

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/50623

IB/ 81820

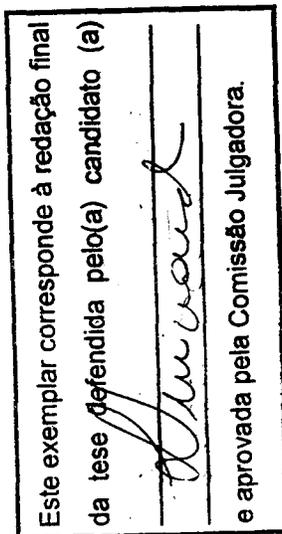
INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Paula Cristina de Souza Souto

**ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DE ÓRGÃOS
LINFÓIDES PRIMÁRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/c
INOCULADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis***



Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção de título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na Área
de Imunologia.

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

**JUNHO
2002**

UNIDADE I.B/21820
Nº CHAMADA T/UNICAMP
So89a
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50623
PROC 16-837/02
C _____ D.X _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/08/02
Nº CPD _____

CM00172447-7

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

So89a **Souto, Paula Cristina de Souza**
Análise ultra-estrutural de órgãos linfóides primários de camundongos balb/c inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis*/Paula Cristina de Souza Souto. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Liana Maria Cardoso Verinaud

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

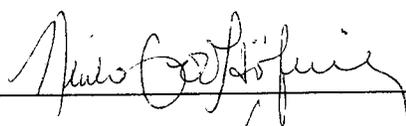
Instituto de Biologia

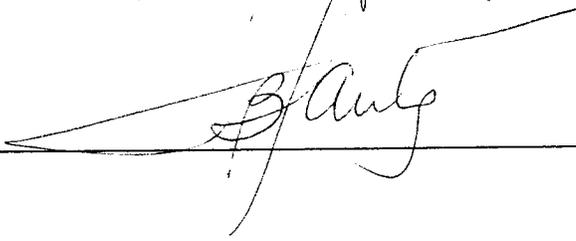
1. *Paracoccidioides brasiliensis*.
2. Órgãos linfóides primários.
3. Microscopia eletrônica. I. Verinaud, Liana Maria Cardoso
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto Biologia. III.
Título.

Data da Defesa: 20/06/2002

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Liana Verinaud (Orientadora): 

Prof^a. Dr^a. Maria Alice da Cruz-Höfling: 

Prof^a. Dr^a. Leonilda M. B. Santos: 

Prof^a. Dr^a. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta: _____

2002

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

Albert Einstein

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

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, em colaboração com Departamento de Histologia e Embriologia e com o Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Dom da Vida e por todas as bênçãos recebidas ao longo dela.

A minha família, pelo amor, carinho e paciência que sempre tiveram comigo.

A Prof^a. Dr^a. Liana Verinaud, pela amizade, compreensão e confiança dedicados durante a orientação.

À FAPESP e o FAEP pelo auxílio financeiro concedido.

As minhas companheiras de trabalho Vânia e Jacy, pela amizade, carinho, confiança e principalmente por todos os momentos que passamos juntas.

As minhas colegas de laboratório Mariangela, Camila e Maria Carolina pela amizade e auxílio.

As minhas amigas Débora e Eliane, pela paciência e valiosos ensinamentos e dicas durante fases importantes deste trabalho.

Aos meus amigos dos Deptos. de Microbiologia e Imunologia e Histologia pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, pela cessão do laboratório e por todo o auxílio dispensado para a realização deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Maria Alice da Cruz-Höfling, por todo o auxílio dispensado para a realização deste trabalho e pela participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. José Vassallo, por sua participação na banca examinadora prévia e por todas as sugestões oferecidas.

A Prof^a. Dr^a. Lucila Costallat Ricci, pelo apoio para a realização deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Leonilda M. B. Santos, pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Violin D. Pereira, pela valiosa ajuda com o material fotográfico deste trabalho.

Aos funcionários do Depto. de Microbiologia e Imunologia, em especial a Rose e Marcos pelo cuidado com os animais, e a Dirce por todo o auxílio e companheirismo no dia-a-dia.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica pela paciência e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos, minha profunda gratidão.

