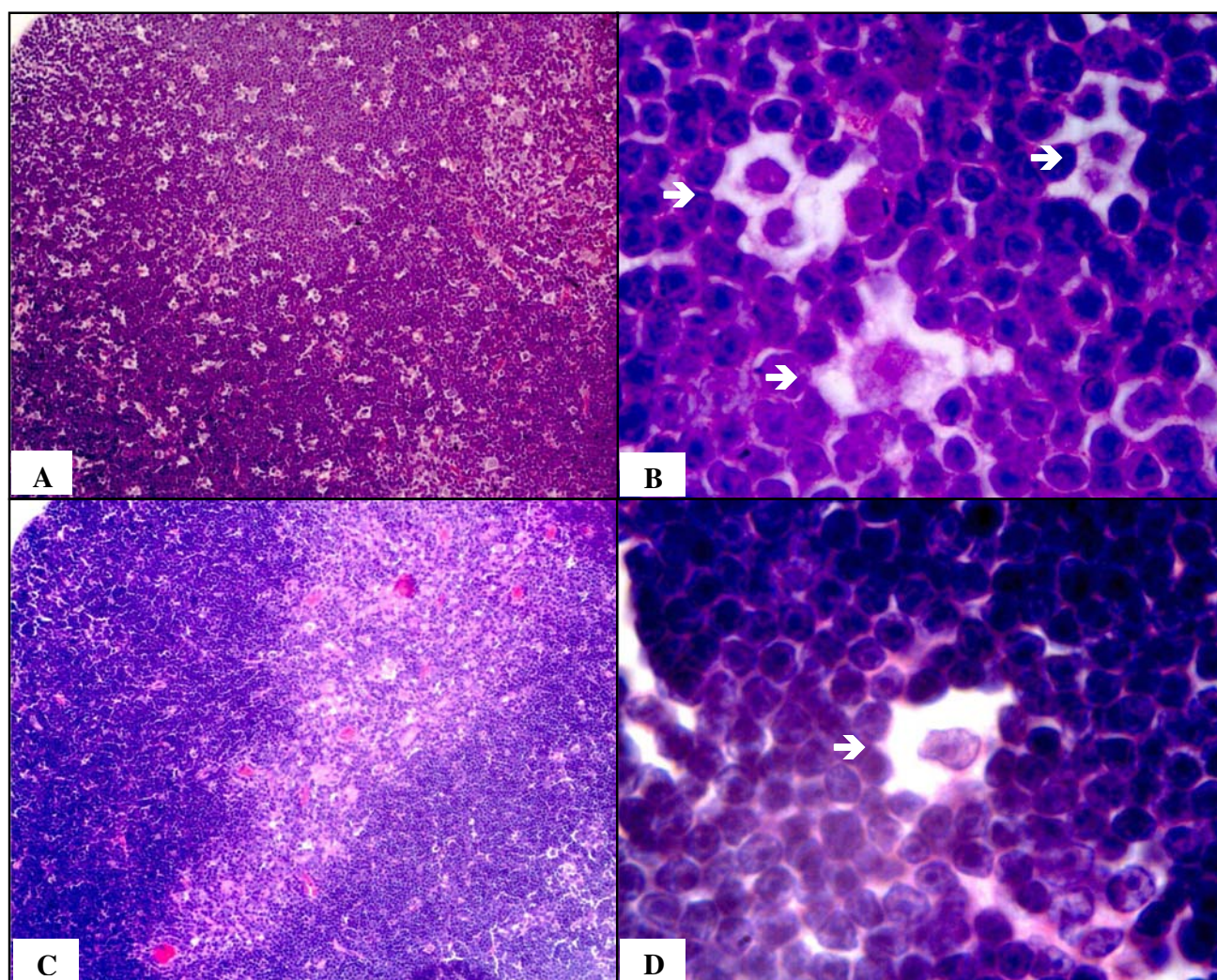


Figura 12: Fotomicrografia do timo. 3 dias após inoculação. (A) Pb18: É possível observar a perda da delimitação corticomedular e o padrão em “céu estrelado” caracterizado pela presença de muitas células, com núcleo picnótico, e de histiócitos. (B) Aumento maior da figura 12A destacando a presença de histiócitos (→). (C) Pb18UNICAMP: Neste caso não há a perda da delimitação corticomedular e a região cortical apresenta poucas células com núcleo picnótico e histiócitos, formando um padrão em “céu estrelado” não tão evidente. (D) Aumento maior da figura 12C destacando a presença de histiócitos (→). Coloração: H.E. Aumento: (A) e (C) 100x; (B) e (D) 1000x.

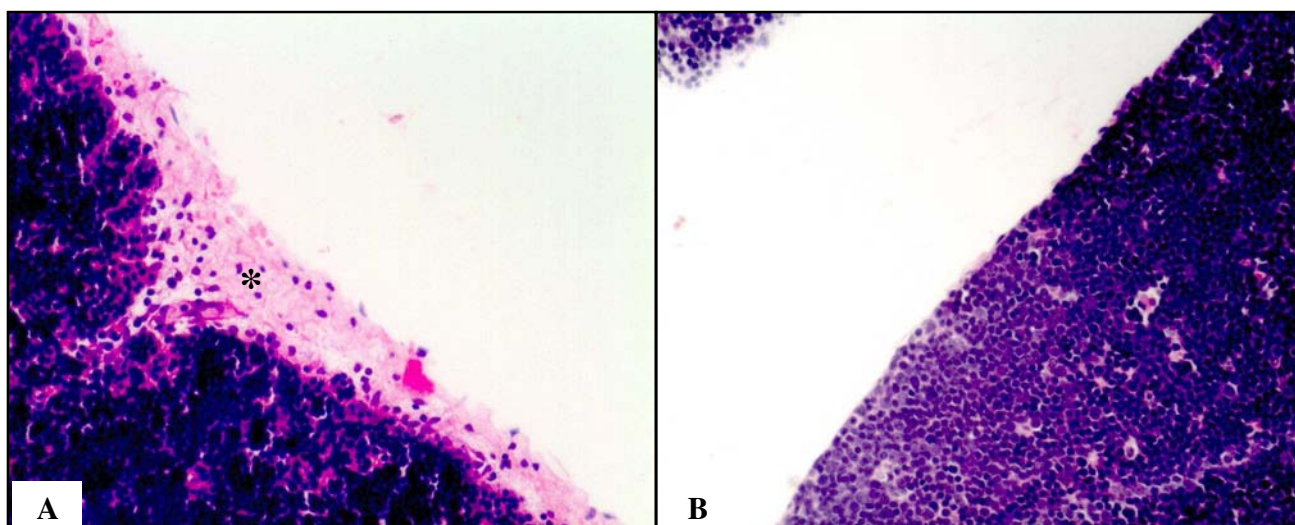


Figura 13: Fotomicrografia do timo, 5 dias após a inoculação. (A) Pb18: Nota-se a presença de infiltrado próximo à cápsula (*) que persistiu até o final do período experimental. (B) Pb18UNICAMP: Não é possível observar a presença de infiltrado sub-capsular de células inflamatórias. Coloração: H.E. Aumento: 200x.

Resultados anteriores obtidos no laboratório, utilizando a infecção experimental com Pb18 de camundongos BALB/c, descreveram que o *P. brasiliensis* era capaz de invadir o microambiente tímico. Neste trabalho observou-se também que o fungo era detectado no timo até os 60 dias de infecção (BRITO *et al.*, 2003).

Assim, para determinar se o isolado atípico também era capaz de invadir o microambiente tímico foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica. Esta análise mostrou que o Pb18UNICAMP também é capaz de invadir o timo, entretanto, partículas fúngicas só foram detectadas até o 3º dia de infecção (Figura 14).

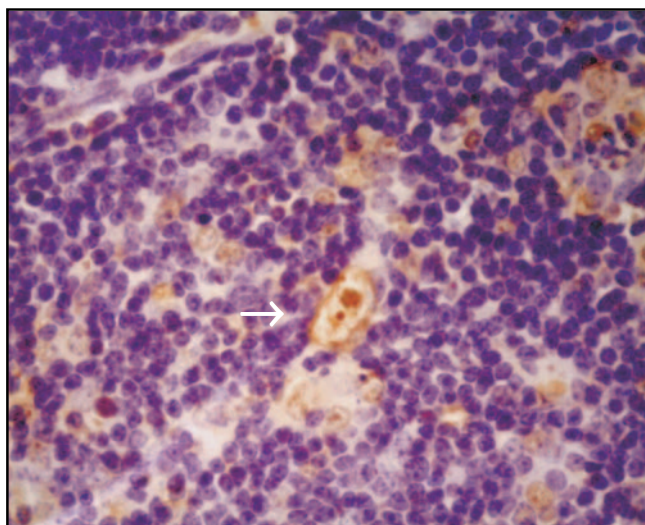


Figura 14: Fotomicrografia do timo de animais infectados com P18UNICAMP, 24 horas após a inoculação. Observe que a pseudo-hifa também é capaz de invadir o microambiente tímico (→). Técnica: Imuno-histoquímica contra corada com Hematoxilina. Aumento: 400x.

A análise, através da técnica *TUNEL*, para determinar o nível de apoptose no timo de animais infectados pelas amostras de *P. brasiliensis* também mostrou diferenças importantes entre as infecções.

Nos animais infectados com a cepa Pb18 observou-se uma forte reação positiva principalmente na região cortical do timo, quando comparado com os animais controle (Figura 15). Um aumento na morte celular por apoptose nesta região foi detectado a partir do primeiro dia após a inoculação, atingindo um pico aos 5 dias de infecção. Após este período, os níveis de apoptose foram comparáveis ao observado nos animais controle.

Já nos animais infectados com a amostra Pb18UNICAMP não foram observadas diferenças significativas no nível de apoptose entre estes e os animais controle (dados não documentados).

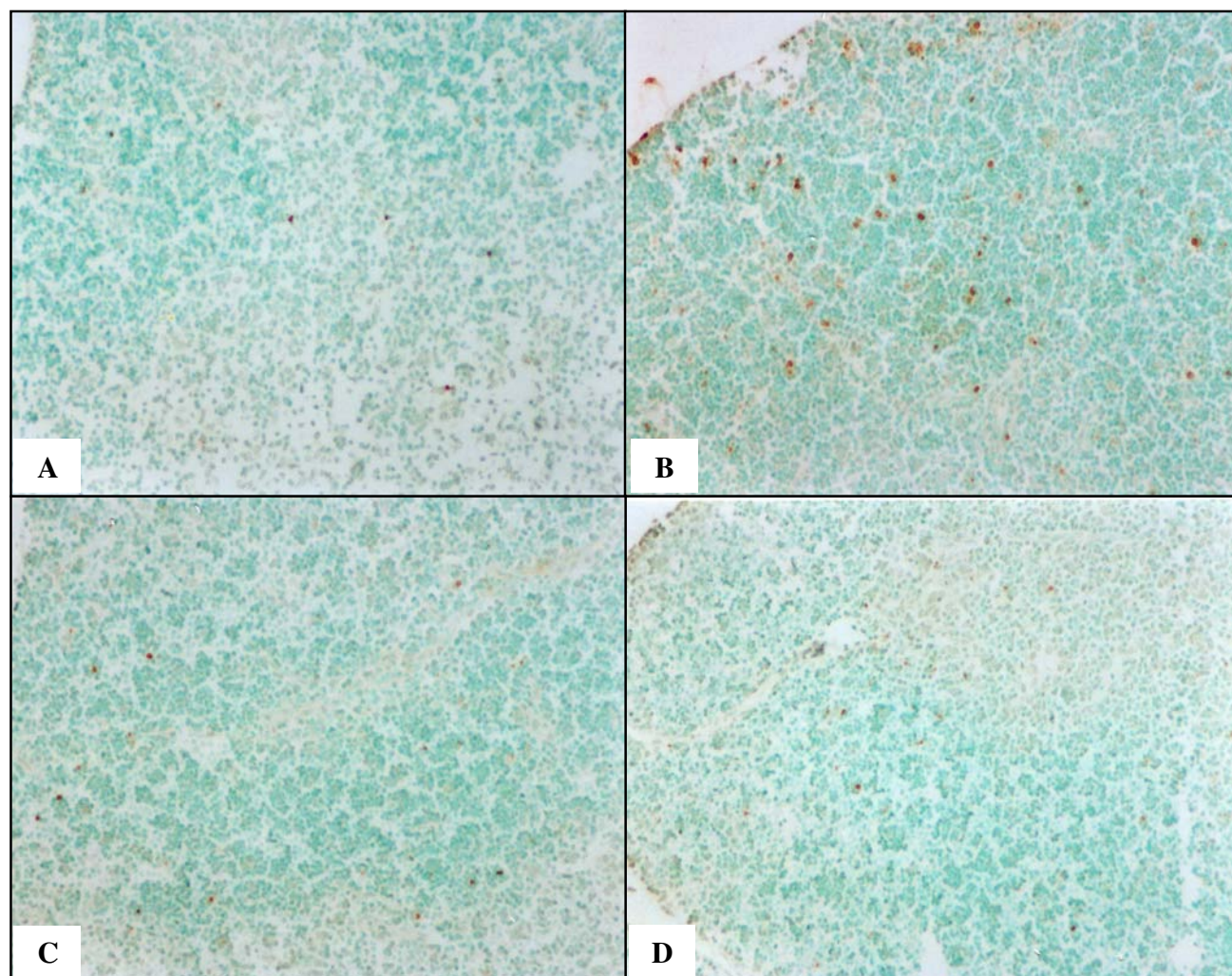


Figura 15: Fotomicrografia do timo. (A) PBS. (B) Pb18 - 24 horas p.i. (C) Pb18 - 7 dias p.i. (D) Pb18 - 14 dias p.i. Note que há um aumento na morte celular por apoptose, entretanto, a partir dos 7 dias p.i. este processo já se encontra semelhante ao visto nos animais controle. Técnica: TUNEL. Aumento: 200x.

4.2.3.2. Fígado e Baço:

Através da análise histopatológica do fígado foi possível observar que animais inoculados com a cepa virulenta Pb18 apresentavam, raramente, infiltrado inflamatório contendo muitos neutrófilos e macrófagos. Já nos animais inoculados com o isolado atípico Pb18UNICAMP em nenhum momento foi notado este tipo de lesão. (Figura 16).

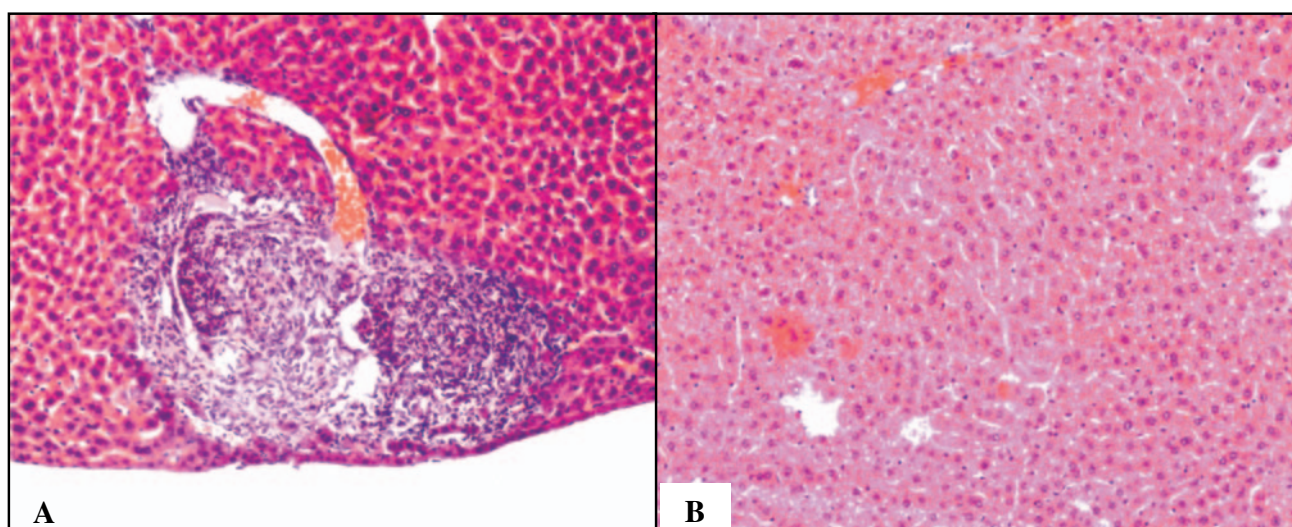


Figura 16: Fotomicrografia do fígado, 5 dias após a inoculação. (A) Pb18: Observe a presença de infiltrado inflamatório no interior do órgão. (B) Pb18UNICAMP: Já os animais infectados com o isolado atípico nota-se o aspecto normal do órgão. Coloração: H.E. Aumento: 100x.

A análise do baço também mostrou diferenças importantes na infecção causada pelos dois tipos de inoculo. Logo às 24 horas pós-inoculação da cepa Pb18, notou-se uma desorganização da estrutura desse órgão, com a perda da clara delimitação entre as polpas branca e vermelha. Além disso, observou-se a presença de muitos megacariócitos, especialmente na região próxima a cápsula. Já no baço dos animais inoculados com Pb18UNICAMP não foi possível notar a desorganização estrutural do

órgão. Entretanto, a presença de vários megacariócitos também foi observada no baço desses animais. (Figura 17)

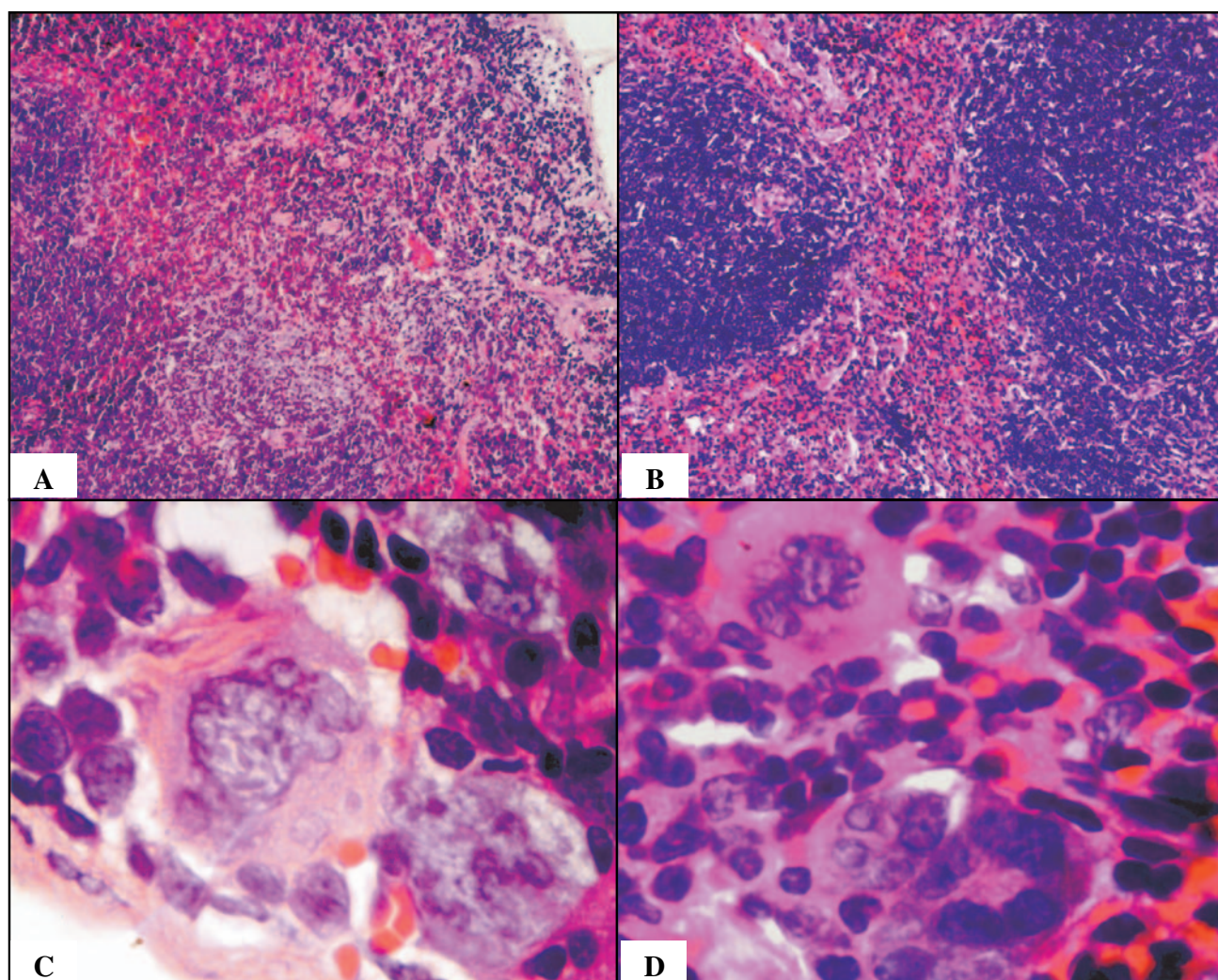


Figura 17: Fotomicrografia do baço, 3 dias após a inoculação. (A) Pb18: Observe a perda da delimitação entre as polpas branca e vermelha. (B) Pb18UNICAMP: Já os animais infectados com o isolado atípico apresentaram aspecto normal com clara delimitação entre as polpas do baço. (C) Pb18 e (D) Pb18UNICAMP: Note a presença de megacariócitos na região próximas à cápsula. Coloração: H.E. Aumento: (A) e (B) 100x; (C) e (D) 1000x.

4.2.3.3. Lesões de Disseminação:

Tanto no baço quanto no fígado dos animais inoculados com as duas amostras de *P. brasiliensis* foram observadas lesões de disseminação. Entretanto, a evolução das lesões foi muito diferente durante a infecção com os dois tipos de amostra da cepa Pb18.

No início da infecção, os animais inoculados com Pb18 apresentavam tanto no baço quanto no fígado a presença de infiltrados compostos predominantemente por neutrófilos, além de eosinófilos, plasmócitos e alguns macrófagos e linfócitos envolvendo muitas partículas fúngicas. Esses infiltrados polimorfonucleares foram gradativamente substituídos por infiltrados mononucleares, que evoluíram para a formação de granulomas com muitas partículas fúngicas no seu interior, que puderam ser observados até o final do período experimental (Figura 18).

Já nos animais inoculados com Pb18UNICAMP, a evolução da lesão ocorreu de forma diferente. Às 24 horas pós-inoculação pôde-se observar um infiltrado intenso de neutrófilos e poucas partículas fúngicas envolvidas por estas células (Figura 18). Com o passar do tempo essas lesões tornaram-se mais organizadas, sendo possível notar também a presença de alguns macrófagos e linfócitos. Entretanto, até os 14 dias de infecção essas lesões eram constituídas predominantemente por neutrófilos. Aos 28 dias pós-inoculação já não se detectava a presença das lesões.

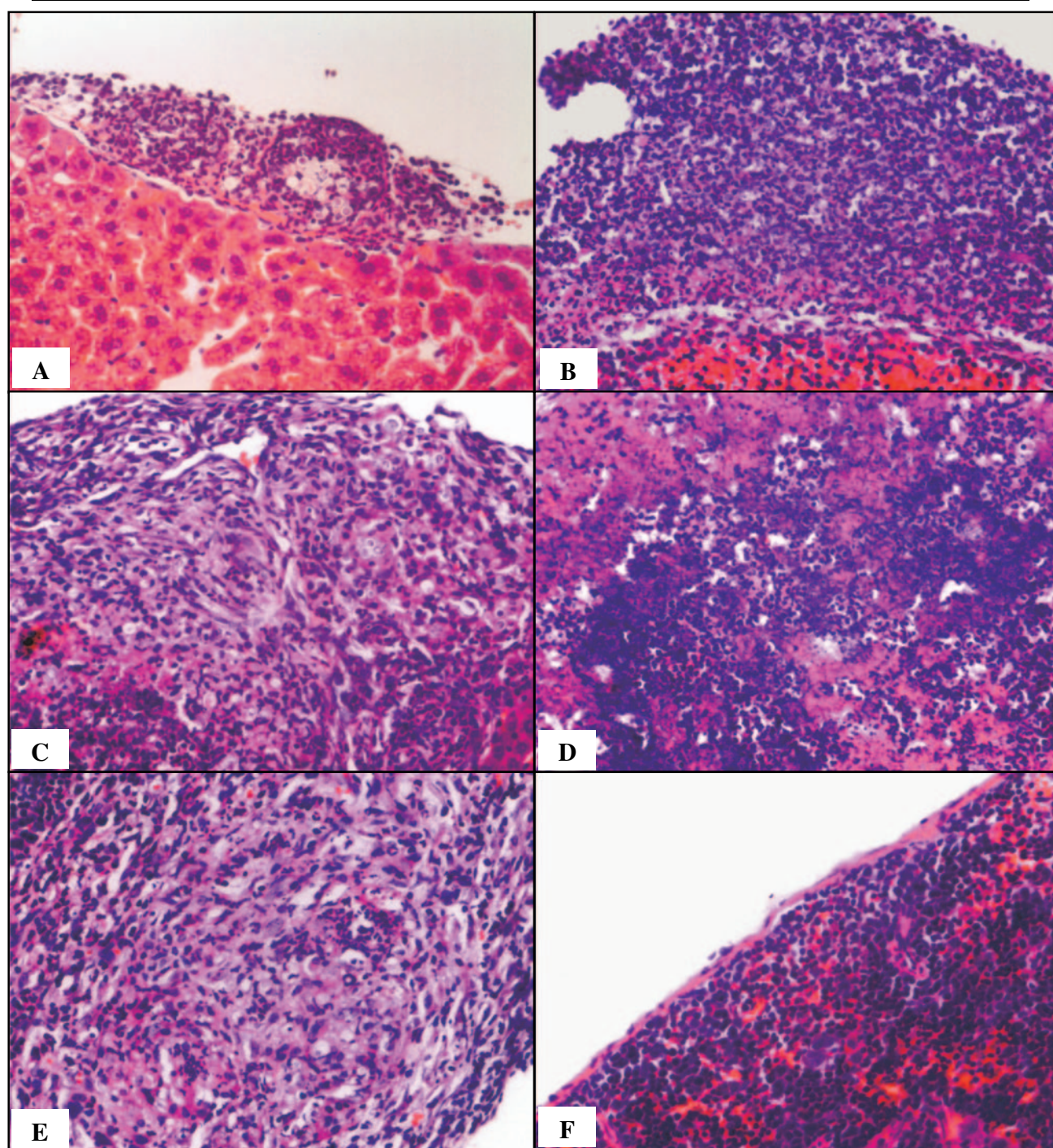


Figura 18: Fotomicrografia das lesões de disseminação. (A), (C) e (E) Pb18; (B), (D) e (F) Pb18UNICAMP. (A) e (B) 24 horas; (C) e (D) 7 dias; (E) e (F) 28 dias pós-inoculação. Observe a evolução das lesões de disseminação. Nos animais infectados com a cepa selvagem Pb18 há o desenvolvimento de granulomas contendo muitas partículas fúngicas, já as lesões observadas nos animais infectados com o isolado atípico apresentavam uma alta concentração de neutrófilos e uma pequena quantidade de partículas fúngicas, evoluindo para a resolução aos 28 dias de infecção. Coloração: H.E. Aumento: 200x.

4.2.4. Caracterização das populações de linfócitos T por citometria de fluxo:

4.2.4.1. Timo:

As análises por citometria de fluxo também revelaram diferenças nas populações celulares presentes no timo dos animais infectados com os dois isolados.

Nos animais inoculados com o Pb18 notou-se uma diminuição na subpopulação duplo positiva ($CD4^+CD8^+$) de timócitos, a partir do primeiro dia de infecção, com pico ao redor do 3º dia, e aumento da população duplo negativa ($CD4^-CD8^-$), também com pico aos 3 dias. Além disso, observou-se um aumento nas populações $CD4^-CD8^+$, aos 3 e 7 dias pós infecção, e $CD4^+CD8^-$ aos 3 dias (Figura 19).

Já nos animais inoculados com Pb18UNICAMP não foi possível detectar nenhuma diferença significativa na porcentagem das diferentes subpopulações de timócitos quando comparado com os animais controle (Figura 19).

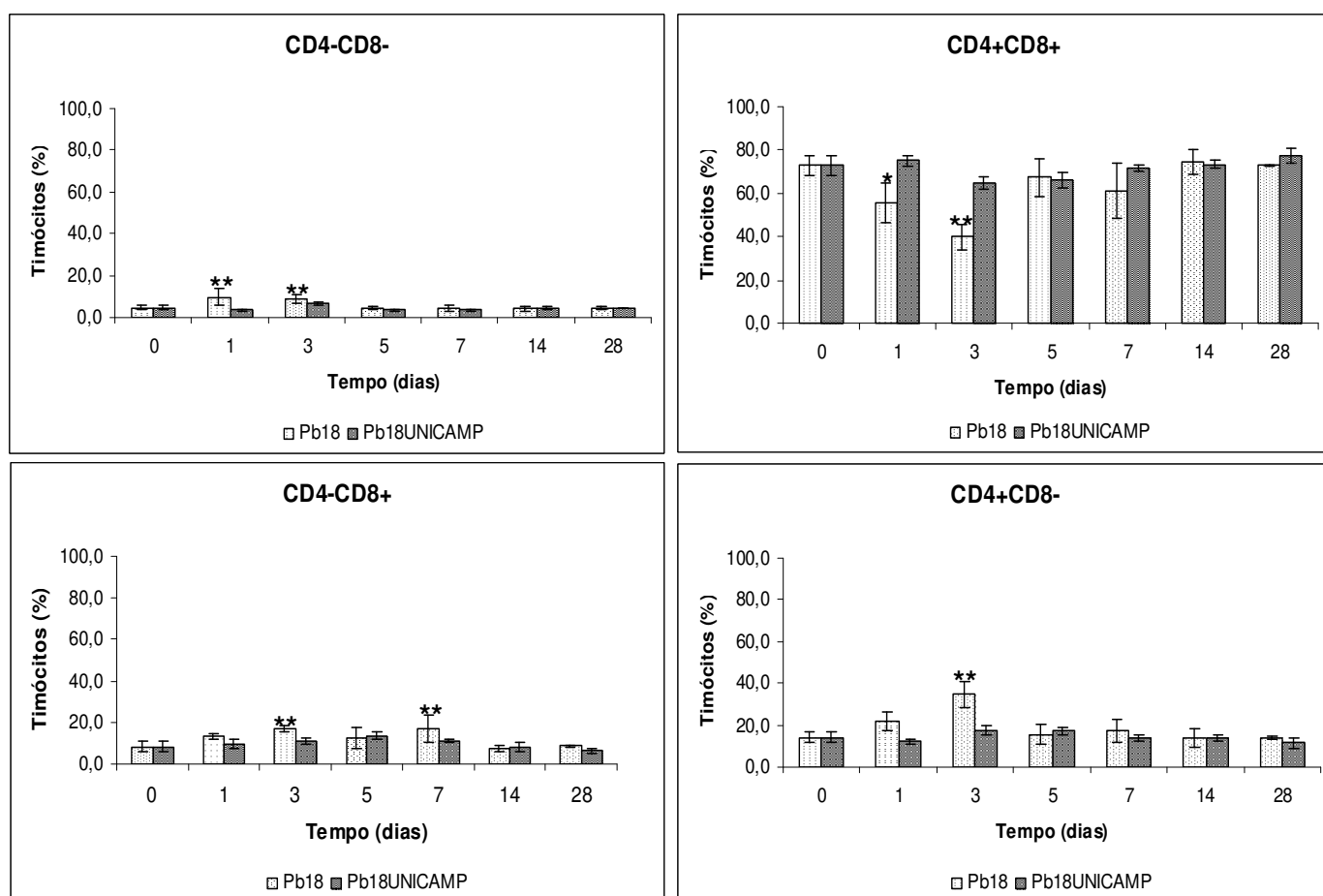


Figura 19: Citometria de fluxo dos timócitos. Os valores apresentados representam a média de células de 4 animais diferentes $\pm$ o erro médio padrão. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ (Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett).

4.2.4.2. Baço:

A análise da população de linfócitos T do baço mostrou nos animais inoculados com a cepa virulenta Pb 18 uma leve diminuição na porcentagem de células $CD8^+$ aos 14 dias pós-inoculação. Já nos animais inoculados com Pb18UNICAMP não foi possível detectar nenhuma diferença significativa na porcentagem da população linfocitária quando comparado com os animais controle. (Figura 20)

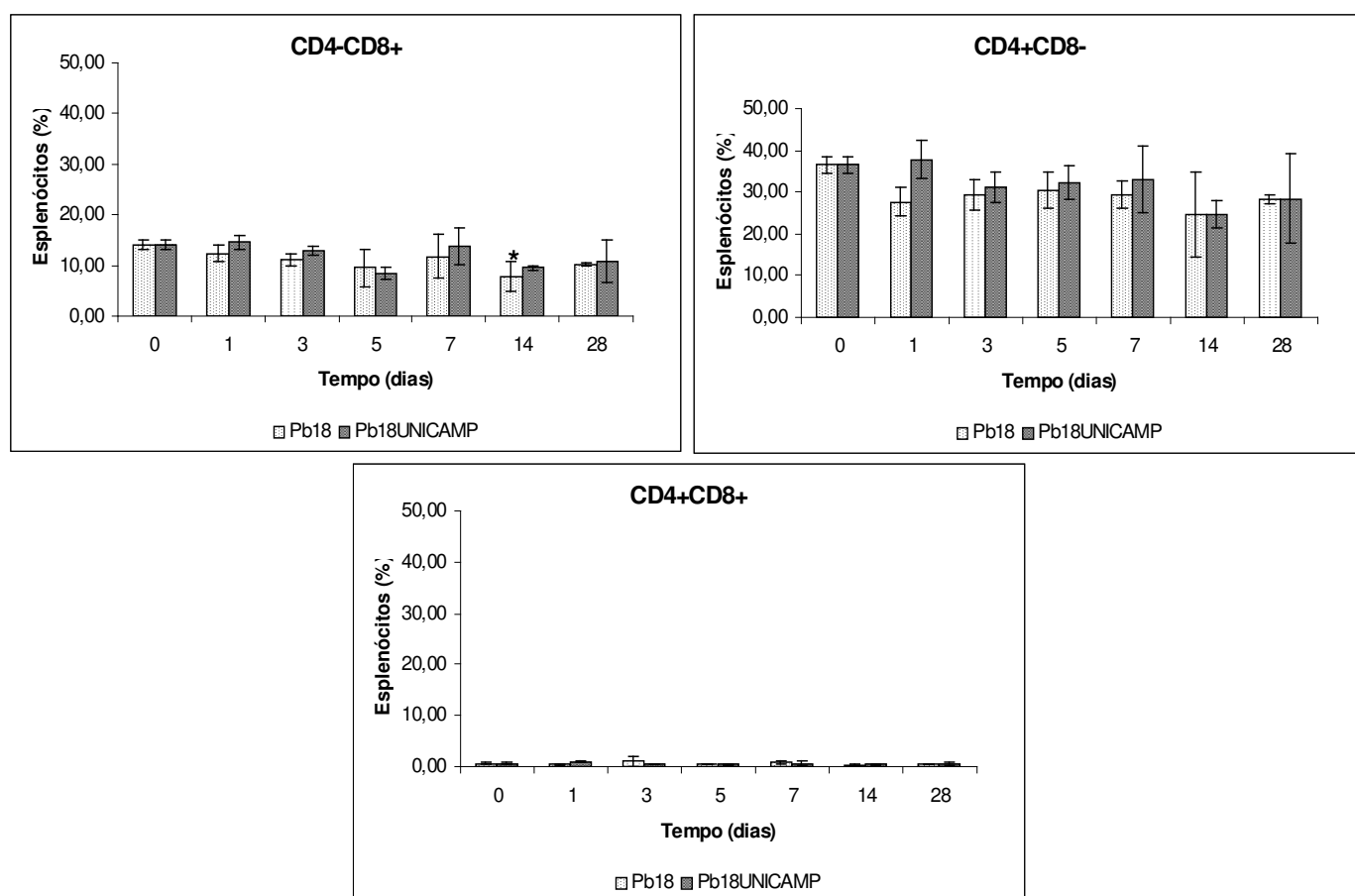


Figura 20: Citometria de fluxo dos esplenócitos. Os valores apresentados representam a média de células de 4 animais diferentes $\pm$ o erro médio padrão. * $p < 0.05$ (Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett).

4.3. Avaliação imunológica:

4.3.1. Resposta de hipersensibilidade celular específica:

A avaliação da resposta de hipersensibilidade tardia específica para *P. brasiliensis* foi feita através do teste do coxim plantar (TCP), injetando-se 4 μ g de antígeno específico (CFA obtido de Pb18) no coxim plantar posterior esquerdo de cada

animal, 24 horas antes do sacrifício. Foram considerados como parâmetros para a avaliação imunológica o aumento do volume da pata teste em relação à pata controle, inoculada com PBS estéril.

Ao longo do período experimental, tanto nos animais inoculados com Pb18UNICAMP como com Pb18, não foi possível observar diferenças entre o volume das patas teste e controle (Figura 21).

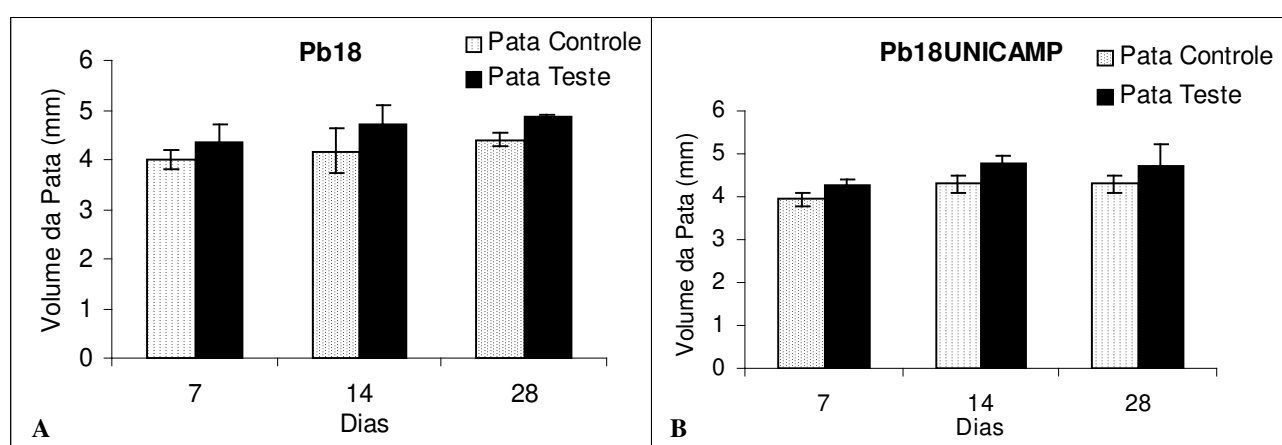


Figura 21: Volume das patas de camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis* 24 horas após o Teste do coxim plantar. (A) Pb18 e (B) Pb18UNICAMP. Os valores representam a média do volume das patas de 4 animais $\pm$ o erro padrão médio.

Apesar dos resultados não apontarem uma diferença no volume entre as patas, estes resultados não necessariamente indicam uma reação negativa do teste de hipersensibilidade celular tardia, uma vez que, este parâmetro, por ser uma medida indireta, não proporciona uma análise qualitativa das células que migram para o local da inoculação. Assim, a análise histológica das patas foi realizada com o objetivo de se determinar se existia alguma diferença no padrão e na quantidade de células migratórias. Nos dois tipos de infecção observou-se a presença de um discreto infiltrado

inflamatório, entretanto, nenhuma diferença qualitativa entre os dois grupos foi observada (dados não documentados).

4.3.2. Ensaio de proliferação celular:

O ensaio de proliferação celular, utilizando o mitógeno ConA, mostrou que as células esplênicas derivadas de animais infectados apresentaram capacidade proliferativa mais reduzida que o grupo controle (Figura 22). Entretanto, nos animais inoculados com a cepa Pb18 observou-se uma diminuição significativa na proliferação das células do baço aos 28 dias após infecção, se comparada com o resultado obtido utilizando células de animais controle.

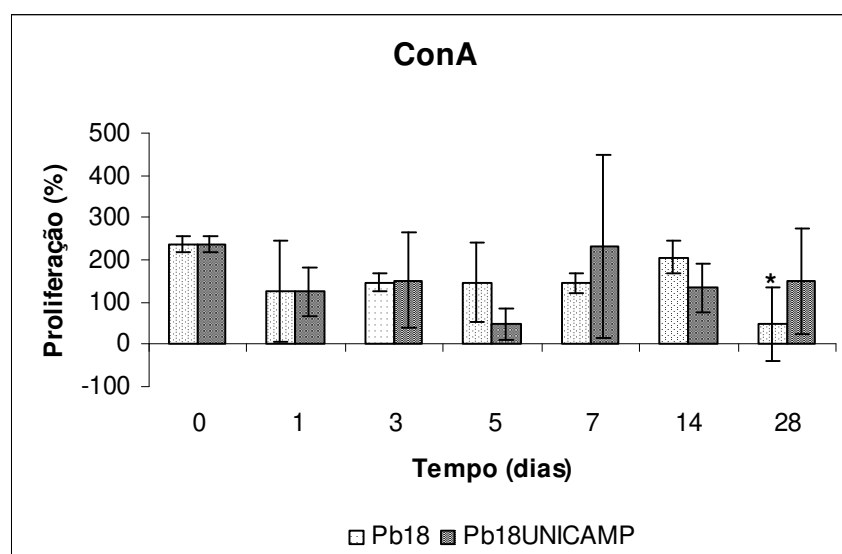


Figura 22: Proliferação celular com o mitógeno ConA. A porcentagem de proliferação foi determinada comparando-se as culturas estimuladas com suas respectivas culturas sem estimulação. Os valores apresentados representam a média da porcentagem de proliferação de quatro amostras de células de 3 animais diferentes $\pm$ o erro médio padrão. * $p < 0,05$ (Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett).