RESUMO

SOUTO, P.C.S. **Análise Ultra-Estrutural de Órgãos Linfóides Primários de Camundongos BALB/c Inoculados com *Paracoccidioides brasiliensis***. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico, causador da Paracoccidioidomicose (PCM), doença invasiva no homem, de alta incidência na América Latina, em especial no Brasil. Vários estudos têm mostrado que a imunossupressão observada em micoses sistêmicas pode estar relacionada ao envolvimento de órgãos linfóides primários. Trabalhos anteriores deste laboratório mostram alterações histopatológicas, através da microscopia de luz, no timo e na medula óssea em diferentes fases da infecção experimental. No presente estudo, detalhamos, através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, as alterações induzidas pelo *P. brasiliensis* nestes órgãos, e correlacionamos estas alterações com o controle da disseminação fúngica. Para tanto, camundongos BALB/c machos foram inoculados intraperitonealmente com 5×10^6 células fúngicas e avaliados quanto a alterações nos órgãos linfóides primários e ao controle da disseminação. O *P. brasiliensis* invadiu o timo, que sofreu severa atrofia, com alterações em componentes celulares. A medula óssea, por outro lado, apresentou alterações comuns a uma reação sistêmica frente a um processo infeccioso, porém, não foi observada a presença do fungo neste tecido. Uma acentuada correlação inversa entre índice tímico e o controle da disseminação da infecção, medida pela formação de granulomas compactos, foi observada. Assim, nossos resultados sugerem que o *P. brasiliensis* é capaz de induzir alterações ultra-estruturais no timo que podem facilitar a sua persistência no hospedeiro.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	10
III. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Animais	13
3.2. Fungos	13
3.3. Preparo do Inóculo	14
3.4. Infecção Experimental	14
3.5. Sacrifício e Coleta do Material	14
3.6. Índice dos Órgãos	15
3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão	15
3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura	16
3.9. Análise Estatística	16
IV. RESULTADOS	18
4.1. Indução de Atrofia Tímica e Formação de Granuloma	19
4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão	23
4.2.1. Timo	23
4.2.2. Medula Óssea	31
4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura	33
4.3.1. Timo	33
4.3.2. Medula Óssea	33
V. DISCUSSÃO	36
VI. CONCLUSÕES	43
VII. ABSTRACT	45
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

I. INTRODUÇÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico de uma doença granulomatosa crônica denominada Paracoccidioidomicose (PCM), é um fungo termodimórfico conhecido apenas em sua forma assexuada ou imperfeita. No indivíduo infectado ou quando cultivado a 37°C, este fungo apresenta-se na forma leveduriforme, caracterizada macroscopicamente por colônias moles e rugosas, que microscopicamente são compostas por células ovais ou alongadas possuindo múltiplos brotamentos, lembrando uma roda de leme. Já em temperatura ambiente, o *P. brasiliensis* desenvolve-se sob a forma miceliar, 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).

O nicho ecológico do *P. brasiliensis* não é totalmente conhecido. Acredita-se que este possa ser encontrado na natureza, onde, provavelmente, clamidósporos e conídios do fungo estejam presentes no solo (MEDINA & BODZIAT, 1949) ou em restos vegetais (LACAZ, 1949). Entretanto, recentemente, o *P. brasiliensis* foi também isolado de tatus (*Dasypus noveminctus*) que vivem em áreas de alta incidência da doença (BAGAGLI *et al.*, 1998; SILVA-VERGARA *et al.*, 2000).

A Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica, freqüente na América Latina, constituindo a principal micose sistêmica desta região. Entretanto, esta micose 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%), seguidos da Colômbia e Venezuela (BRUMMER *et al.*, 1993; GOLDANI & SUGAR, 1995). No Brasil, a maior parte dos casos ocorre na região sudeste, mais

precisamente no estado de São Paulo (GOLDANI & SUGAR, 1995). Os indivíduos mais atingidos são trabalhadores rurais, com idades entre 30 e 60 anos. Os casos diminuem entre os jovens e são raros em crianças (FRANCO *et al.*, 1989; BRUMMER *et al.*, 1993).

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. A partir deste órgão, a doença pode se desenvolver em uma forma subclínica, em um quadro pulmonar localizado ou disseminar-se por todo o corpo do indivíduo, através da via sangüínea e/ou linfática, provocando desta forma uma infecção sistêmica, envolvendo outros órgãos ou tecidos, inclusive pele e mucosas (GIRALDO *et al.*, 1976; FRANCO, 1987; FRANCO *et al.*, 1994).

Clinicamente, a PCM pode apresentar-se sob duas formas distintas, a forma juvenil aguda (subaguda) e a forma adulta crônica. A forma aguda ou subaguda representa apenas 3 a 5% de todos os casos e é normalmente severa, de evolução rápida, afetando predominantemente jovens de ambos os sexos e comprometendo principalmente células do sistema fagocitário mononuclear. Já a forma crônica, por outro lado, ocorre em mais de 90% dos pacientes, tem instalação lenta, gradual e é observada com maior freqüência em pacientes adultos do sexo masculino, com comprometimento pulmonar e eventualmente mucocutâneo (FRANCO *et al.*, 1987; BRUMMER *et al.*, 1993).