No ensaio utilizando antígenos específicos do *P. brasiliensis* (CFA) notou-se que as células obtidas de animais inoculados com a cepa virulenta Pb18 apresentaram capacidade de proliferação durante todo o período experimental com exceção do 28º dia de infecção. Já as células dos animais inoculados com Pb18UNICAMP tinham a sua capacidade proliferativa diminuída às 24 horas de infecção chegando, aos 3 e 5 dias pós-inoculação, a apresentar inibição desta resposta. A partir dos 7 dias de infecção a capacidade proliferativa tendeu a retornar aos níveis normais. (Figura 23)

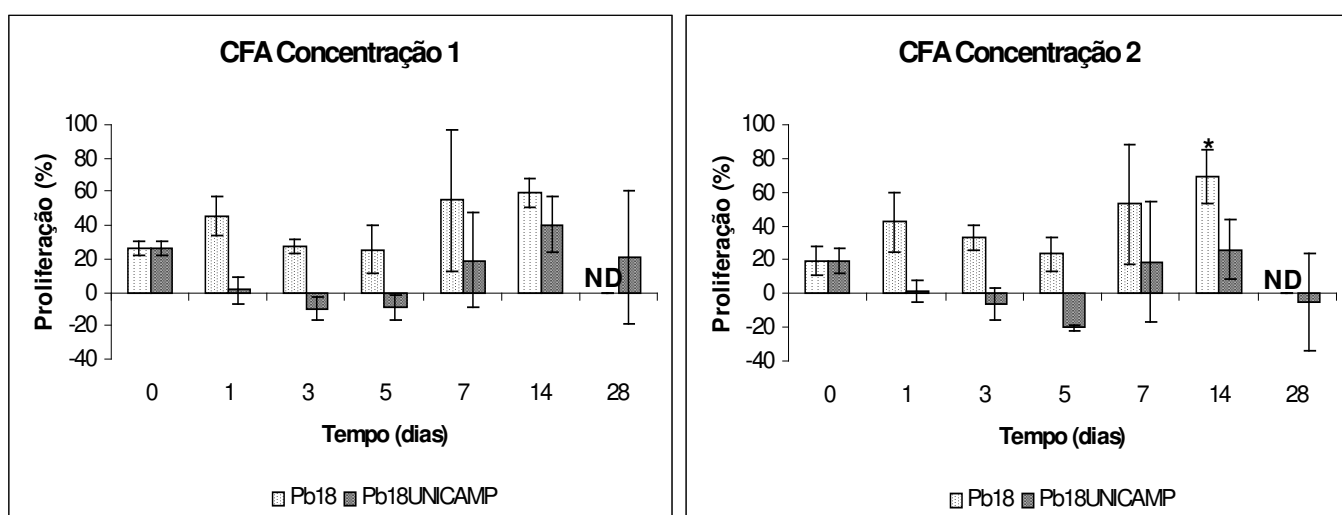


Figura 23: Proliferação celular utilizando antígeno de *P. brasiliensis*. A porcentagem de proliferação foi determinada comparando-se as culturas estimuladas com suas respectivas culturas sem estimulação. Os valores apresentados representam a média da porcentagem de proliferação de quatro amostras de células de 3 animais diferentes $\pm$ o erro médio padrão. ND: Não detectado. * $p < 0,05$ (Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett).

4.3.3. Avaliação da liberação de citocinas na infecção:

4.3.3.1. Citocinas no soro:

Para determinar o padrão de citocinas produzidos durante a infecção, com as duas amostras do fungo, foi dosado no soro dos animais infectados ou não as concentrações de IL4, IFN γ e TNF.

Durante a infecção com Pb18UNICAMP o soro dos animais apresentaram um discreto aumento na concentração de IL4 com um pico aos 3 dias pós-inoculação e em seguida uma diminuição da mesma. Já nos animais inoculados com Pb18 observou-se uma leve diminuição às 24 horas de infecção. (Figura 24)

Apesar da baixa concentração de TNF no soro dos animais infectados notou-se diferenças entre a cinética da concentração desta citocina durante a infecção com as duas amostras do fungo. Nos animais inoculados com Pb18UNICAMP observa-se um aumento na concentração do TNF nos 3 primeiros pontos da infecção para em seguida ocorrer uma diminuição da mesma. Já nos animais inoculados com a cepa virulenta Pb18 há um aumento o TNF sérico às 24 horas e em seguida uma diminuição. A partir dos 7 dias pós-inoculação a concentração desta citocina volta a subir até os 28 dias de infecção quando este aumento é estatisticamente significativo. (Figura 25)

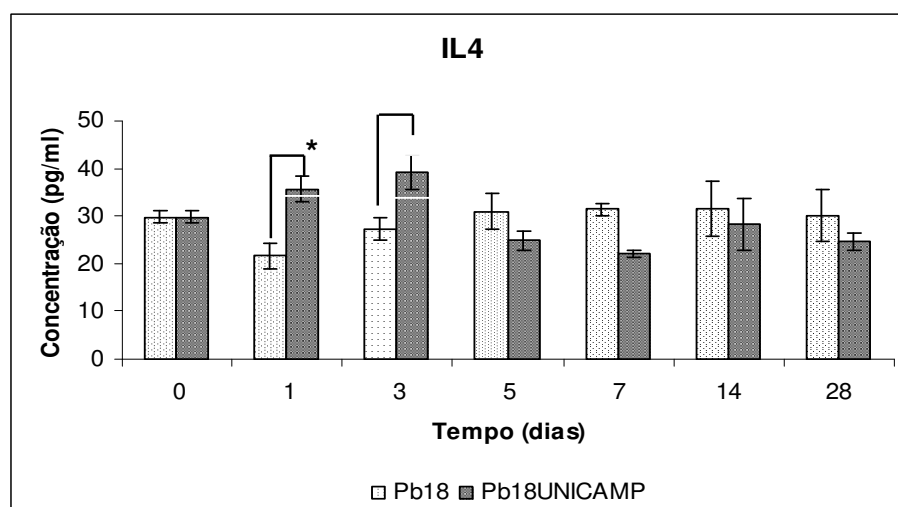


Figura 24: Concentração de IL 4 no soro de animais inoculados com *P. brasiliensis*. A análise estatística (ANOVA) revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0,0001$), enquanto que o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni mostrou diferenças significativas na concentração de IL4 aos 3 dias pós-inoculação nos animais inoculados com Pb18UNICAMP. Além disso, mostrou diferenças significativas entre as infecções no primeiro e terceiro dia de infecção. Os valores apresentados representam a média da concentração da citocina no soro de 3 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$)**

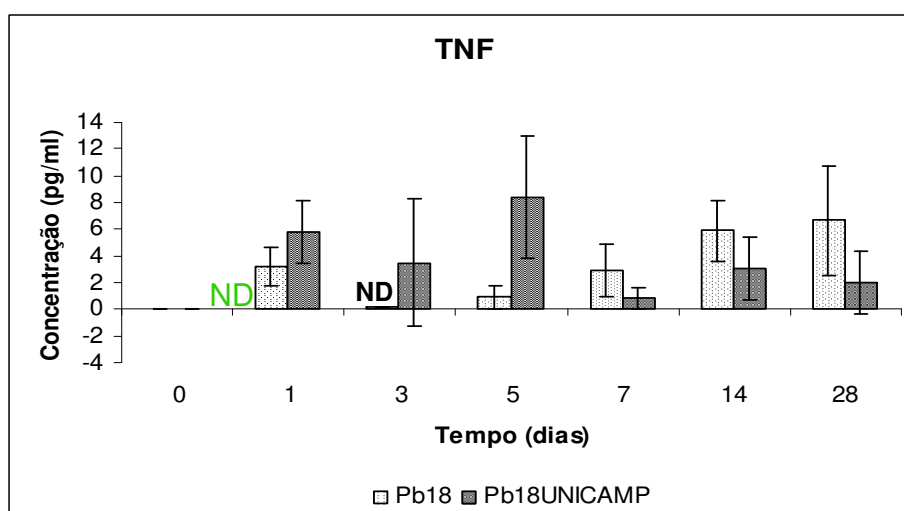


Figura 25: Concentração de TNF no soro de animais inoculados com *P. brasiliensis*. Não foi possível observar nenhuma alteração estatisticamente significativa desta citocina nestes animais. Os valores apresentados representam a média da concentração da citocina no soro de 3 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. ND: Não detectado.

No caso do IFN γ não foi possível detectar esta citocina no soro dos animais inoculados tanto com Pb18UNICAMP quanto com Pb18.

4.3.3.2. Citocinas no sobrenadante de cultura de baço:

A dosagem das citocinas no sobrenadante foi realizada tanto nas culturas estimuladas com o mitógeno ConA como nas estimuladas com antígenos específicos do *P. brasiliensis* (CFA).

Em sobrenadantes das culturas de células do baço, de animais inoculados com a cepa virulenta Pb18, estimuladas com ConA, notou-se a presença da IL4 em todo o período experimental, entretanto, sem nenhuma diferença estatística em relação ao controle. Já nas culturas de células de animais inoculados com Pb18UNICAMP, não foi possível detectar a presença da IL4 em vários pontos do período experimental como pode ser observado na figura 26A. Quando as culturas foram estimuladas com o antígeno específico CFA, a produção de IL4 foi sempre muito baixa em ambos os grupos experimentais ao longo de todo o período de observação (Figura 26).

A dosagem de TNF na cultura de células do baço de animais inoculados com Pb18 e estimuladas *in vitro* com ConA mostrou uma diminuição desta citocina às 24 horas de infecção. A partir deste ponto a concentração volta a subir atingindo um pico de produção aos 5 dias pós-inoculação para, em seguida, diminuir novamente atingindo concentrações menores do que as detectadas nos animais controle. Já as culturas de células dos animais inoculados com o Pb18UNICAMP mostraram um aumento na concentração desta citocina, com pico em 5 dias pós-inoculação e, em seguida, uma

diminuição da mesma a níveis inferiores ao encontrado nos animais controles (Figura 27).

Um comportamento oposto ocorreu quando esta citocina foi dosada em culturas de células de baço estimuladas com o antígeno específico CFA. Nos dois grupos nota-se aumento desta citocina às 24 horas de infecção seguido de diminuição da mesma. A partir do 14^o dia de infecção os níveis de TNF voltam a aumentar e atingem um novo pico aos 28 dias pós-inoculação (Figura 27).

No caso da dosagem de IFN γ nas culturas de baço estimuladas com o mitógeno observa-se, nos animais inoculados com Pb18, inicialmente, às 24 horas de infecção, que houve uma diminuição desta citocina no sobrenadante das culturas seguido de um aumento com pico em 5 dias de infecção. Em seguida a concentração de IFN γ retornou aos níveis normais. Já nos animais inoculados com isolado atípico, nota-se um aumento da concentração desta citocina às 24 horas de infecção seguida por uma diminuição aos 3 dias pós-inoculação. No 5^o dia infecção observa-se um novo pico de aumento de IFN γ seguido, novamente da diminuição na concentração desta citocina (Figura 28).

As concentrações de IFN γ observadas nas culturas de células de baço estimuladas com o antígeno específico foram menores do que aquelas observadas nas culturas estimuladas com ConA. Além disso, notou-se nos dois grupos de infecção uma semelhança na cinética de produção do IFN γ e que as células coletadas nos 14^o e 28^o dias de infecção apresentaram concentrações de IFN γ significativamente maiores do que o controle (Figura 28).

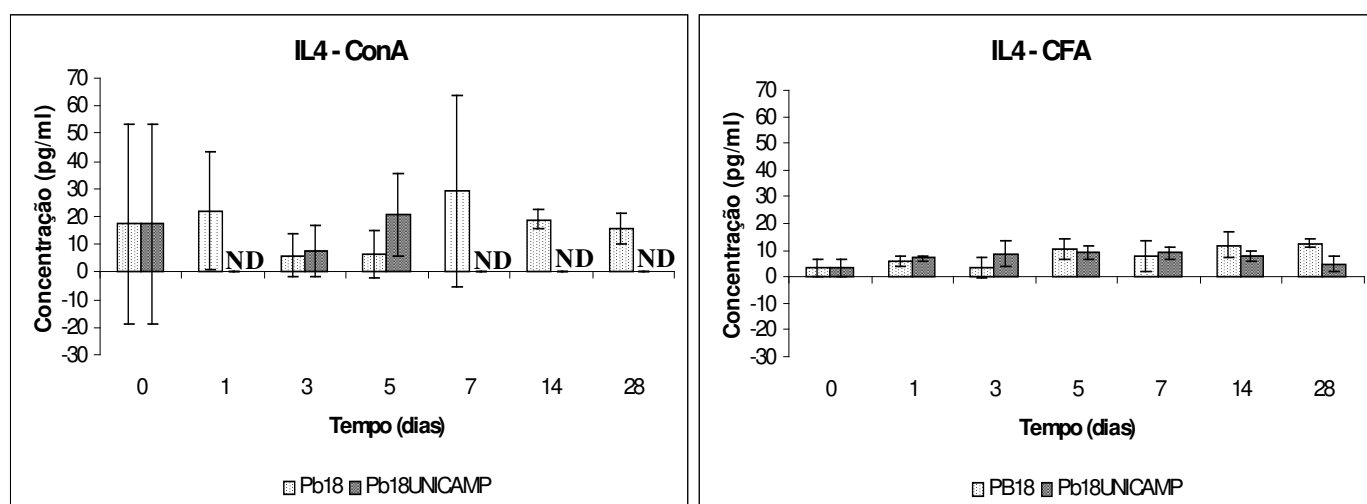


Figura 26: Concentração de IL4 no sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas. Independente do estímulo usado não foi possível detectar nenhuma alteração na concentração desta citocina quando comparado com o controle (tempo 0). Os valores apresentados representam a média da concentração da citocina no sobrenadante de cultura de células do baço de 3 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. ND: Não detectado.

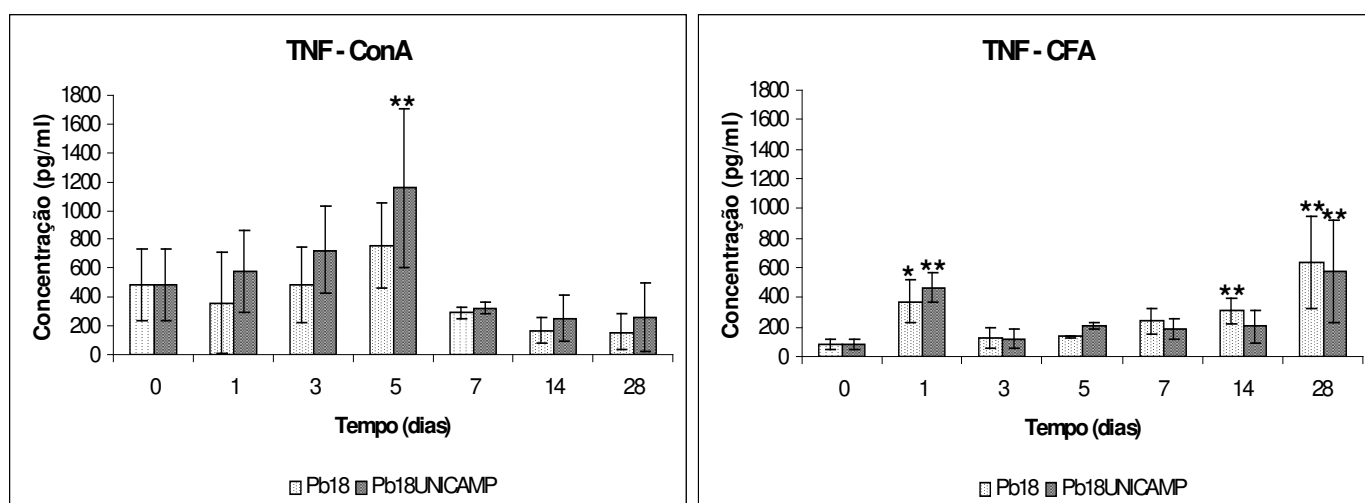


Figura 27: Concentração de TNF no sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas. A análise estatística (ANOVA) revelou variações significativas neste grupo ($p < 0.0001$), enquanto que o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significantes na concentração de TNF aos 5 dias pós-inoculação nas culturas de Pb18UNCAMP estimuladas com ConA. Além disso, nas culturas estimuladas com CFA observou-se diferenças significantes na concentração de TNF aos 1, 14 e 28 dias pós-inoculação. Os valores apresentados representam a média da concentração da citocina no sobrenadante de cultura de células do baço de 3 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

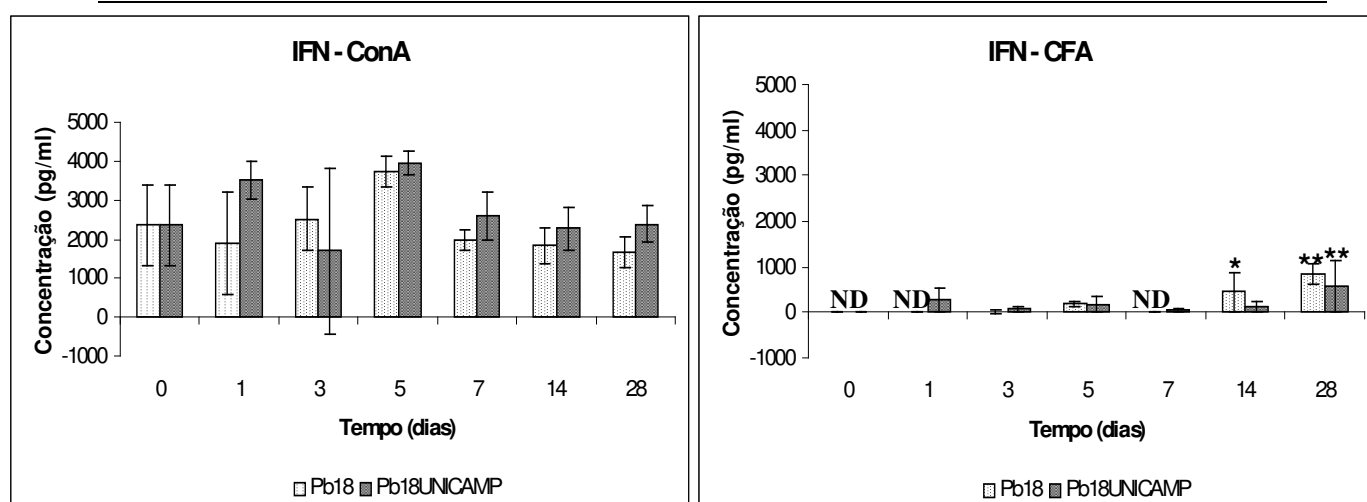


Figura 28: Concentração de IFN γ no sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas. Nas culturas estimuladas com o mitógeno ConA não foi possível detectar nenhuma alteração na concentração desta citocina quando comparado com o controle (tempo 0) independente da amostra fúngica inoculada. Já nas culturas estimuladas com CFA a análise estatística (ANOVA) revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0.0001$), enquanto que o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significativas na concentração de IFN γ aos 14 e 28 dias pós-inoculação. Os valores apresentados representam a média da concentração da citocina no sobrenadante de cultura de células do baço de 3 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. ND: Não detectado. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.3.3.3. Citocinas no sobrenadante de cultura de timo:

A dosagem das citocinas induzidas pela ConA e pelo CFA também foi realizada no sobrenadante de culturas de células do timo de animais infectados com *P. brasiliensis*.

A estimulação com a ConA induziu um aumento na concentração de IL4 nas culturas de células de timo de animais inoculados com a cepa virulenta Pb18, coletadas logo no início da infecção, isto é, às 24 horas pós-inoculação. Já nas culturas de células

do timo de animais inoculados com isolado atípico esse aumento ocorreu aos 14 e 28 dias de infecção. (Figura 29)

Nas culturas de células tímicas de animais inoculados com Pb18 e estimuladas *in vitro* com o antígeno CFA, não se observou nenhuma diferença significativa na concentração de IL4 ao longo da infecção. Já nas células provenientes de animais inoculados com Pb18UNICAMP a IL4 foi mais reduzida apenas no 7º dia de infecção. (Figura 29)

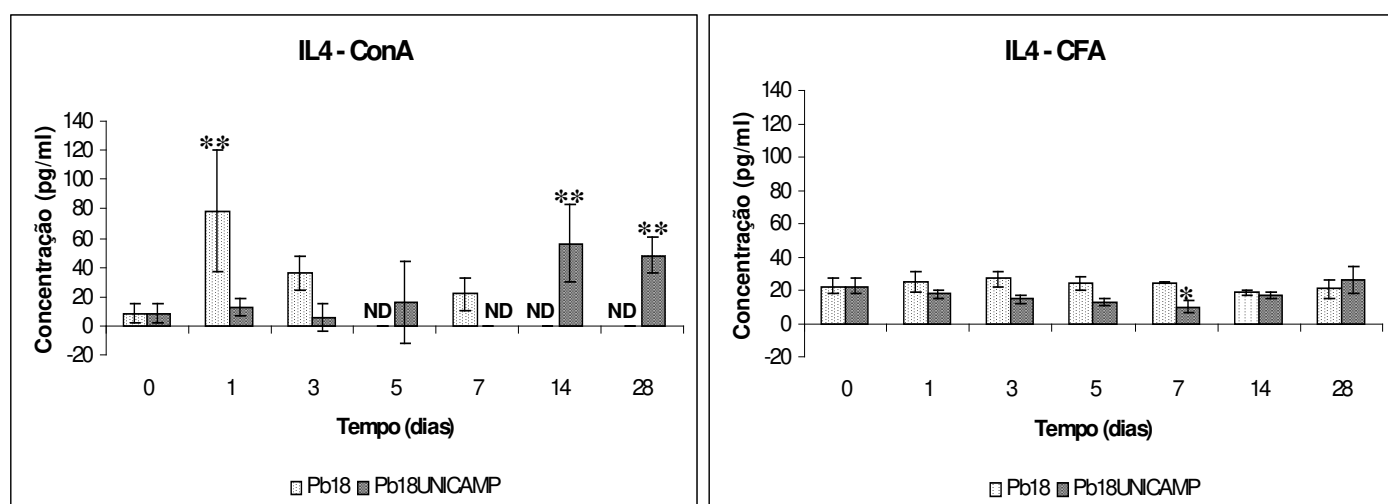


Figura 29: Concentração de IL4 no sobrenadante de cultura de células do timo estimuladas. A análise estatística (ANOVA) revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0.0001$), enquanto que o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significantes na concentração de IL4 nas culturas estimuladas com ConA às 24 horas (Pb18), 14 e 28 dias (Pb18UNICAMP) pós-inoculação. Já nas culturas estimuladas com CFA o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significantes na concentração de IL4 apenas aos 7 dias pós-inoculação (Pb18UNICAMP). Os valores apresentados representam a média da concentração da citocina no sobrenadante de cultura de células do baço de 3 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. ND: Não detectado. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Nas culturas de células do timo de animais inoculados com a cepa virulenta Pb18, estimuladas com ConA, não foi possível detectar a presença de TNF durante o período experimental. Já nas culturas de células do timo de animais inoculados com Pb18PH observou-se que a concentração de desta citocina diminuiu ao longo da infecção a ponto de não ser mais detectada a partir dos 7 dias de infecção. (Figura 30)

Quando as culturas de células do timo, de ambos os grupos de animais, foram estimuladas com CFA, não foi possível estimar a concentração de TNF.