Na forma crônica da doença, observa-se uma maior resistência em pessoas do sexo feminino, fato que comprovadamente está relacionado a fatores hormonais. Experimentos desenvolvidos por RESTREPO *et al.* (1984) demonstraram que o estrógeno é capaz de inibir a transição do *P. brasiliensis* de sua forma miceliar, para a forma leveduriforme. Porém, este mesmo hormônio não foi capaz de impedir a transição reversa, isto é,

transformar o fungo da sua forma leveduriforme para a miceliar e nem foi capaz de afetar o crescimento do mesmo ou a formação de multibrotamentos nas leveduras.

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 intensivo 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).

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 com uma suspensão de tecidos humanos infectados, pela via intratesticular, 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 ausência de correlação 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 (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, 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).

Inicialmente, acreditava-se que deficiências inerentes à resposta imune celular poderiam propiciar o desenvolvimento da Paracoccidioidomicose. Entretanto, atualmente a idéia mais aceita é que a depressão da resposta imune celular é causada pela própria infecção, o que contribui para o sucesso do patógeno (FRANCO *et al.*, 1989; BRUMMER *et al.*, 1993). Um dos principais argumentos a favor desta hipótese é o de que pacientes tratados com uma terapia específica contra o fungo reverterem o quadro de depressão da resposta imune celular (MOK & GREER, 1997).

Vários fatores são apontados como possíveis responsáveis pela supressão da resposta imune celular durante a infecção paracoccidioidomycótica, destacam-se: deficiência na apresentação de antígenos e diminuição da função de células T (TEIXEIRA *et al.*, 1987), presença de células supressoras antígeno-específicas (JIMENEZ-FINKEL & MURPHY, 1988a, 1988b), e desvio da resposta para células T do tipo Th2 (BERNARD *et al.*, 1997). Apesar disso, os fenômenos desencadeantes da imunossupressão não foram ainda elucidados, e a possibilidade desta imunodepressão ser devida a uma ação, direta ou indireta, deste fungo sobre os órgãos linfopoiéticos não pode ser descartada, como tem sido observado em outras micoses (SOTOMAYOR *et al.*, 1989; SUTTON *et al.*, 1994; ALVAREZ *et al.*, 1995).

Apesar do conhecido tropismo do *P. brasiliensis* por tecidos linfóides (FRANCO *et al.*, 1989; BRUMMER *et al.*, 1993), não existem relatos conclusivos acerca do acometimento de órgãos linfóides primários pelo fungo e suas conseqüências ao longo da infecção. Alguns autores têm descrito o comprometimento da medula óssea em pacientes portadores das formas aguda e crônica da doença (PIMENTA DE MELLO, 1955; CASTRO *et al.*, 1958; TERRA *et al.*, 1991; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992; OZAKI *et al.*, 1996),

entretanto, estas alterações não foram relacionadas com a depressão da resposta imune, freqüentemente observada nesta infecção. Além disso, não se encontra na literatura relatos sobre alterações na medula óssea utilizando modelos experimentais, o que poderia, s.m.j., contribuir para uma maior compreensão do fenômeno da imunossupressão. Por outro lado, alterações tímicas também podem ser capazes de influenciar no quadro de imunossupressão e, no entanto, nenhum relato literário descreve alterações neste órgão durante a paracoccidiodomicose humana ou experimental.

Resultados obtidos recentemente em nosso laboratório, utilizando técnicas de microscopia de luz, propiciaram evidências que a infecção pelo *P. brasiliensis* é capaz de induzir severas alterações estruturais tanto no timo como na medula óssea de animais infectados (BRITO *et al.*, 2002a, 2002b). Diante disso, faz-se necessário a melhor caracterização das alterações presentes nestes órgãos. A análise ultra-estrutural, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), tem sido utilizada para detecção e caracterização de alterações ao nível celular em órgãos linfóides primários visando o entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos na supressão da resposta imune já observada em outras infecções.

Em estudos sobre infecções virais, STANLEY *et al.* (1993) demonstraram que o vírus HIV induz, em modelos animais, uma profunda depleção dos timócitos bem como um dano no microambiente tímico, sabidamente importante para a maturação das células T. Com esse estudo os autores inferem que provavelmente a diminuição de células T observada na periferia, em pacientes portadores do vírus HIV, poderia ser devido à ação deste vírus sobre o timo.

Em trabalhos utilizando bactérias, HOTCHKISS *et al.* (1997) observaram que animais com quadro de septicemia apresentavam extensiva morte celular programada (apoptose) em linfócitos e células parenquimatosas do timo e do baço, sugerindo com isso que a apoptose pode ser um importante fator da supressão imunológica durante infecções bacterianas.