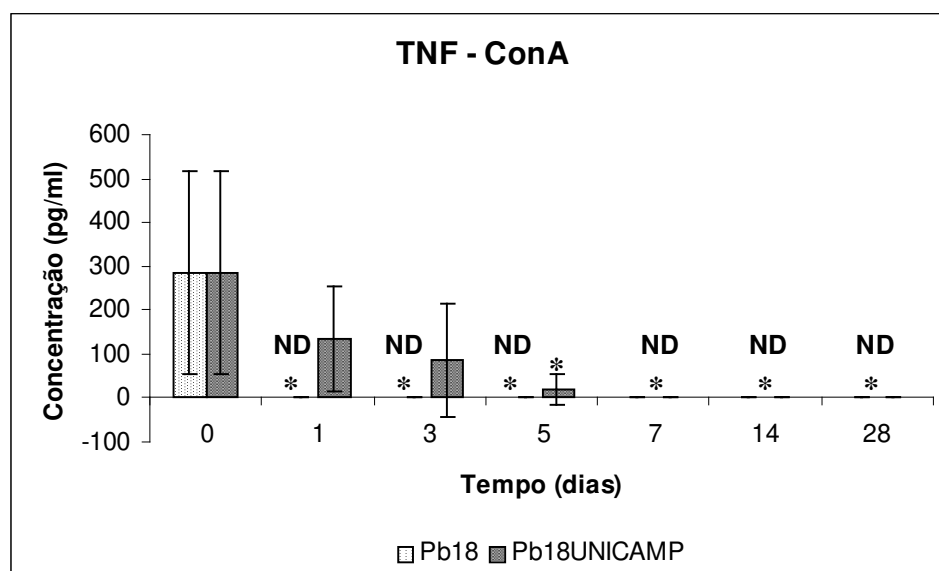


Figura 30: Concentração de TNF no sobrenadante de cultura de células do timo estimuladas. A análise estatística (ANOVA) revelou variações significativas neste grupo ($p=0.0096$), enquanto que o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significantes na concentração de TNF em todos os dias pós-inoculação. Os valores apresentados representam a média da concentração da citocina no sobrenadante de cultura de células do baço de 3 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. ND: Não detectado. ($*p<0,05$)

Em relação aos níveis de IFN γ no sobrenadante das culturas de células do timo de ambos os grupos de animais notou-se uma baixa concentração desta citocina quando as culturas foram estimuladas com o mitógeno ConA, com exceção do primeiro

dia de infecção com a cepa virulenta Pb18, quando foi observado o seu aumento (Figura 31).

Quando as culturas foram conduzidas na presença do antígeno específico de *P. brasiliensis* não foi possível detectar o IFN γ nos sobrenadante das culturas de células do timo dos dois grupos experimentais.

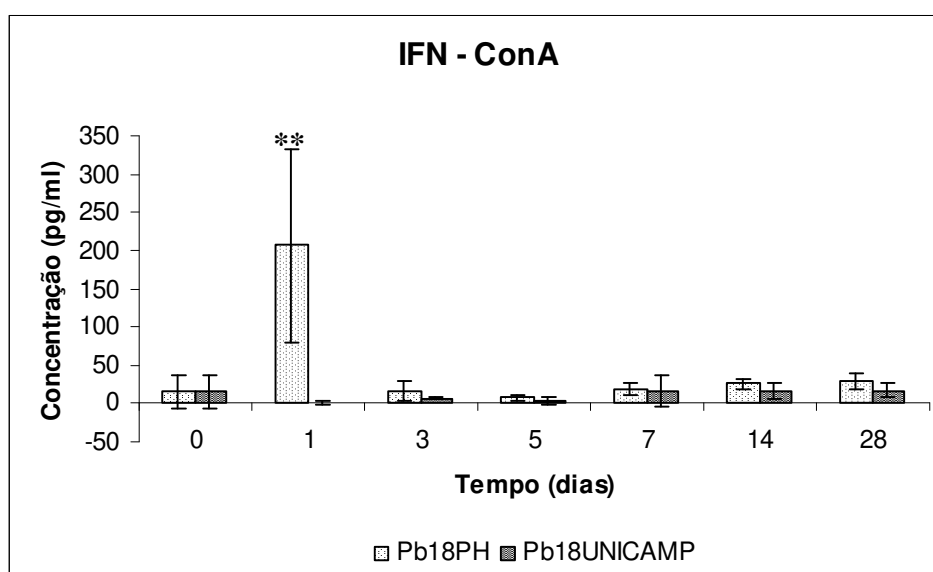
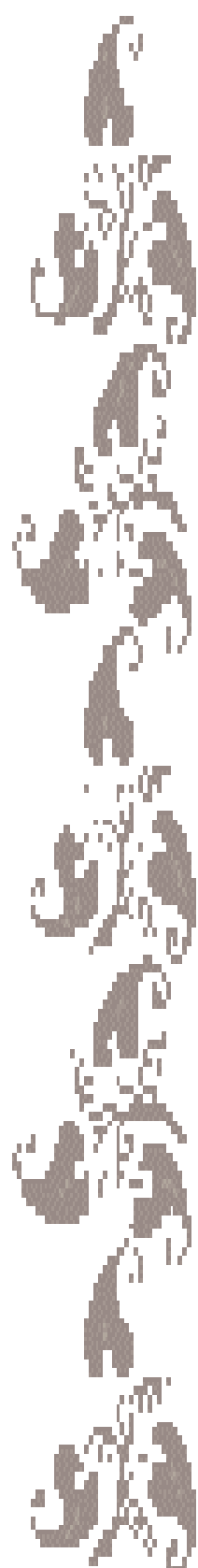


Figura 31: Concentração de IFN γ no sobrenadante de cultura de células do timo estimuladas. A análise estatística (ANOVA) revelou variações significativas neste grupo ($p= 0.0217$), enquanto que o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significantes na concentração de IFN γ às 24 horas pós-inoculação. Os valores apresentados representam a média da concentração da citocina no sobrenadante de cultura de células do baço de 3 animais diferentes $\pm$ o desvio padrão. ($p<0,01$)**



5. DISCUSSÃO

Apesar da paracoccidiodomicose ter sido descrita pela primeira vez há quase cem anos por Aldolpho Lutz (LUTZ, 1908) e do grande desenvolvimento tecnológico ocorrido nos últimos tempos, muitas questões a respeito da biologia do *P. brasiliensis* e da sua relação com o hospedeiro permanecem ainda um mistério para os pesquisadores.

Para o estudo de muitos microrganismos e das suas relações com o sistema imune do hospedeiro uma das ferramentas bastante utilizada é o mutante. Normalmente estes mutantes são obtidos através do tratamento químico ou físico destes microrganismos ou através da descoberta de mutações espontâneas ocorridas em culturas mantidas em laboratórios.

Assim, tendo em vista a importância dos mutantes no entendimento de muitas infecções associado ao fato de termos, em nosso laboratório, observado a presença de uma amostra da cepa virulenta Pb18 com características atípicas, este trabalho procurou estudar a morfologia e a composição protéica, além da infecção e resposta imune com o objetivo de caracterizar parcialmente este isolado visando à obtenção de uma nova ferramenta para o estudo da paracoccidiodomicose e de seu agente causal.

Até o presente momento, a maioria dos relatos de isolados atípicos do *P. brasiliensis* descreve mutantes obtidos através do tratamento químico ou da manipulação de fatores nutricionais. Um componente químico capaz de induzir mutação no *P. brasiliensis* é o *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG). SAN-BLAS & CENTENO (1977), através do tratamento de leveduras da cepa Pb9 com o NTG, obtiveram cerca de setenta mutantes desta cepa. Já em relação à manipulação de componentes nutricionais, VILLAR e colaboradores (1988) demonstraram que a adição

de soro fetal bovino (FCS) às culturas da cepa ATCC 60885 (American Type Culture Collection nº60885) de *P. brasiliensis*, mantidas em meio Agar-BHI (Brain-Heart-Infusion), levava ao desenvolvimento de amostras capazes de manterem-se na forma de levedura a 21°C. Dentre estas amostras os autores isolaram uma que, mesmo sem a suplementação com FCS, permaneceu com as alterações obtidas e foi depositada na ATCC sob o número 64678.

Entretanto, nem todos os mutantes de *P. brasiliensis* descritos foram isolados através de tratamento químico ou da manipulação de componentes nutricionais. Neste sentido, existem relatos que mostram a obtenção de isolados atípicos deste fungo a partir de pacientes. Um exemplo disto é uma cepa atípica, denominada 1430, isolada a partir de um paciente de 55 anos de idade, trabalhador rural e sofrendo de infecção crônica pelo *P. brasiliensis*, que se apresentava na forma de levedura mesmo a temperatura ambiente (HAHN *et al.*, 2002).

É interessante ressaltar que todos os mutantes supra citados têm em comum a característica de permanecer na forma de levedura mesmo a temperatura ambiente.

Também foram relatados casos de isolados atípicos obtidos a partir de cultivo *in vitro* por longos períodos que apresentam formas variadas. Nesse sentido, há descrições de várias cepas de *P. brasiliensis*, mantidas por longos períodos em óleo mineral, que haviam perdido a habilidade de infectar camundongos e de completar o processo dimórfico, permanecendo como formas transitórias como pseudo-hifas (MENDES DA SILVA *et al.*, 1994; BORBA & SCHÄFFER, 2002; BORBA *et al.*, 2005).

De forma semelhante, o isolado atípico denominado Pb18UNICAMP, derivado de uma amostra da cepa virulenta Pb18 mantida em nosso laboratório por alguns anos

através de passagens *in vitro*, apresenta-se exclusivamente em formas intermediárias de crescimento, tanto a 37°C quanto à temperatura ambiente. Vale destacar que esse isolado foi obtido sem nenhum tratamento químico específico e que a passagem por animal não foi capaz de modificar a sua forma de crescimento. Desde sua descoberta o isolado vem se mantendo sem alterações há cerca quatro anos no nosso laboratório. Tais resultados nos levam a crer que este isolado atípico muito provavelmente é um mutante morfológico espontâneo estável da cepa virulenta Pb18.

Se relacionarmos as diferenças nos padrões de infecção com a morfologia apresentada pelo fungo pode-se supor que provavelmente a forma do fungo influencia no desenvolvimento da infecção pelo fungo.

A infecção causada pelo Pb18 provocou alterações no peso e nas características morfológicas dos órgãos semelhantes às relatadas anteriormente em trabalhos do nosso laboratório (BRITO, 2001; SOUTO, 2002; BRITO *et al.*, 2003). Naqueles estudos, a cepa virulenta Pb18 induziu atrofia tímica associada à hipertrofia do baço e fígado, além de várias alterações histológicas importantes nestes mesmos órgãos em camundongos BALB/c. Já os resultados obtidos com o isolado atípico Pb18UNICAMP mostram que esta amostra é capaz de induzir uma infecção mais branda, sem muitas das alterações relatadas para a cepa Pb18.

Alguns trabalhos já correlacionam a morfologia de fungos com a severidade da infecção. FÈ D'OSTIANI *et al.* (2000), estudando a relação entre células dendríticas e as formas de *Candida albicans*, mostraram que, dependendo da forma em que o fungo se apresentava, havia a indução de uma resposta protetora ou danosa para o indivíduo. Por exemplo, as leveduras da *C. albicans* estimularam células dendríticas a produzir

a IL12, uma citocina responsável pela diferenciação de resposta protetora do tipo Th1. Já hifas de *C. albicans* inibiram a produção de IL12 pela célula dendrítica, levando a síntese de IL4 e, conseqüentemente, à diferenciação de uma resposta do tipo Th2 relacionada ao desenvolvimento da doença.

No caso do *P. brasiliensis*, poucos relatos na literatura associam claramente a morfologia do fungo com a severidade da doença. BORBA e colaboradores (2005), estudando isolados mantidos *in vitro* desde 1925 e cultivados em meio submerso em óleo mineral, observaram desde a década de 40, que a inoculação intravenosa em camundongos BALB/c dessas amostras com alterações morfológicas não induzia lesões nos órgãos estudados e nem tão pouco esplenomegalia da mesma forma que as cepas típicas como a Pb18. Esses autores sugeriram que existe uma relação entre alterações morfológicas com a virulência do fungo.

Além da forma do fungo, um outro fator que pode, provavelmente, estar envolvido nas diferenças de infecção observadas neste trabalho é a composição da parede celular das duas amostras. A análise das proteínas de parede celular dos dois isolados mostrou que apenas a cepa Pb18 selvagem expressava proteínas com pesos moleculares de 32, 39, 50, 70, 90 kDa. Além disso, pôde-se notar que ambas expressavam uma proteína com peso molecular correspondente a gp43. Entretanto, o isolado Pb18UNICAMP apresentava uma menor expressão desta proteína quando comparado ao selvagem Pb18. Recentemente, GONZÁLEZ *et al.* (2005) purificaram e caracterizaram parcialmente uma proteína de 32 kDa presente tanto em leveduras como em micélios de *P. brasiliensis*. Neste estudo os autores mostraram que esta proteína não está associada a nenhum carboidrato não sendo, portanto, uma

glicoproteína. Além disso, a proteína foi capaz de interagir com diferentes proteínas componentes da matriz extracelular como a laminina, fibronectina e fibrinogênio, indicando uma possível participação da proteína de 32 kDa na aderência do fungo e, conseqüentemente, no desenvolvimento da doença.

Uma outra proteína importante do *P. brasiliensis*, que está ausente no Pb18UNICAMP, é a gp70, uma glicoproteína reconhecida por 96% dos soros de pacientes (MATTOS GROSSO *et al.*, 2003). BENARD e colaboradores (1997), estudando a reposta linfoproliferativa de linfócitos frente aos dois principais antígenos de *P. brasiliensis* (gp43 e gp70), mostraram que gp70 induz uma resposta linfoproliferativa fraca. Além disso, a gp70 inibe a fagocitose, induzida via receptor de manose e receptor de porção Fc de imunoglobulina (FcR), e diminui a liberação tanto de óxido nítrico (NO) como de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MATTOS GROSSO *et al.*, 2003).

Além das duas proteínas descritas acima, existe descrito na literatura uma outra proteína, a gp43, que é considerada como principal antígeno, reconhecido pela maior parte dos indivíduos com a paracoccidioidomicose (BLOTTA & CAMARGO, 1993), e um importante fator de virulência do *P. brasiliensis*. A gp 43 é uma glicoproteína que pode se apresentar de duas formas, ou como molécula de superfície celular ou como uma molécula liberada pelo fungo (PUCCIA *et al.*, 1986; PUCCIA *et al.*, 1991). Apesar do papel da gp43 não ser totalmente compreendido ela também é capaz de se ligar a laminina e parece ser importante para a adesão e invasão de células fúngicas em células hospedeiras (LOPES *et al.*, 1994; HANNA *et al.*, 2000). Além disso, esta molécula provavelmente funciona como um fator importante para evasão da resposta

imunológica do hospedeiro pelo *P. brasiliensis* como mostrado por FLÁVIA-POPI *et al.* (2002). Neste trabalho, os autores, através de ensaios utilizando gp43, macrófagos murinos peritoneais e o fungo, mostraram que esta glicoproteína, de forma semelhante a gp70, é capaz de inibir a fagocitose via receptor de manose e a liberação de NO por macrófagos estimulados. Recentemente, VIGNA *et al.* (2006) relataram a importância da gp43 para a formação do granuloma. Através de um modelo *in vitro*, desenvolvido pelo grupo, os autores sugerem que a gp43 possui um papel estimulatório importante para a formação do granuloma.

Além da baixa expressão de gp43 pelo Pb18UNICAMP, observada neste estudo, é interessante destacar que quando realizado o ensaio de *immunoblotting*, o *pool* de soro de pacientes não foi capaz de reconhecer a gp43 presente no isolado Pb18UNICAMP. Isto pode ter ocorrido, provavelmente, porque a gp43 expressa pelo mutante pode ser uma isoforma daquela encontrada no selvagem.

Desta maneira, podemos supor que a ausência ou alterações estruturais das proteínas, envolvidas na interação com células hospedeiras, poderiam ser responsáveis pela doença mais branda observada nos animais inoculados com o isolado atípico Pb18UNICAMP.

Além das proteínas presentes na parede celular do *P. brasiliensis*, há também açúcares envolvidos na virulência deste fungo. SAN-BLAS & SAN-BLAS (1977), estudando a estrutura da parede celular do *P. brasiliensis*, observaram que na forma micelial havia uma predominância de β -(1,3)-glucana enquanto que na forma de levedura o principal polissacarídeo presente na parede era a α -(1,3)-glucana. A β -(1,3)-glucana é capaz de estimular respostas inflamatórias em sítios de infecção, como por

exemplo, os pulmões (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002). Em humanos como também em modelos animais da infecção, infiltrados de células polimorfonucleares e mononucleares são usualmente encontradas em sítios inflamatórios iniciais e também em lesões granulomatosas crônicas. Além disso, β -(1,3)-glucana está envolvida no aumento de níveis séricos de TNF, sendo que cepas de baixa virulência, como o Pb265, induzem níveis maiores de TNF no soro do que cepas virulentas, como o Pb18 (HOGAN *et al.*, 1996). Já em relação à α -(1,3)- glucana, estudos usando diferentes isolados sugerem que esta molécula protege o fungo de enzimas digestivas presentes em macrófagos e outros leucócitos (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977). Ainda, SAN-BLAS (1982) sugeriu que fagócitos humanos poderiam produzir β -glucanase que seria capaz de digerir apenas a β -(1,3)-glucana presente na parede celular de formas miceliares. Desta forma, a transformação do fungo para a forma de levedura, no começo da infecção, poderia prevenir a ação de enzimas fagocíticas sobre o fungo, levando ao desenvolvimento da doença.

Apesar de não termos estudado a presença e nem as concentrações destes açúcares, podemos especular que o fato do isolado atípico se apresentar em uma forma intermediária entre micélio e levedura, a relação entre α -(1,3)-glucana e da β -(1,3)-glucana no Pb18UNICAMP pode ser diferente daquela observada no fungo selvagem Pb18. Assim, as diferenças na infecção causada por esses dois isolados observadas neste trabalho poderiam ser devidas à possíveis diferenças nos açúcares presentes nas paredes destas duas amostras. Estudos posteriores serão necessários para comprovar esta hipótese.

Um resultado interessante obtido no presente estudo foi à detecção do Pb18UNICAMP no timo. Em trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo, BRITO *et al.* (2003), estudando alterações histopatológicas no timo de camundongos BALB/c inoculados com Pb18, mostraram que o *P. brasiliensis* é capaz de invadir o microambiente tímico, induzindo severa atrofia caracterizada pela diminuição do peso do órgão, degeneração da região cortical, perda da delimitação corticomedular, aumento no número de histiócitos, além da presença de infiltrado polimorfonuclear na região subcapsular. A presença do fungo no timo foi detectada por longo período, sendo encontrado até os 60 dias de infecção. Neste estudo, observamos que o isolado atípico Pb18UNICAMP também foi capaz de invadir o timo de camundongos BALB/c. Mas, diferentemente do fungo selvagem, o Pb18UNICAMP foi detectado apenas até o 3º dia pós-inoculação. Além disso, a análise histopatológica do timo desses animais não mostrou as alterações observadas na infecção pelo Pb18.

A infecção tímica pelo Pb18UNICAMP, caracterizada pela a permanência reduzida do patógeno e ausência de alterações marcantes neste órgão, pode ter ocorrido por causa de uma resposta rápida e eficiente das células tímicas frente à invasão pelo fungo. Provavelmente, esta resposta foi possível porque o timo contém, além de timócitos e células estruturais, células importantes envolvidas na resposta imune, como os macrófagos e plasmócitos (SUSTER & ROSAI, 1990). Além disso, podemos presumir que a eliminação mais rápida e eficiente do isolado atípico ocorreu graças às alterações morfológicas e de componentes da sua parede celular.

Tudo isso nos leva a supor que a simples presença do fungo no timo não é responsável pela severidade do processo infeccioso. Entretanto, a sua longa

permanência nesse órgão pode ser fundamental para que o timo sofra alterações com perda de função. Neste sentido, BRITO (2005), avaliando a influência da virulência fúngica, da linhagem murina e de citocinas pró-inflamatórias na atrofia tímica observada durante a paracoccidiodomicose experimental, notou que leveduras da cepa Pb18 penetravam no timo em maior número e permaneciam por um período mais longo que a cepa Pb265, considerada de baixa virulência. A partir deste achado a autora sugere a existência de ligação entre a capacidade de invasão e permanência neste órgão com os mecanismos de virulência do fungo.

Um outro fato que chama a atenção na infecção causada pelo Pb18UNICAMP é a grande quantidade de neutrófilos presentes nas lesões dos animais inoculados com este isolado. Além da elevada quantidade de neutrófilos, observou-se também que as lesões causadas pelo isolado atípico se resolveram a partir do 28º dia de infecção. É bem documentado na literatura o papel importante dos neutrófilos na resolução de infecções fúngicas. No caso do *P. brasiliensis*, provavelmente, estas células ajudam a restringir a multiplicação do fungo, já que apresentam ação tanto fungicida quanto fungistática frente às leveduras do fungo (McEWEN *et al.*, 1987; KURITA *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2004).

Todas as diferenças observadas com relação à morfologia e ao desenvolvimento da infecção por ambas as cepas nos levou a crer que existiam também diferenças na resposta imunológica induzida pelos isolados. Entretanto, os resultados obtidos aqui não foram conclusivos. Isso pode ter ocorrido por vários motivos, sendo um deles a metodologia empregada na linfoproliferação e na estimulação das células para a dosagem de citocinas.

Muitos pesquisadores descrevem que estimulação de células com antígenos específicos do fungo, muitas vezes, leva a uma resposta insatisfatória, atrapalhando a determinação precisa do *status* imunológico do organismo estudado. MAMONI (2005) relata em seu trabalho que, como não foi possível obter resultados satisfatórios com a estimulação das células com antígeno específico, foi utilizado estímulos inespecíficos como Fitohemaglutinina (PHA), *Phorbol Meristate Acetate* (PMA) mais ionomicina (ionóforo de cálcio), Lipopolissacarídeo (LPS) e anti-CD3 mais anti-CD28 foram utilizados.

No presente estudo foi utilizado para os ensaios, de linfoproliferação e dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas, tanto o estímulo por antígeno específico (CFA) como estímulo inespecífico (ConA).

Na linfoproliferação, como mostrado nas figuras 24 e 25, independentemente do estímulo utilizado, os resultados foram inconclusivos e não mostraram diferenças entre os dois isolados. Entretanto, acreditávamos que mesmo sem diferenças na capacidade proliferativa poderia existir diferença no padrão de citocinas produzido pelos animais. Para tanto foram escolhidas as citocinas IFN γ e TNF, relacionados com uma resposta do tipo Th1, e IL4, que é uma das citocinas marcadoras da resposta do tipo Th2.

Em modelos experimentais da paracoccidiodomicose, o IFN γ e TNF, envolvidos em respostas celulares, desempenham um papel importante na ativação de macrófagos, na formação de granulomas, na diferenciação de células epitelióides e na síntese de NO, promovendo um aumento na função microbida dos macrófagos. Desta forma, estas citocinas possuem um papel importante na indução de resistência à infecção pelo *P. brasiliensis* (KARHAWI *et al.*, 2000; SOUTO *et al.*, 2000).

Contrariamente, a IL4, indutora e marcadora da resposta do tipo Th2, parece possuir uma função importante na gravidade da doença. PINA *et al.* (2004) mostraram que camundongos C57BL/6 deficientes em IL4 eram mais resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis* do que os sem deficiência, apresentando menor contagem fúngica pulmonar e hepática, diminuição na produção de citocinas do tipo Th2, aumento na produção de IFN γ e granulomas menores e melhor organizados.

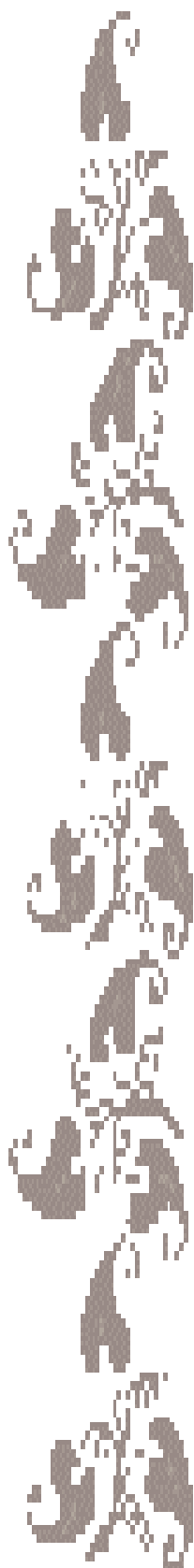
No presente estudo, a dosagem de citocinas no sobrenadantes de cultura de células de baço e timo mostrou resultados contraditórios quando comparávamos o tipo de estímulo utilizado. Essa contradição foi mais marcante na dosagem de TNF no sobrenadante de cultura de células do baço. Como mostrado na figura 29, quando estimuladas com o mitógeno ConA, as células do baço, de ambos os grupos de animais, produziram uma quantidade aumentada desta citocina seguida de uma diminuição da mesma. Já quando utilizado como estímulo o antígeno específico do fungo (CFA) notou-se um quadro inverso na cinética de produção do TNF, com diminuição seguida de aumento na produção desta citocina.

Além dos resultados contraditórios, é importante ressaltar que para um quadro mais claro sobre diferenças na indução da produção citocinas do tipo Th1 ou Th2, por infecções causadas pelo isolado atípico e seu selvagem, é necessário à detecção de um grupo maior de citocinas. As citocinas escolhidas aqui representam uma parte ínfima das citocinas produzidas durante uma resposta imune, não determinando completamente o padrão de resposta do tipo Th1 ou Th2.

Assim, os resultados aqui obtidos tanto para a linfoproliferação como para a dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura foram inconclusivos graças a

deficiências na metodologia empregada para a estimulação das culturas. Acreditamos que se utilizássemos, associado à cultura, células dendríticas ou mesmo outras células apresentadoras de antígenos (APCs), previamente estimuladas, poderíamos ter um sistema *in vitro* mais próximo do que ocorre *in vivo*. Além disso, outras metodologias, além do ELISA, devem ser empregadas para a obtenção de um resultado mais confiável.

Todos os resultados apresentados neste trabalho apontam para o surgimento de um mutante morfológico espontâneo estável da cepa virulenta Pb18, que possui diferenças marcantes tanto na morfologia como em proteínas da parede celular. Um melhor conhecimento das propriedades biológicas deste mutante é necessário ainda para sua total caracterização. Entretanto a sua importância não deve ser descartada, uma vez que, os mutantes funcionam como valiosas ferramentas para o estudo de muitos microrganismos e de suas relações com o hospedeiro com o objetivo de aumentar o conhecimento do desenvolvimento de muitas doenças.



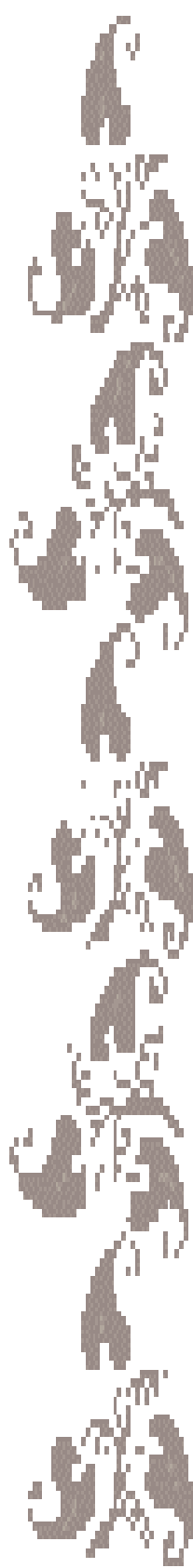
6. CONCLUSÕES

Como base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o isolado atípico é um mutante espontâneo estável uma vez que surgiu no laboratório sem tratamento químico ou físico pré-determinado e se mantém sem alterações por cerca quatro anos.

Com este trabalho, conclui-se também que as diferenças observadas nas infecções causadas tanto pelo isolado atípico assim como pelo seu selvagem podem ter ocorrido graças a diferenças importantes na expressão de proteínas envolvidas na adesão, invasão e desenvolvimento da paracoccidiodomicose, além das diferenças morfológicas detectadas entre as amostras.

Em relação à evolução da infecção causada pelo *P. brasiliensis* pode-se concluir que a resposta imune inata possui, realmente, um papel importante na paracoccidiodomicose, uma vez que nos animais com doença mais branda havia uma quantidade maior de neutrófilos nas lesões de disseminação. Além disso, as alterações observadas no timo não são causadas pela simples invasão do órgão pelo patógeno. Provavelmente, o tempo de permanência do fungo no timo deve contribuir para a ocorrência destas alterações já que a cepa selvagem permanece por um período maior no órgão.

Desta maneira, apesar dos resultados da avaliação da resposta imune adaptativa serem inconclusivos e de serem necessários ainda outros estudos para o completo conhecimento do isolado mutante Pb18UNICAMP, este pode ser uma ferramenta útil para o estudo da biologia do fungo e sua relação com o hospedeiro.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBORNOZ, M.C.B. 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, **9**: 248–252.
- BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.G.; THEODORO, R.C. & FRANCO, M. 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**. *In Press – Available on line at www.sciencedirect.com*
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO, Z.P.; GOMES, G.M.; FRANCO, M. & MONTENEGRO, M.R. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **58(4)**: 505-512.
- BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E.T. & DUARTE, A.J. 1997. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.** **175**:1263–1267.
- BLOTTA, M.H. & CAMARGO, Z.P. 1993. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, **31(3)**: 671-676.

- BORBA, C.M. & SCHÄFFER, G.M.V. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. **Mycoses**, **45**: 174-179.
- BORBA, C.M.; VINHAS, E.A.; LOPES-BEZERRA, L.M. & LUCENA-SILVA, N. 2005. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Antonie Van Leeuwenhoek**, **88(3-4)**: 257-266.
- BORGES-WALMSLEY, I.; CHEN, D.; SHU, X. & WALMSLEY, A.R. 2002. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, **10(2)**: 80-87.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254.
- BRITO, V.N. 2001. Estudo imunopatológico seqüencial dos órgãos linfóides primários de camundongos BALB/c inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis*. Campinas [Tese de mestrado – Universidade Estadual de Campinas].
- BRITO, V.N. 2005. Atrofia tímica na paracoccidioidomicose experimental: influência da virulência fúngica, da linhagem murina e de citocinas pró-inflamatórias. Campinas [Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas].

- BRITO, V.N.; SOUTO, P.C.S.; CRUZ-HOFLING, M.A.; RICCI, L.C. & VERINAUD, L. 2003. Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. **Med. Mycol.**, **41(2)**: 83-87.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E. & RESTREPO, A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6(2)**: 89-117.
- BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; HANSON, L.H. & STEVENS, D.A. 1990. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. **Mycopathologia**, **109**: 13–17.
- BURGER, E.; MIYAJI, M.; SANO, A.; CALICH, V.L.G.; NISHIMURA, K. & LENZI, H.L. 1996. Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**: 235-242.
- CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, M.; SIQUEIRA, A.M. & BURGER, E. 1985. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, **66**: 585-594.
- CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. & BURGER, E. 1998. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, **149**: 407-417.

CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G. & TRAVASSOS, L.R. 1991.

The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests.

J. Med. Vet. Mycol., **29(1)**: 31-38.

CASTANEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D. & STEVENS, D.A. 1987. Chronic

pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity. **J. Med. Vet. Mycol.**, **25**: 377–387.

COELHO, K.I.R.; DeFAVERI, J.; IWASSO, M.T.R.; PERAÇOLI, M.T. & MOTA, N.G.S.

Paracoccidioidomycose experimental. *In*: **DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S. &**

FIORILLO. 1982. Paracoccidioidomycose. Savier-Edusp, São Paulo, 69-84.

DIAS, M.F.R.G.; FILGUEIRA, A.L. & SOUZA, W. 2004. A Morphological and

cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. **Microsc. Microanal.**, **10**: 215–223.

FÈ D'OSTIANI, C.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, A.;

MENCACCI, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. & ROMANI, L. 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*.

Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. **J. Exp.**

Med., **191(10)**: 1661-1674.

- FLAVIA-POPI, A.F.; LOPES, J.D. & MARIANO, M. 2002. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immunol.**, **218(1-2)**: 87-94.
- FRANCO, M. 1986. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, **25**: 5-18.
- FRANCO, M.; MENDES, R.P. & MOSCADI-BACCHI, M. 1989. Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clin. Trop. Med. Comm. Dis.**, **4(1)**: 185-220.
- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L. & MOTA, N.G.S. 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **20**: 129-132.
- GARCIA, N.M.; DEL NEGRO G.M.; HEINS-VACCARI E.M.; MELO N.T.; ASSIS C.M. & LACAZ C.S. 1993. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **35(3)**: 227-235.
- GOLDANI, L.Z. & SUGAR A.M. 1995. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. **Clin. Infect. Dis.**, **21(5)**: 1275-1281.

- GONZALEZ, A.; GOMEZ, B.L.; DIEZ, S.; HERNANDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A.J. & CANO, L.E. 2005. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, **73(4)**: 2486-2495.
- GREER, D.L. & RESTREPO, A. 1977. La epidemiologia de la paracoccidioidomicosis. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, **83**: 428-445.
- GROSE, E. & TAMSITT, J.R. 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, **4(2)**: 124-125.
- HAHN, R.C.; MACEDO, A.M.; SANTOS, N.L.; RESENDE, J.C. & HAMDAN, J.S. 2002. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Rev. Iberoam. Micol.**, **19(1)**: 49-51.
- HALLAK, J.; SAN-BLAS, F. & SAN-BLAS, B. 1982. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, **20**: 51-62.
- HANNA, S.A.; MONTEIRO DA SILVA, J.L. & GIANNINI, M.J. 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect.**, **2(8)**: 877-884.

- HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S. & LEVITZ, S.M. 1996. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, **9(4)**: 469–488.
- KANETSUNA, F. 1981. Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. **Sabouraudia**, **19**: 275–286.
- KARHAWI, A.S.; COLOMBO, A.L. & SALOMAO, R. 2000. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.**, **38(3)**: 225-229.
- KASHINO, S.S.; SINGER-VERMES, L.M.; CALICH, V.L. & BURGER, E. 1990. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its in vitro growth. **Mycopathologia**, **111**: 173–180.
- KERR, I.B.; ARARIPE, J.R. & OLIVEIRA, P.C. 1988. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **30**: 336-350.
- KURITA, N.; OARADA, M.; ITO, E. & MIYAJI, M. 1999. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, **37(4)**: 261-267.

- LACAZ, C.S. 1949. Novos dados em relação a blastomicose sul americana e seu agente etiológico. **Rev. Med. Cir. S. Paulo**, **9**: 303-340.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227(5259)**: 680-685.
- LECLERC, M.C.; PHILIPPE, H. & GUEHO, E. 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J. Med. Vet. Mycol.**, **32(5)**: 331-341.
- LONDERO, A.T. & MELO, I.S. 1983. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. **Mycopathologia**, **82**: 49-55.
- LONDERO, A.T. & RAMOS, C.D. 1990. Paracoccidioidomycose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **J. Pneumol. (Brazil)**, **16**: 129-132.
- LOPES, J.D.; MOURA-CAMPOS, M.C.; VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; DE-SOUZA, W. & CAMARGO, Z.P. 1994. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **27(9)**: 2309-2313.

- LUTZ, A. 1908. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição do conhecimento da hyphoblastomycoses americanas. **Braz-Med.**, **22**: 121-124.
- MAMONI, R.L. 2005. Caracterização da paracoccidioidomicose-infecção como a forma de resistência da paracoccidioidomicose humana: comparação com as formas juvenil e adulta da doença. Campinas [Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas].
- MARQUES, S.A.; FRANCO, M.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.A.; BACCILI, C.; CURCELLI, E.D.; FERACIN, A.C.M.; OLIVEIRA, C.S.; TAGLIARINI, J.V. & DILLON, N.L. 1983. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **25**: 87-92.
- MATTOS GROSSO, D.; ALMEIDA, S.R.; MARIANO, M. & LOPES, J.D. 2003. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect. Immun.**, **71(11)**: 6534-6542.
- McEWEN, J.G.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A. & RESTREPO, A. 1987. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **36(3)**: 603-608.

- MEDINA, H. & BODZIAK-JUNIOR, C. 1949. Contribuição ao ciclo extraparasitário do *Paracoccidioides brasiliensis* II. Cultura do *P. brasiliensis* em terra e influência exercida pelo pH. **Arg. Biol. Tecnol.**, **4**: 3-8.
- MENDES DA SILVA, A.M.; BORBA, C.M. & OLIVEIRA, P.C. 1994. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, **37(5-6)**: 165-169.
- MONTENEGRO, J. 1927. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. **Brazil-med.**, **41**: 808-812.
- MOSCARDI, M. & FRANCO, M.F. 1980. Experimental paracoccidioidomycosis in mice. I. Immunopathological aspects of intraperitoneal infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **22(6)**: 286-293.
- NEGRONI, P. 1966. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Prensa. Med. Argent.**, **53(39)**: 2381-2382.
- PERAÇOLI, M.T.S. 1978. Paracoccidioidomycose experimental do hamster. Estudo da imunidade celular e humoral e correlação com a morfologia das lesões. São Paulo [Tese de Mestrado – Escola Paulista de Medicina].

- PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.I.W.; VAZ, C.A.C.; KELLER, A.C. & CALICH, V.L. 2004. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect. Immun.**, **72**: 2369–2378.
- PUCCIA, R. & TRAVASSOS, L.R. 1991. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, **289**: 298–302.
- PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A. & TRAVASSOS, L.R. 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, **53**: 199–206.
- RESTREPO, A. 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, **23(5)**: 323-334.
- RESTREPO, A.; McEWEN, J.G. & CASTANEDA, E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, **39(3)**: 233-241.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D. & STEVENS, D.A. 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the

fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, **46(2)**: 346-353.

ROBLEBO, M.A.; GRAYBILL, J.R.; AHRENS, J.; RESTREPO, A.; DRUTZ, D.J. & ROBLEBO, M. 1982. Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **125**: 583-567.

ROONEY, P.J. & KLEIN, B.S. 2002. Linking fungal morphogenesis with virulence. **Cell. Microbiol.**, **4(3)**: 127–137.

SAN-BLAS, F. & CENTENO, S. 1977. Isolation and preliminary characterization of auxotrophic and morphological mutants of the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, **129(1)**: 138-144.

SAN-BLAS, F. & SAN-BLAS, G. 1992. Mutants of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 affected in dimorphism. **J. Med. Vet. Mycol.**, **30**: 51-60.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; HALLAK, J. & MERINO, E. 1983. Ultrastructure and cell wall chemistry of a thermosensitive mutant of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Curr. Microbiol.** **8**: 85-88.

SAN-BLAS, G. & SAN-BLAS, F. 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. **Mycopathologia**, **62**: 77-86.

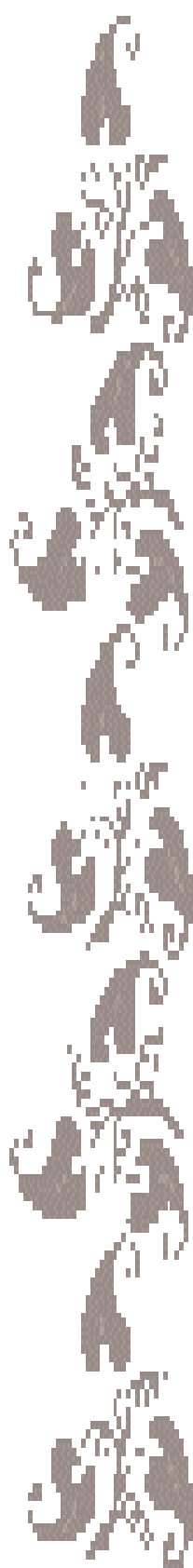
- SAN-BLAS, G. & SAN-BLAS, F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. *In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. & DEL NEGRO, A. eds. 1994. Paracoccidioidomycosis*. Ed. Boca Raton, Florida, CRC Press. 49–66.
- SAN-BLAS, G. 1982. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. **Mycopathologia**, **79**: 159-184.
- SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G. & ITURRIAGA, T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, **40**: 225–242.
- SANO, A.; NOBUYUKI, K.; IABUKI, K.; COELHO, R.; TAKEO, K; NISHIMURA, K. & MIYAJI, M. 1993. A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathology**, **124**: 157-161.
- SILVA, C.L.; ALVES, L.M. & FIGUEIREDO, F. 1994. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiol.**, **140**: 1189–1194.
- SILVA, M.R.; MARQUES, A.S. & CAMPOS, D.S. 1981. Imunologia na paracoccidioidomicose. **An. Bras. Dermatol.**, **56(4)**: 227-234.

- SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; MAFFEI, C.M. & CHADU, J.B. 2000. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, **38(3)**: 193-199.
- SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G. & LEITE MAFFEI, C.M. 1998. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, **36(1)**: 37-42.
- SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; MENDES-GIANINNI, M.J.S. & CALICH, V.L.G. 1989. Evaluation of the pathogenicity and imunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, **27**: 71-82.
- SINGER-VERMES, L.M.; CALDEIRA, C.B.; BURGER, E. & CALICH, V.L.G. 1993. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of infection, humoral and cellular responses. **Clin. Exp. Immunol.**, **94**: 75-79.
- SINGER-VERMES, L.M.; CIAVAGLIA, M.C.; KASHINO, S.S.; BURGER, E. & CALICH, V.L. 1992. The source of the growth-promoting factor(s) affect the plating efficiency of *P. brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, **30**: 261-264.

- SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A. & SILVA, J.S. 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, **156(5)**: 1811-1820.
- SOUTO, P.C.S. 2002. Analise ultra-estrutural de órgãos linfóides primários de camundongos BALB/c inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis*. Campinas [Tese de mestrado – Universidade Estadual de Campinas].
- TREXLER, P.C. 1959. The use of plastic in the design of an isolator system. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **78**: 29-36.
- VIGNA, A.F.; ALMEIDA, S.R.; XANDER, P.; FREYMULLER, E.; MARIANO, M. & LOPES, J.D. 2006. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. **Microbes Infect.**, **8(3)**: 589-597.
- VILLAR, L.A.; SALAZAR, M.E. & RESTREPO, A. 1988. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. **J. Med. Vet. Mycol.**, **26**: 269-276.
- WANKE, B. & LONDERO, A., Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. **In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. & DEL NEGRO, G.**

1994. *Paracoccidioidomycosis*. Ed. Boca Raton, Florida, CRC Press, 109-120.

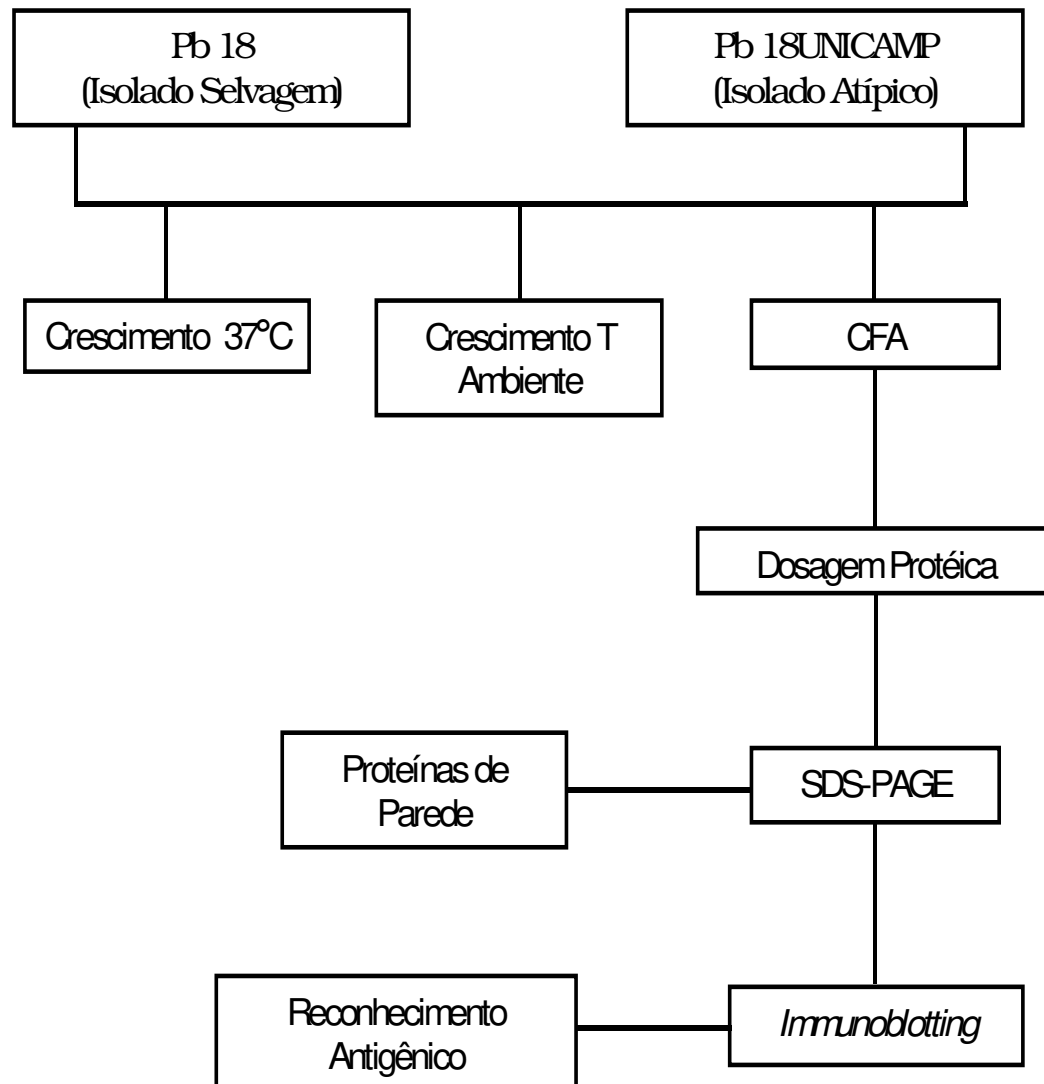
ZACHARIAS, D.; UEDA, A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M. & SAN-BLAS, G. 1986. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **J. Med. Vet. Mycol.**, **24**: 445–454.



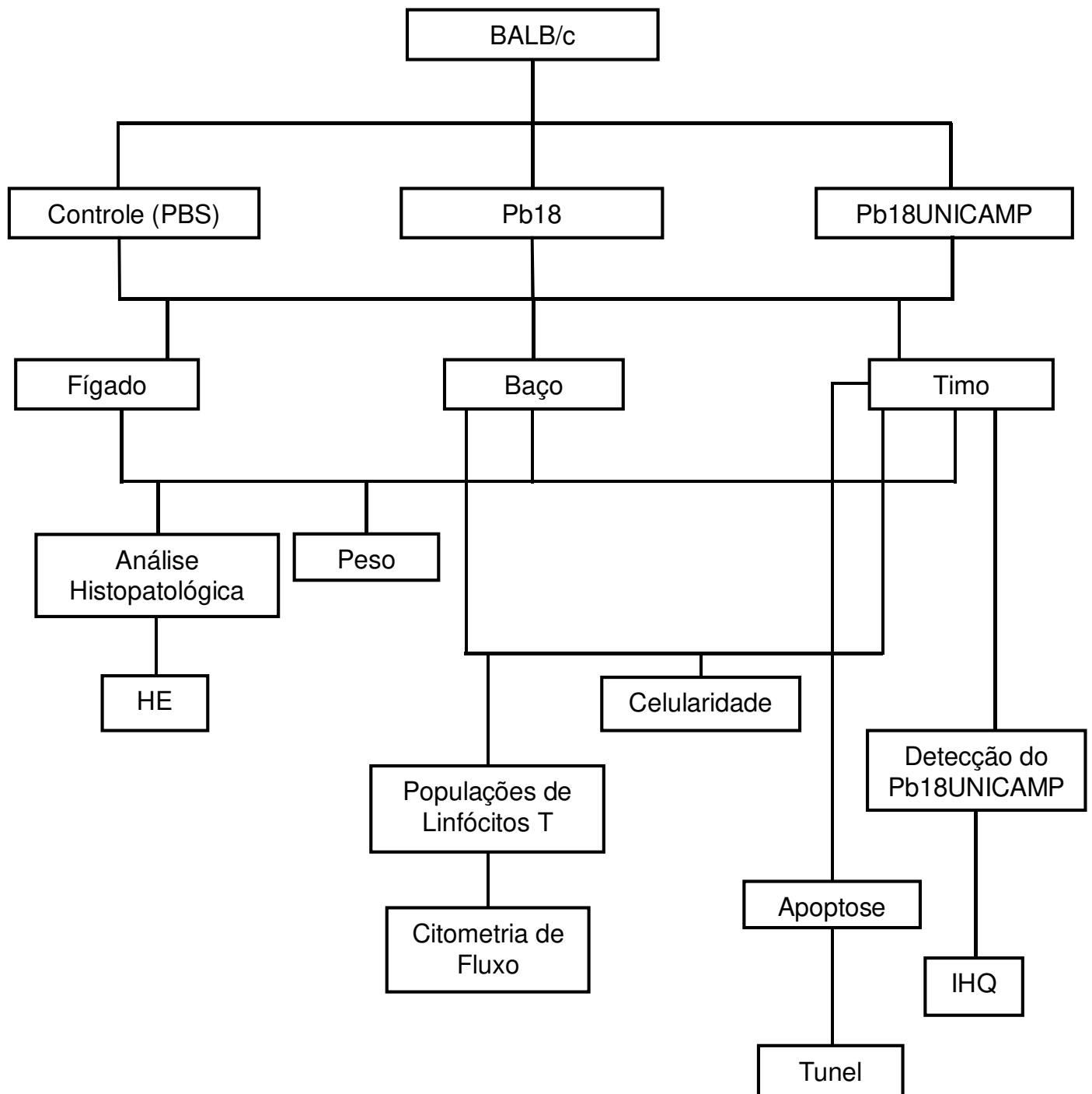
ANEXOS

ANEXO 1 – FLUXOGRAMAS EXPERIMENTAIS

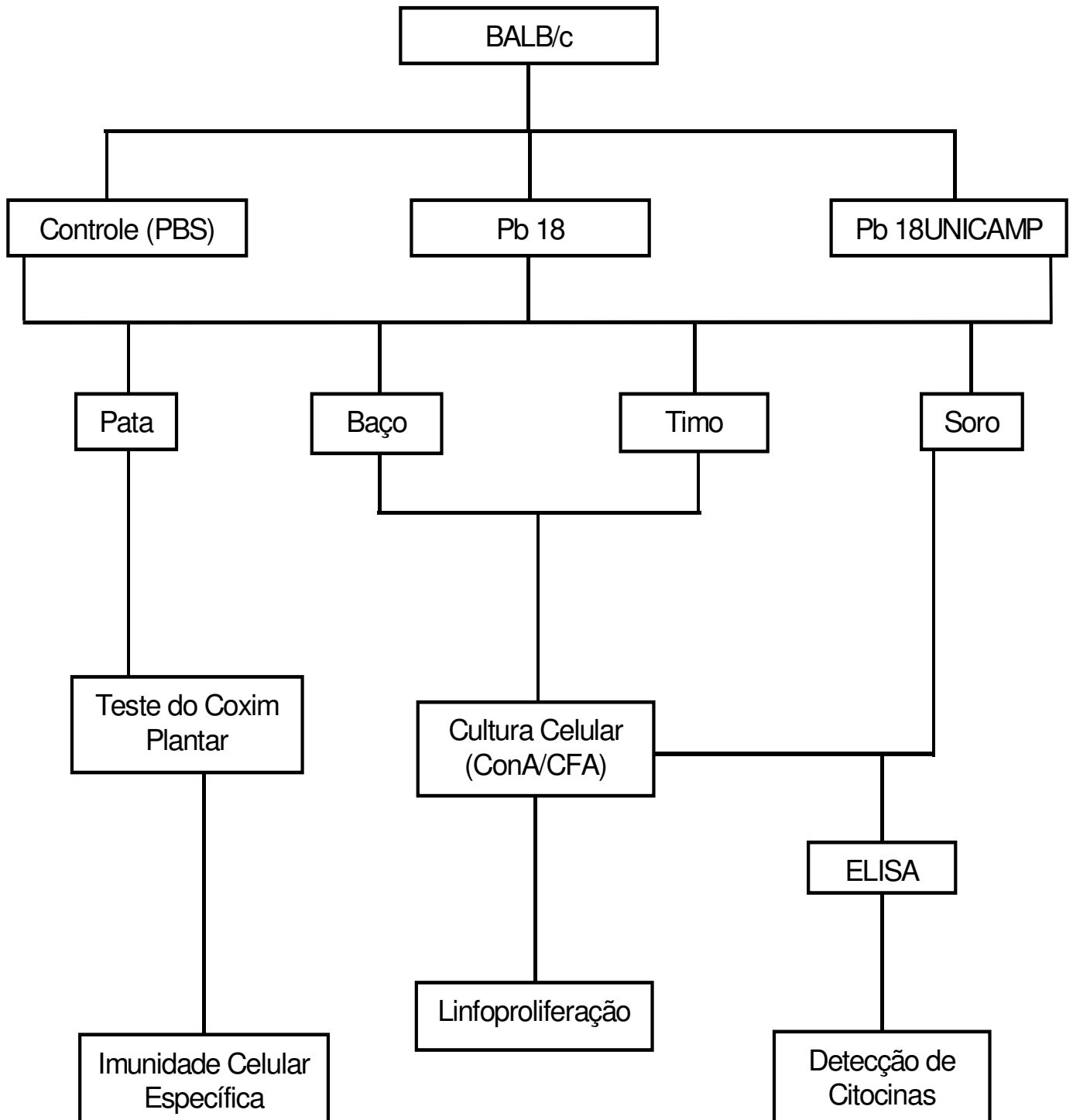
1. Comparação morfológica e protéica dos dois isolados:



2. Estudo comparativo da infecção:



3. Avaliação imunológica:



ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO 1

Paula C. S. Souto · Vânia N. Brito
Jacy Gameiro · Maria Alice da Cruz-Höfling
Liana Verinaud

Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis

Received: 2 December 2002 / Published online: 8 April 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract Many works have shown that immunosuppressive effects induced by systemic mycosis can be related to primary lymphoid organ damage. Previous studies in our laboratory showed that *Paracoccidioides brasiliensis* was able to invade the thymus, inducing a severe atrophy with significant reduction of cortical area along with a loss of cortico-medullary boundary. The objective of the present study was to investigate whether thymic atrophy is caused by programmed cell death (PCD) and to examine the ultrastructural characteristics of the thymus in experimentally infected BALB/c mice. The results revealed an eightfold increase in the apoptotic index occurring by day 5 post infection, i.e., during early stages of the infection, shown by immunohistochemistry. In addition, typical cell alterations of autophagic PCD were observed by transmission electron microscopy. Taken together, these results reinforce the idea that thymic alterations may be involved in the immunosuppressive phenomenon frequently associated with paracoccidioidomycotic infection.

Keywords *Paracoccidioides brasiliensis* · Thymus · TUNEL · Electron microscopy · Programmed cell death

P. C. S. Souto (✉) · V. N. Brito · J. Gameiro · L. Verinaud
Departamento de Microbiologia e Imunologia,
Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Cidade Universitária Zeferino Vaz s.n.,
Caixa Postal 6109,
13083-970 Campinas-SP, Brazil
E-mail: souto@unicamp.br
Tel.: + 55-19-37886255
Fax: + 55-19-37886276

M. A. da Cruz-Höfling
Departamento de Histologia e Embriologia,
Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Campinas-SP, Brazil

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM), a disease caused by the thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is the most prevalent systemic mycosis in Brazil [4, 9]. The cellular immune response is considered the main mechanism of defense, but frequently a depression in this branch of the response is associated with disseminated forms of this disease [6, 18, 21, 22]. Several mechanisms have been pointed out as responsible for this immunodepression: impaired antigen presentation and reduction of the T cells function [25]; presence of suppressor cells [12]; a predominant Th2 response [2]; and the tropism of this fungus for the lymphoid organs [8].

Considering that the thymus is the locus of development and maturation of T lymphocytes, the cells responsible for control of the immune response, it is plausible to assume that an impaired function of this organ could contribute to the immunosuppression phenomenon. Previous work in our laboratory has shown that a severe atrophy occurs in the thymus, mainly in the acute phase of the *P. brasiliensis* infection [3]. In the present study, we investigated the occurrence of programmed cell death (PCD) and other cellular alterations in thymus from experimentally infected mice, to determine the significance of thymus atrophy and the immunosuppression phenomenon frequently reported in PCM.

Materials and methods

Fungus

The virulent isolate Pb18 of *P. brasiliensis* was used in this study. It was maintained at 36°C in its yeast phase in Fava Netto's medium and used on day 7 of growth culture.

Animals

Eighty-four specific pathogen-free BALB/c male mice, 6–8 week-old, obtained from Centro Multi-Institucional de Biotério (UNICAMP)'s breeding colony were used. Animals were

maintained in plastic isolators under aseptic conditions throughout the study. Sterile water and feed were provided ad libitum. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care (COBEA).

Infection of mice

P. brasiliensis yeasts from 7-day cultures were collected. The fungal mass was suspended in phosphate-buffered saline (PBS), mixed twice for 10 s on a Vortex-mixer, centrifuged and double-washed in PBS. The concentration was adjusted to 1×10^7 yeast cells based on hemocytometer counts. Viability was determined by lactophenol cotton blue staining [19] and was higher than 90%. Mice were injected intraperitoneally with 5×10^6 yeasts of *P. brasiliensis* in 0.5 ml of PBS ($n = 4$ per period) or with PBS alone (control groups, $n = 3$ per period) and killed at 1, 3, 5, 7, 14 or 28 days after the inoculation.

Experimental design

Control and infected mice were killed by cervical dislocation at the end of each experimental period. Thymuses were collected, fixed in 10% buffered formalin for 24 h, routinely processed, and embedded in Histosec (Merek, Darmstadt, Germany). Sections (4 μ m) were used for staining with TdT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling (TUNEL) for apoptosis detection. For electron microscopy studies, immediately before the sacrifice, the animals were perfused with PBS followed by a fixative mixture containing 2% paraformaldehyde plus 1.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. Thymuses were then removed and processed for analysis by scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy.

TUNEL staining

The labeling of the DNA breaks in situ were performed using the in situ cell death detection kit (POD; Boehringer Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Sections were counterstained with methyl green and examined by light microscopy.

A semiquantitative analysis of the number of apoptotic nuclei was provided by two independent observers for control and infected mice (counting six or eight sections, respectively, for each experimental period). The number of apoptotic cells was counted in ten random fields in these sections and compared between control and infected mice.

Transmission electron microscopy

The right lobes of the thymuses were cut into small blocks and fixed by immersion for 24 h in the same fixative solution used to perfusion. After that, the material was postfixed in 1% osmium tetroxide for 2 h, washed, dehydrated in a graded ethanol series and propylene oxide, and embedded in resin (Epon 812). Areas of interest were selected from toluidine blue-stained semithin sections. Ultrathin sections were cut with a diamond knife on an ultramicrotome, mounted in slot grids, covered with Formvar and double stained in uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined in a LEO 906 transmission electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) operated at 60 kV.

Scanning electron microscopy

The left lobes of the thymuses were fixed as for TEM. After dehydration in a graded ethanol series and critical point-drying using liquid CO_2 , all specimens were sputtered coated with gold-palladium and examined in a JEOL 5800 LV scanning electron microscopy, with an accelerating voltage of 10 kV.

Results

Analysis by SEM showed the presence of *P. brasiliensis* as spherical multiple-budding yeasts cells, which clearly demonstrates fungal viability, located in the medullary region during all experimental periods. Differences in the size of the fungal cells were common, with their diameter ranging from 5 μ m to 30 μ m (Fig. 1). Yeast cells were mainly seen in the medullary sinus, apparently more associated to stromal cells. However, displacement of the fungus caused artificially during the preparation of the SEM samples may have interfered with the real relationship established among yeast cells, other thymic cells and the surroundings. Nevertheless, alterations in the 3D structure of the thymic parenchyma was not seen.

In infected mice, analysis using the TUNEL technique showed a strong positive reaction throughout the cortical area, which was higher than that found in control non-infected mice. Augmented PCD in this region was detected at 1 day post infection (p.i.) as a mild reaction, which gradually grew to peak by day 5 (Fig. 2), after which a gradual restoration to control PCD levels were observed until day 28 p.i. The apoptotic cell count at 5 day p.i. indicated that their number was eightfold higher than in controls.

In parallel, during all experimental periods, ultrastructural alterations related to cell death such as detachment of the nuclear envelope, abnormal condensation of nuclear chromatin, nuclear fragmentations and cytoplasmic electron lucency (Fig. 3A), were detected. Moreover, during the first 24 h p.i., there was an increase in the number of mitochondria both in stromal cells and thymocytes that, from 3 days p.i., presented degeneration features such as swelling and disappearance of well-defined mitochondrial cristae (Fig. 3B).

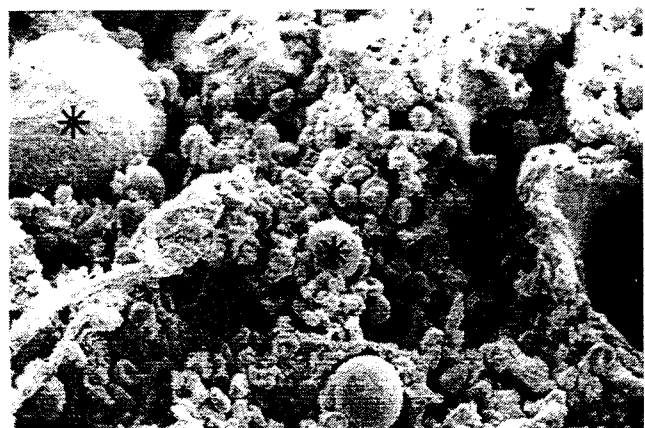


Fig. 1 Scanning electron micrograph of thymus from *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice; 24 h p.i. Note the presence of fungus (asterisks) in the medullary region. Bar 5 μ m

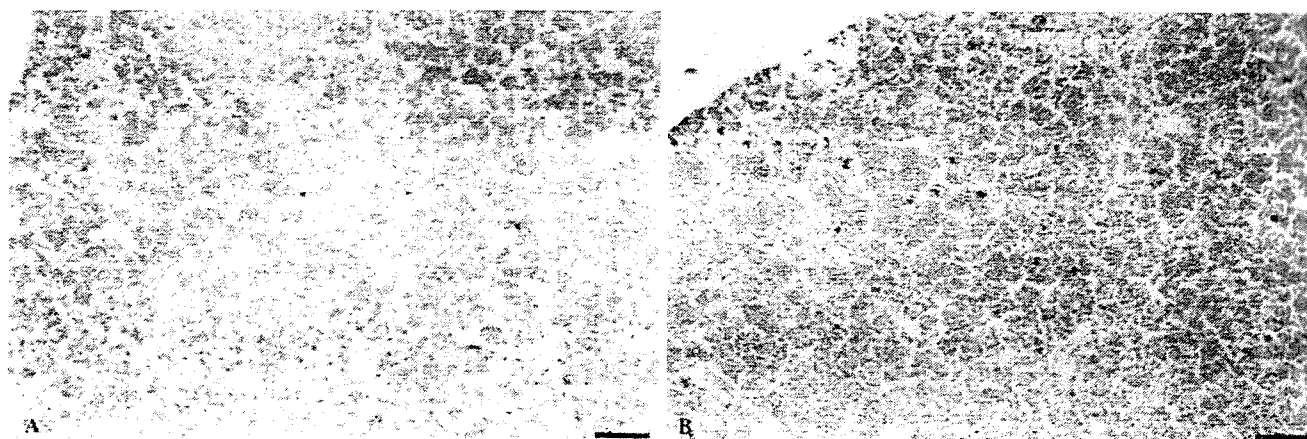
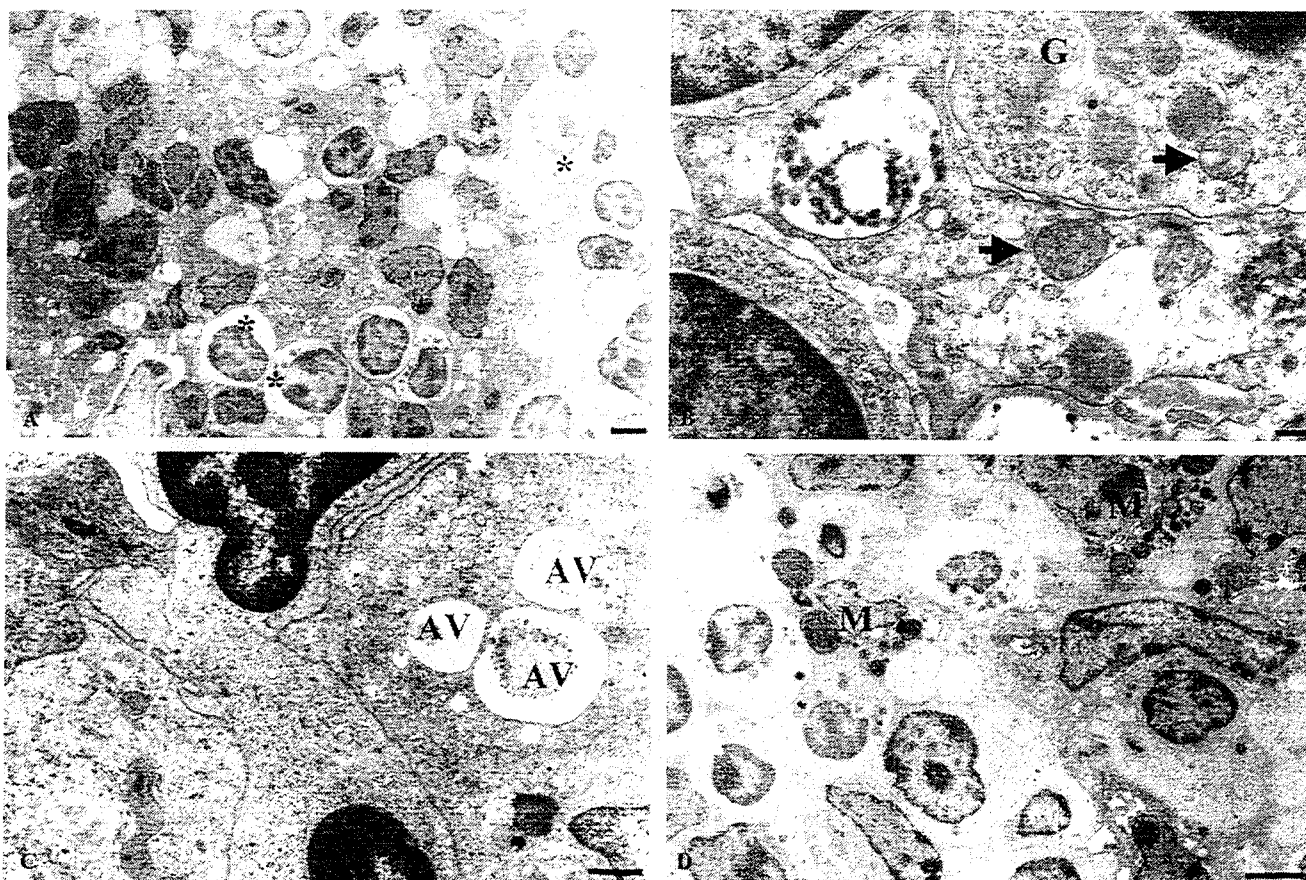


Fig. 2 TUNEL technique performed on the thymus. An increase in the apoptotic index was observed, followed by a reduction in this index from 7 days p.i. **A** Control group. **B** infected group; 24 h p.i. Bar 50 μ m

Fig. 3 Transmission electron micrographs of thymus from *P. brasiliensis*-infected mice. **A** At 14 days p.i., cell presenting cytoplasmic clarification is seen (asterisks). **B** At 3 days p.i., mitochondria showing degeneration features (arrows) and degraded Golgi apparatus (G) are seen. **C** At 24 h p.i., autophagic vacuoles (AV) are observed. **D** At 14 days p.i., macrophage (M) filled with dense debris are seen. Bars **A**, **B**, **D** 5 μ m; **C** 1 μ m



Another ultrastructural alteration observed in stromal cells was related to the Golgi apparatus. This organelle showed, as early as 24 h p.i., characteristics of degradation. In addition, at same period, the presence of many polyribosomes were observed (Fig. 3B).

We also noted the occurrence of autophagic vacuoles, mainly from 24 h to 7 days p.i., in all thymic stroma (Fig. 3C). In addition, the presence of a great number of macrophages filled with dense debris was observed, chiefly in medullary area, at each experimental period (Fig. 3D).

Discussion

The thymus is a central lymphoid organ, where T lymphocytes precursors mature, differentiate and generate most of the so-called T cell repertoire, which drives all immune response against invading agents. During T lymphocyte maturation, a large number of these cells die by a process known as apoptosis. Apoptosis is a morphologically and biochemically distinct form of cell death that occurs in embryogenesis, metamorphosis, tissue atrophy, and tumor regression. It may play a role in tissue adaptation and in selective deletion of a cell [13]. Because of this apoptotic death, the thymus shows a massive apoptotic rate eliminating most newly formed lymphocytes even under physiological conditions.

Here, we observed that, during experimental PCM, there is a considerable increase (eightfold by day 5 p.i.) in the apoptotic rate in the thymus as demonstrated by TUNEL. However, we do not believe that this increase in thymic apoptosis is sufficient to explain the severe atrophy and profound structural disorganization reported previously by our group in the thymus of experimentally infected animals [3].

According to Clarke [7], there are three types of PCD: (1) apoptosis, with condensation and fragmentation of the nucleus; (2) autophagic cell death, with abundant autophagic vacuoles and (3) non-lysosomal disintegration, characterized by presence of empty spaces formed by dilation of organelles. In the present study, several types of cellular alterations, such as swelling of mitochondria and ill definition of mitochondrial cristae, degradation of the Golgi apparatus, and occurrence of autophagic vacuole, were observed. This pattern of cell degradation suggests that another mechanism of cell death, distinct from apoptosis, may be triggered by the fungal presence in the thymic milieu, possibly autophagic cell death. We believe that both types of PCD could be responsible by the dramatic damage seen in our experimental model. The occurrence of autophagic cell death in parallel with apoptosis has been described previously by Knaapen et al. [14] in heart failure.

The presence of multi-budded *P. brasiliensis* yeast cells in thymus indicates not only the viability of the fungus in the thymic microenvironment, but also strongly suggests a direct action of the pathogen on this lymphoid organ. A direct action of pathogens on the thymus has been described using different experimental models [17, 20]. Alvarez et al. [1], working with *Saprolegnia* sp, a fungus that causes a natural mycosis on salmonids and other fish species, observed that histopathological alterations were increased when yeasts invaded the thymus. Furthermore, studies with *Cryptococcus neoformans*-infected mice correlated the presence of fungus in the thymus with some structural alterations in the organ [23].

In addition, release of toxic substances by *P. brasiliensis* that are capable of modifying the physiology of the thymus could be involved in the atrophy, as observed in

other fungal infections. Sutton et al. [24] observed that injection of mice with gliotoxin, a metabolite produced during certain infection by fungal pathogens, most notably *Aspergillus fumigatus*, induced apoptosis in cells of immune system in thymus and other lymphoid organs. These authors suggested that gliotoxin had an immunosuppressive activity and could play a significant role in the pathogenesis of aspergillosis. Toxin T-2, synthesized by *Fusarium* sp and other fungi, produces immunosuppressive effects, inducing pronounced thymic atrophy and decreased numbers of T lymphocytes [10].

Recently, it has been shown that peripheral T lymphocytes of patients with PCM stimulated with the main antigen of *P. brasiliensis* (gp43) exhibited high levels of apoptosis, in comparison to cells of control unaffected patients [5]. We now provide further evidence that the fungus strategy in enhancing apoptosis could account for the cortical thymus atrophy reported before [3], and be a relevant factor in the virulent fungus activity.

On the other hand, an indirect action of fungus cannot be excluded. It is possible that the infection induces the production of pro-apoptotic cytokines like tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1, granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and nitric oxide. Some reports show that TNF- α , produced by macrophages, is associated with thymic PCD and is directly implicated in death of thymic cells when mycobacterial cord factor is inoculated in experimental mice [11, 15, 16].

The results presented here suggest that thymic atrophy previously observed in our laboratory is probably related with two kinds of PCD. In this way, it is reasonable to assume that PCD in thymus can be related to the immunosuppression observed during PCM and contributes to the pathogenesis in the early stages of this infection. More studies are necessary to understand the precise mechanisms involved in the thymic atrophy, and to explain the relationship between this process and the dynamics of the fungus-immunosuppression disease.

Acknowledgements The authors wish to thank Prof. Áureo Tatsumi Yamada for his generous support throughout this study. This work was supported by grants from Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da Unicamp (FAEP UNICAMP 0682/00) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 98/09660-1; 00/00996-9).

References

1. Alvarez F, Vellena A, Zapata A, Razquim B (1995) Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L. Vet Immunol Immunopathol 47:163-172
2. Benard G, Mendes-Giannini MJS, Juvenali M, Miranda ET, Duarte AJS (1997) Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. J Infect Dis 175:1263-1267
3. Brito VN, Souto PCS, Cruz-Höfling MA, Ricci LC, Verinaud L (2002) Thymic invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB-c mice. Med Mycol 41:1-5

4. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6:89-117
5. Cacere CR, Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G (2002) The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol* 105:215-222
6. Castaneda E, Brummer E, Pappagianis D, Stevens DA (1988) Impairment of cellular but not humoral responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. *Infect Immun* 56:1771-1777
7. Clarke, PGH (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181:195-213
8. Franco M, Mendes RP, Moscadi-Bacchi M (1989) Paracoccidioidomycosis. *Baillière's Clin Trop Med Comm Dis* 4:185-220
9. Goldani LZ, Sugar AM (1995) Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clin Infect Dis* 21:1275-1281
10. Islam Z, Masahiro N, Yoshizawa T, Yamauchi K, Sakato N (1998) T-2 toxin induces thymic apoptosis in vivo in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 148:205-214
11. Isogai E, Isogai H, Kimura K, Fujii N, Takagi S, Hirose K, Hayashi M (1996) In vivo induction of apoptosis and immune response in mice by administration of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 64:1461-1466
12. Jimenez-Finkel BE, Murphy JW (1988) Characterization of efferent T suppressor cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis*-specific afferent T suppressor cells. *Infect Immun* 56:744-750
13. Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ (1987) Apoptosis. In: Potten CS (ed) *Perspectives on mammalian cell death*. Oxford University Press, New York, pp 93-128
14. Knaapen MWM, Davies MJ, De Bie M, Haven AJ, Martinet W, Kockx MM (2001) Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 51:304-312
15. Ozeki Y, Kaneda K, Fujiwara N, Morimoto M, Oka S, Yano I (1997) In vivo induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate). *Infect Immun* 65:1793-1799
16. Patiño JAG, Ivanov VN, Lacy E, Elkon KB, Marino MW, Nikolic-Zugic J (2000) TNF- α is the critical mediator of the cyclic AMP-induced apoptosis of CD8⁺4⁺ double-positive thymocytes. *J Immunol* 164:1689-1694
17. Price P, Olver SD, Gibbons AE, Teo HK, Shellam GR (1993) Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol* 71:155-165
18. Roblebo MA, Graybill JR, Ahrens J, Restrepo A, Drutz DJ, Roblebo M (1982) Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. *Am Rev Respir Dis* 125:583-567
19. Sano A, Nobuyuki K, Iabuki K (1993) A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *P. brasiliensis*. *Mycopathologia* 124:157-161
20. Savino W, Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dardenne M (1989) Studies on thymus in Chagas' disease I. Changes in the thymus microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol* 19:1727-1733
21. Silva MR, Marques AS, Campos DS, Taboada DC, Soares GH, Brascher HM, Vargens-Neto JR, Cruz MQ, Labarther NV, Rocha GL, Lima AO (1981) Imunologia na paracoccidioidomycose. *An Bras Dermatol* 56:227-234
22. Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich VLG (1993) Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of infection, humoral and cellular responses. *Clin Exp Immunol* 94:75-79
23. Sotomayor CE, Rubistein HR, Cervi L, Riera CM, Masih DT (1989) Immunosuppression in experimental cryptococcosis in rats: induction of thymic suppressor cells. *Mycopathologia* 108:5-10
24. Sutton P, Newcombe NR, Waring P, Müllbacher A (1994) In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun* 62:1192-1198
25. Teixeira HC, Calich VLG, Singer-Vermes LM, D'Imperio-Lima MR, Russo M (1987) Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. *Braz J Med Biol Res* 20:367-369

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO 2

THYMIC ATROPHY IN INFECTIOUS DISEASES

Liana Verinaud, Paula Cristina de Souza Souto and Vânia Nieto Brito

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

ABSTRACT

The thymus is a primary lymphoid organ that plays an important role in the development of the immune system and in the differentiation and maturation of the vast majority of the T cell repertoire. During the normal life span, this organ undergoes involution in situations such as pregnancy, aging and in the presence of a wide variety of infectious diseases. This atrophy is characterized by intense structural and morphological alterations associated with an increased level of apoptosis, for which many direct and indirect mechanisms have been proposed. The fact that the thymus is a target for infectious diseases suggests that this organ provides a propitious environment for the maintenance or enhancement of infection.

Key words: Apoptosis, infectious diseases, thymic atrophy, thymus, TNF

THE THYMUS

The thymus plays a central role in immunity since it is responsible for developing immature T-cells into immunocompetent T-cells that initiate immune responses following the recognition of pathogens. The thymus develops from the third and, to a lesser extent, the fourth pharyngeal pouches and lies in the upper anterior portion of the chest cavity. Each lobe of this bilobed organ is divided by numerous septa into multiple lobules that have an outer, more cellular, cortex and an inner, less cellular, medulla. The thymic microenvironment is formed by T lymphocytes, or thymocytes, at different stages of maturation, by epithelial cells with extensive cytoplasmic processes that form a meshwork to provide mechanical support and stimuli for the proliferation and development of thymocytes, and by cells of mesodermal origin [33].

T lymphocytes are generated from bone marrow-derived lymphocyte precursors (pre-T cells) that enter the thymic cortex through blood vessels. At this stage of maturation, these cells have a "double negative" phenotype (CD4⁻CD8⁻). Pre-lymphocytes (or thymocytes while in the thymus) proliferate and develop into cortical "double positive" cells expressing both CD4 and CD8 co-receptor molecules (CD4⁺CD8⁺) and low levels of the T-cell antigen receptor (TCR). At this point, a series of molecular

events, known as positive and negative selection, occur in the thymus (Fig. 1).

Positive selection involves the interaction of thymocytes with self-major histocompatibility complex (MHC) molecules present on the cortical epithelium. In this process, thymocytes lose one of the co-receptor molecules (CD4 or CD8) and a self MHC-restricted T cell repertoire is generated. The thymocytes, then, undergo negative selection in which those that recognize self-peptides present in the thymic microenvironment are eliminated. Cells that fail the positive or negative selection die through apoptosis. On the other hand, the selected cells survive and migrate as mature T lymphocytes to the secondary lymphoid tissues where they can act upon infectious microbes.

At birth, the human thymus weighs about 15 grams, at which and presents its greatest relative weight is achieved although growth is continuous until the individual reaches puberty. Thereafter, under the influence of numerous factors, including adrenal and sex hormones, the thymus begins an age-associated involution that results in a decline in T cell production. However, the adult thymus remains actively engaged in thymopoiesis and continues to export functional T cells to the periphery until late in life [13].

Thymic involution is also seen during infection by many pathogens. In most cases, the atrophy is characterized by depletion of the cortical layer, loss of the corticomedullary delimitation, and increased levels of apoptosis or programmed cell death in which the cell activates its own machinery to commit suicide

Correspondence to: Dr. Liana Verinaud
Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP:
13083-970, Campinas, SP, Brasil. Tel: (55) (19) 3788-7911. Fax: (55)
(19) 3289-7050. E-mail: verinaud@unicamp.br, vanianb@unicamp.br

(Fig. 2; Table 1). The degree of thymic involution correlates with the duration of acute illness [34].

The deleterious effects on the thymus during infections can be reproduced in experimental models using either intact microorganisms or products such as cell wall components and toxins. The administration *in vivo* of the bacterial

superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) produced by *Staphylococcus aureus*, for example, leads to thymus atrophy that is associated with thymocyte apoptosis [17]. CD4⁺CD8⁺ double-positive cells are the most affected thymocytes, although the numbers of other subpopulations can undergo a notable reduction.

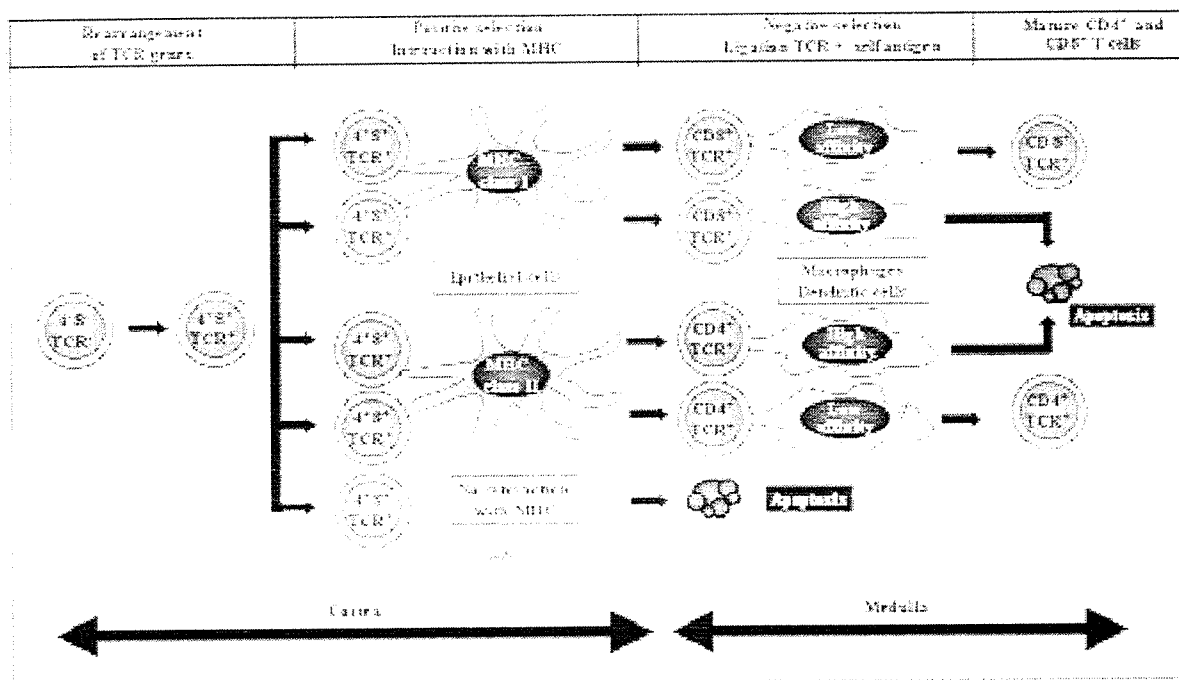


Figure 1. Positive and negative selection processes in the thymus. (Adapted from Roitt *et al.* [24]).

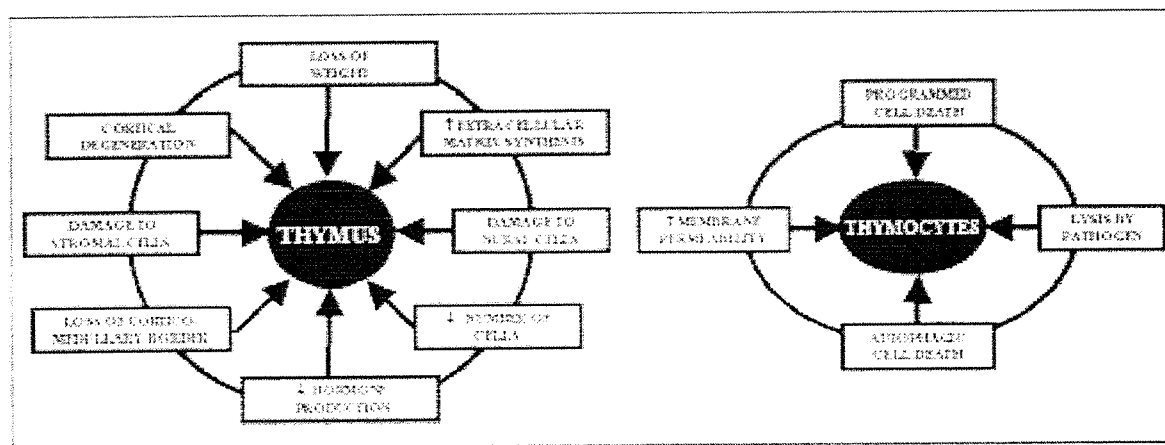


Figure 2. Thymus and thymocyte alterations that can be observed during infections.

Table 1. Possible mediators of thymocyte apoptosis during infectious diseases.

Pathogens that induce thymocyte apoptosis			
Group	Agent	Mediator	Reference
Bacteria	<i>S. aureus</i> (SEB)	Hormones	[17]
	Enterobacteria (Sepsis)	IL-2	[3]
	<i>P. gingivalis</i> (LPS)	TNF	[12]
	Gram-negative bacteria (LPS)	TNF + corticosterone	[36]
	<i>E. coli</i> (LPS)	LIF + corticosteroids	[28]
	<i>S. typhimurium</i> (LPS)	NO	[7]
	<i>M. tuberculosis</i> (CF)	TNF	[22]
Fungi	<i>P. brasiliensis</i>	?	[29]
Protozoa	<i>L. cruzi</i>	ATP _e	[6]
Viruses	CSF Virus	TNF, IL-1	[26]
	SIV	Fas, bcl-2	[24]
	HIV	Fas	[35]
	MHV	?	[34]

ATP_e - Extracellular ATP, CSF - Classical Swine Fever, HIV - Immunodeficiency Virus, LIF - Leukemia Inhibitory Factor, LPS - Lipopolysaccharides, MCP - Mycobacterial Cord Factor, MHV - Murine Hepatitis Virus, NO - Nitric Oxide, SEB - Staphylococcus Enterotoxin B, SIV - Simian Immunodeficiency Virus.

THYMIC ATROPHY BY ENDOGENOUS MEDIATORS

Barke *et al.* [3] investigated the possible role of thymocyte apoptosis in the development of thymic involution following peritoneal sepsis. These authors noted that the reduction in the thymic cortex was correlated with increased levels of thymocyte apoptosis and hypothesized that thymocyte apoptosis induced by sepsis could result partly from inhibition of the expression of interleukin-2 (IL-2), a potent growth factor for lymphocytes.

Thymocyte apoptosis predominantly accounts for the reduction in the thymic cortical layer and can also be induced by cytokines such as tumor necrosis factor (TNF). TNF is a pro-inflammatory cytokine that occurs in the thymus and contributes to thymocytes maturation by inducing either proliferation or elimination [11]. During acute infections, serum TNF levels increase and this cytokine can function as an inducer of thymocyte apoptosis. Isogai *et al.* [12] reported elevated levels of serum TNF followed by a high degree of thymocyte apoptosis when mice were inoculated with Lipopolysaccharides (LPS) from *Porphyromonas gingivalis*. To confirm a direct action of TNF upon the thymus, the same authors showed

that the inoculation of recombinant TNF also increased the levels of thymic apoptosis.

One possible mechanism of TNF-induced apoptosis involves the TNF-R1 receptor. Activation of the TNF-R1 by TNF may lead to the association of this complex with the adaptor protein TRADD (TNF-R1-associated death domain) that would in turn bind to FADD (Fas-associated death domain protein). This mechanism would result in apoptosis through the activation of caspases (a family of proteolytic enzymes) acting in the cytoplasm and nucleus [27]. However, this hypothesis remains to be confirmed.

Alternatively, TNF could exert an indirect effect on the thymus. In a study of thymocyte apoptosis induced by mycobacterial cord factor (CF) from *Mycobacterium tuberculosis*, Ozeki *et al.* [22] found no significant change in the serum TNF levels of treated mice. However, there was almost complete inhibition of CF-induced thymic atrophy following the administration of anti-mouse TNF monoclonal antibody (mAb). Since CF-induced pulmonary granuloma formation was also significantly suppressed by anti-TNF mAb, these authors suggested that TNF contributed to the development of granulomas in an autocrine or paracrine manner, and that other mediators synthesized during CF-induced granuloma formation were responsible for thymocyte apoptosis and thymic atrophy.

In an investigation of classical swine fever (CSF), a viral hemorrhagic disease, Sanchez-Cordón *et al.* [27] demonstrated that TNF and interleukin-1 α (IL-1 α) have an important role in thymocyte losses and thymic atrophy during infection since although lymphocytes were infected by the virus, infection occurred after the onset of apoptosis. These authors concluded that TNF induced the release of IL-1 by several cells and that IL-1-stimulated cells triggered additional autoocrine secretion of IL-1 and TNF, leading to a synergism that resulted in thymocyte apoptosis.

Lymphotoxin, a cytokine previously known as TNF β that is produced during bacterial infections, also induces profound thymic atrophy, with a decrease of more than 95% in the number of thymocytes [15].

The involvement of adrenocortical hormones as mediators of TNF-induced apoptosis has also been suggested but the evidence is still controversial. Zhang *et al.* [37] demonstrated that TNF and corticosterone play an important role in lipopolysaccharide (LPS)-induced thymocyte apoptosis. Ozeki *et al.* [22] observed thymocyte apoptosis in CF-infected

mice even after adrenalectomy. More recently, leukemia inhibitory factor (LIF), a member of the IL-6 cytokine family, has been suggested to play a critical role in thymic atrophy. Sempowski *et al.* [29] demonstrated that systemic and intrathymic LIF levels were significantly increased after the intraperitoneal injection of *Escherichia coli* LPS into mice and that the administration of recombinant LIF induced thymic atrophy. However, since LIF-treated adrenalectomized mice showed no thymic atrophy, these authors suggested that LPS induced LIF secretion which in turn induced systemic and intrathymic corticosteroid production that mediated thymocyte apoptosis.

Various other molecules have recently been proposed to be involved in thymic atrophy and their role in this process deserves investigation. One of these molecules is extracellular ATP (ATP_e), a co-signaling molecule that increases the intracellular Ca²⁺ concentration in cortical thymocytes [7] and modifies their functional properties via DNA synthesis and mitosis [10]. ATP_e also induces early cytosolic acidification, membrane depolarization or hyperpolarization [21], DNA fragmentation [38] and thymocyte lysis [21]. Mantuano-Barradas *et al.* [18], in experiments to assess the involvement of ATP_e in thymic atrophy in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi*-infection, observed that ATP_e increased the plasma membrane permeabilization and cell death in thymocytes.

Nitric oxide (NO) is a simple molecule with a variety of biological effects, including cytotoxicity towards microorganisms [1], tumor cells [32] and other NO-sensitive cells [14]. Low levels of NO are produced constitutively by endothelial cells and play a physiological role in blood pressure regulation [23]. High levels of NO occur during inflammation and after the inoculation of LPS. This NO is produced by cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) that is found in activated endothelial cells, macrophages and dendritic cells. The role of NO as a signaling molecule in thymocyte apoptosis has also been investigated. Fehsel *et al.* [6] reported concentration-dependent apoptosis in thymocytes that were co-cultured with NO donors, and suggested that NO mediates apoptosis *in vivo* because in *Salmonella typhimurium* LPS-inoculated mice apoptotic cells were found in close proximity to blood vessels. In addition, an increased rate of thymocyte apoptosis was observed when cells were cocultured with activated endothelial cells. In this case, the degree of apoptosis

correlated with the NO concentration measured in culture supernatants. The apoptosis-inducing effect was completely inhibited when the NOS-inhibitor NG-methyl-arginine (NMA) was present in the cell cultures. The NO-induced apoptosis was suggested to occur by a mechanism involving the expression of the tumor suppressor protein p53.

Recent evidence has demonstrated that thymic dendritic cells (DCs) express iNOS and generate NO in response to self- and alloantigens [2]. NO released from thymic DCs during antigen processing may be involved in T-cell negative selection and in the deletion of specific thymocytes to non-self antigens presented in the thymus during infections.

THYMIC ATROPHY BY DIRECT ACTION OF PATHOGENS

The thymus can be directly affected by pathogens, such as viruses, fungi, bacteria and protozoa, thus contradicting the idea that T-cell maturation occurs at an antigen-free site.

Rowe and Capps [26] described a murine virus that induced thymic atrophy and necrosis in newborn mice. This virus, known as mouse thymic virus, infects CD4⁺ thymocytes and induces apoptosis with a subsequent loss of helper cell activity [20].

The thymus can be severely affected by human immunodeficiency virus (HIV) through a variety of mechanisms, including disruption of the stromal architecture with loss of thymocyte activity, cellular depletion by HIV replication within thymocytes, and abnormal maturation or death of thymocytes due to viral and/or host factors [19].

Because of the difficulty in studying the thymus in HIV-infected humans, several model systems have been proposed, including a monkey model infected with simian immunodeficiency virus (SIV). Rosenzweig *et al.* [25] described a significant increase of thymocyte apoptosis in SIV-infected newborn macaques that was probably caused by an indirect action of the virus since the number of apoptotic cells was much greater than the number of infected cells. In addition, apoptosis was observed mainly in the thymic cortex whereas most of the infected cells were located in the thymic medulla. The increased level of apoptosis seen by these authors was related to alterations in the two major pathways associated with apoptosis, namely Fas-Fas ligand and bcl-2. Up-regulation of the pro-apoptotic molecule Fas on CD4⁺ thymocytes and down-regulation of bcl-2, which pro-

protects cells from apoptosis-inducing signals, may contribute to the increased level of apoptosis. These observations agree with those of Zauli *et al.* [36] who also demonstrated that HIV type 1 Nef protein sensitizes CD4⁺ T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the Fas pathway.

The thymus is also a target organ in acute experimental Chagas' disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. This parasite causes alterations in the thymic microenvironment that include increased density of the Ia-bearing cellular network, a transient decrease in thymic hormone production, topographic changes in the pattern of cytokeratin expression by thymic epithelial cells, and an increase in extracellular matrix production [28]. Cotta-de-Almeida *et al.* [5] also showed that the lymphoepithelial complex of thymic nurse cells (TNC) was comprised since there was a reduction in the granularity, size and number of TNC, as well as ultrastructural alterations indicative of cell damage.

We have also studied thymic atrophy using experimental models of infection that suppress the immune response. Thus, murine hepatitis virus (MHV)-infected mice show severe thymic atrophy characterized by a loss of organ weight and cellularity and an increased rate of apoptosis. When these mice were co-infected with *T. cruzi* the course of infection was much more severe, indicating that alterations in the thymus can adversely affect the systemic immune response to non-related antigens [35].

More recently, we have been studying the thymic alterations in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*, a dimorphic fungus that causes the most prevalent form of systemic mycosis in Brazil and suppresses the specific immune response to this pathogen. *Paracoccidioides brasiliensis* invades the thymic microenvironment, where it causes severe thymic atrophy characterized by degeneration of the cortical area, a decrease in organ weight, a loss of corticomedullary delimitation, an increase in histiocyte number and the presence of a juxtaacapsular inflammatory infiltrate [4]. Cortical degeneration was subsequently found to be caused by an increase in the thymocyte apoptosis [30] and by autophagic programmed cell death [31]. Such thymic alterations could alter the systemic repertoire of T cells, thereby impairing the specific immune response to *P. brasiliensis*.

Although most of the cells affected during atrophy are CD4⁺CD8⁺ double-positive thymocytes, thy-

mic stromal cells also suffer a significant depletion during viral infections [17]. The thymic stroma has commonly been considered to be the source of signals required for thymocyte survival. Thus, alterations in the thymic microenvironment can impair thymocyte maturation and lead to the entrance of immature or tolerant lymphocytes, or both, into the peripheral circulation.

The permissivity of thymic stromal cells to MHV is well documented [8,16]. This permissivity could contribute to the dissemination of viral infection within the thymus, and lead to the depletion of thymocyte subpopulations and thymic atrophy. The invasion of thymic stromal cells by *T. cruzi*, with localization of the parasite in phagocytic and epithelial cells of the thymus, could result in defective thymocyte maturation [9].

FINAL REMARKS

In view of data reviewed in this paper, it is possible to affirm that thymic involution is frequently found during infectious diseases. Thus, it is reasonable to assume that under these conditions the host defense functions are severely impaired. While this process may be regarded as a host defensive strategy since potentially harmful T-lymphocytes are eliminated, it may also be regarded as a mechanism used by microorganisms to evade host immunity. The growing number of studies in this area should contribute to our understanding of the mechanisms involved in thymic involution.

REFERENCES

1. Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL (1990) Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* **144**, 2725-2729.
2. Aiello S, Noris M, Piccinini G, Tomasoni S, Casiraghi F, Bonazzola S, Mister M, Sayegh MH, Remuzzi G (2000) Thymic dendritic cells express inducible nitric oxide synthase and generate nitric oxide in response to self- and alloantigens. *J. Immunol.* **164**, 4649-4658.
3. Barke RA, Roy S, Chapin RB, Charboneau R (1994) The role of programmed cell death (apoptosis) in thymic involution following sepsis. *Arch. Surg.* **129**, 1256-1261.
4. Brito VN, Souto PC, Cruz-Höfling MA, Ricci LC, Verinaud I (2003) Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. *Med. Mycol.* **41**, 83-87.
5. Cotta-de-Almeida V, Bertho AL, Villa-Verde DM, Savino W (1997) Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **82**, 125-132.
6. Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Kolb-Bachofen V (1995) Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.* **155**, 2858-2865.

7. Freedman BD, Liu QH, Gaulton G, Kotlikoff MI, Hescheler J, Fleischmann BK (1999) ATP-evoked Ca^{2+} transients and currents in murine thymocytes: possible role for P2X receptors in death by neglect. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1635-1646.
8. Godfraind C, Holmes KV, Couteliet JP (1995) Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c mice. *J. Virol.* **69**, 6541-6547.
9. Gonçalves-da-Costa SC, Calabrese KS, Bauer PG, Savino W, Lagrange PH (1991) Studies of the thymus in Chagas' disease: III. Colonization of the thymus and other lymphoid organs of adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathol. Biol. (Paris)* **39**, 91-97.
10. Gregory S, Kern M (1978) Adenosine and adenine nucleotides are mitogenic for mouse thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 1111-1116.
11. Hernandez-Caselles T, Stutman O (1993) Immune functions of tumor necrosis factor. I. Tumor necrosis factor induces apoptosis of mouse thymocytes and can also stimulate or inhibit IL-6-induced proliferation depending on the concentration of mitogenic costimulation. *J. Immunol.* **151**, 3999-4012.
12. Isogai E, Isogai H, Kimura K, Fujii N, Takagi S, Hirose K, Hayashi M (1996) *In vivo* induction of apoptosis and immune responses in mice by administration of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **64**, 1461-1466.
13. Jamieson BD, Douek DC, Killian S, Hultin LE, Scripture-Adams DD, Giorgi JV, Marelli D, Koup RA, Zack JA (1999) Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity* **10**, 569-575.
14. Kronke KD, Brenner HH, Rodriguez ML, Etzkorn K, Noack EA, Kolb H, Kolb-Bachofen V (1993) Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1182**, 221-229.
15. Kusumi A, Abo T, Masuda T, Sugiura K, Seki S, Ohteki T, Okuyama R, Kumagai K (1992) Lymphotoxin activates hepatic T cells and simultaneously induces profound thymic atrophy. *Immunology* **77**, 177-184.
16. Lamontagne L, Jolicoeur P (1991) Mouse hepatitis virus 3-thymic cell interactions correlating with viral pathogenicity. *J. Immunol.* **146**, 3152-3159.
17. Lin YS, Lei HY, Low TL, Shen CL, Chou LJ, Jan MS (1992) *In vivo* induction of apoptosis in immature thymocytes by Staphylococcal Enterotoxin B. *J. Immunol.* **149**, 1156-1163.
18. Mantuano-Barradas M, Henriques-Pons A, Araujo-Jorge TC, Di Virgilio F, Coutinho-Silva R, Persechini PM (2003) Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8+ double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* **5**, 1363-1371.
19. Meissner EG, Duus KM, Loomis R, D'Agostin R, Su L (2003) HIV-1 replication and pathogenesis in the human thymus. *Curr. HIV Res.* **1**, 275-285.
20. Morse SS, Valinsky JE (1989) Mouse thymic virus (MTLV) a mammalian herpesvirus cytolytic for CD4+ (L3T4+) T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **169**, 591-596.
21. Nagy PV, Fehler T, Morga S, Matko J (2000) Apoptosis of murine thymocytes induced by extracellular ATP is dose- and cytosolic pH-dependent. *Immunol. Lett.* **72**, 23-30.
22. Ozeki Y, Kaneda K, Fujiwara N, Morimoto M, Oka S, Yano I (1997) *In vivo* induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate). *Infect. Immun.* **65**, 1793-1799.
23. Rees DD, Palmer RM, Moncada S (1989) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3375-3378.
24. Roitt I, Brostoff J, Male D (1998) *Immunology*. 5th edn. Mosby: London.
25. Rosenzweig M, Connoles M, Forand-Barabasz A, Tremblay MP, Johnson RP, Lackner AA (2000) Mechanisms associated with thymocyte apoptosis induced by Simian Immunodeficiency Virus. *J. Immunol.* **165**, 3461-3468.
26. Rowe WP, Capps WI (1961) A new mouse virus causing necrosis of the thymus in newborn mice. *J. Exp. Med.* **113**, 831-844.
27. Sanchez-Cordon PJ, Romanini S, Salguero FJ, Nunez A, Bautista MJ, Jover A, Gomez-Villamos JC (2002) Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever. *J. Comp. Pathol.* **127**, 239-248.
28. Savino W, Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dardenne M (1989) Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1727-1733.
29. Sempowski S, Rhein ME, Searce RM, Haynes BF (2002) Leukemia inhibitory factor is a mediator of *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced acute thymic atrophy. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3066-3070.
30. Souto PCS, Brito VN, Gameiro J, Ricci LC, Cruz-Höfling MA, Verinaud L (2002) Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection increases apoptotic rate in thymus. *Ann. Rev. Biomed. Sci.* **4**, 141-145.
31. Souto PCS, Brito VN, Gameiro J, Cruz-Höfling MA, Verinaud L (2003) Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. *Med. Microbiol. Immunol.* **192**, 225-229.
32. Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**, 1543-1555.
33. Suster S, Rosai J (1997) Thymus. In: *Histology for Pathologists* (Sternberg SS, ed). pp. 687-706. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia.
34. van Baarlen J, Schuurman HJ, Huber J (1988) Acute thymus involution in infancy and childhood: a reliable marker for duration of acute illness. *Hum. Pathol.* **19**, 1155-1160.
35. Verinaud L, Cruz-Höfling MA, Sakurada JK, Rangel HA, Vassallo J, Wakelin D, Sewell HF, Camargo IJB (1998) Immunodepression induced by *Trypanosoma cruzi* and mouse hepatitis virus type 3 is associated with thymus apoptosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**, 186-191.
36. Zauli G, Gibellini D, Secchiero P, Dutartre H, Olive D, Capitani S, Collette Y (1999) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4+ T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood* **93**, 1000-1010.
37. Zhang YH, Takahashi K, Jiang GZ, Kawai M, Fukada M, Yokochi T (1993) *In vivo* induction of apoptosis (programmed cell death) in mouse thymus by administration of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **61**, 5044-5048.
38. Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JDE (1991) Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J. Cell Biol.* **112**, 279-288.

Received: April 30, 2004

Accepted: June 1, 2004