Estas técnicas também já foram utilizadas no estudo de infecções fungicas e mostraram que estes organismos podem induzir um estado de supressão do sistema imune. ÁLVAREZ *et al.* (1995) observaram que trutas infectadas com fungos do gênero *Saprolegnia* apresentavam perda da arquitetura tímica com conseqüente disfunção do órgão. Este quadro era agravado quando o timo do animal infectado apresentava hifas em seu interior, demonstrando dessa forma tanto uma ação direta quanto indireta do fungo na determinação do quadro de imunodepressão encontrado em hospedeiros infectados. Já SUTTON *et al.* (1994) estudando a ação *in vivo* da gliotoxina, produto metabólico sintetizado pelo *Aspergillus fumigatus* e outros fungos patogênicos, observaram que camundongos irradiados injetados intraperitonealmente com gliotoxina mostravam uma dificuldade significativa em recuperar as suas células imunes, quando comparados com animais irradiados não tratados e, através do estudo morfológico das células do timo, baço e linfonodos mesentéricos, observaram que a injeção de gliotoxina induzia a apoptose das células do sistema imune. Assim, os autores concluíram que a apoptose poderia ser o mecanismo responsável pela imunossupressão, detectada tanto em órgãos linfóides primários, quanto em órgãos linfóides secundários, observada em animais infectados com *A. fumigatus*.

No presente estudo procuramos correlacionar as alterações ultra-estruturais dos órgãos linfóides primários, ao longo da infecção pelo *P. brasiliensis*, com a disseminação da doença, na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos nestas alterações e a dinâmica fungo-imunossupressão-doença.

II. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos específicos:

- Correlacionar a atrofia tímica causada pela infecção pelo *P. brasiliensis* com o controle da disseminação fúngica, através da formação de granulomas;
- Avaliar ultra-estruturalmente o timo e a medula óssea ao longo da infecção, utilizando a microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia eletrônica de varredura.

III. 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 8 semanas de idade foram utilizados neste estudo.

Testes realizados a cada 3 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 (TREXLER, 1959), com água e ração estéril 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 (CEEAA/Unicamp).

3.2. Fungos:

O isolado virulento Pb18, cedido pelo Prof. Dr. Zoilo Pires Camargo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), foi utilizado. A cepa foi mantida em nosso laboratório, na fase leveduriforme em meio de cultivo de Fava Netto a 36°C, sendo repicado a cada 15 dias.

A patogenicidade desta cepa fúngica 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. Preparo do Inóculo:

Para o preparo da suspensão fúngica, *P. brasiliensis* foi subcultivado em meio de cultivo Fava Netto e coletado em sua fase de crescimento exponencial (7 dias). As células fúngicas foram ressuspensas em Solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, pH 7,2, agitadas em agitador tipo Vortex, em dois ciclos de 15 segundos, centrifugadas por 10 minutos a 300 x g e lavadas com PBS por 2 vezes.

O número total de células presente na suspensão foi determinado por contagem em câmara de Newbauer e a concentração final ajustada para 10^7 fungos/ml. A viabilidade dos fungos foi determinada pela coloração vital Azul de Algodão, conforme descrito por SANO *et al.* (1993).

3.4. Infecção Experimental:

Camundongos BALB/c foram inoculados, pela via intra peritoneal, com 5×10^6 *P. brasiliensis* da cepa Pb18 contidos em 0,5 ml de solução salina estéril. Animais não infectados foram inoculados com solução salina estéril e sacrificados ao longo do período experimental, servindo como padrão normal para a comparação com os animais infectados.

3.5. Sacrifício e Coleta do Material:

Lotes de 6 animais inoculados com *P. brasiliensis* foram sacrificados às 24 horas e aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias após a infecção. Destes 6 animais, 3 foram sacrificados por deslocamento cervical e 3 foram perfundidos, pela aorta, com salina fisiológica seguida por uma solução fixadora contendo 2% de paraformaldeído e 1,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão fosfato de sódio, pH 7,4, para a fixação *in vivo*. Dos animais sacrificados por deslocamento cervical foram obtidos o timo, o baço e o fígado para a determinação do

índice, e o fêmur direito para a obtenção de suspensão celular de medula óssea. Já dos animais perfundidos foram retirados o timo e o fêmur direito, para serem utilizados nas técnicas de microscopia eletrônica.

3.6. Índice dos Órgãos:

Animais infectados e controle foram anestesiados, pesados, sangrados e sacrificados por deslocamento cervical. O fígado, o baço e o timo foram então retirados, limpos, lavados em PBS, secos em papel de filtro e pesados. Para representar o grau de formação de granuloma no fígado e no baço, o índice dos órgãos foi calculado como o peso do órgão (em gramas)/peso do animal (em gramas) x 100, conforme OZEKI *et al.* (1997).

3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão:

O timo dos animais perfundidos foi cortado em pequenos pedaços e imerso em solução fixadora contendo 2% de paraformaldeído e 1,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão fosfato de sódio, pH 7,4, por cerca de 24 horas. Já o lavado de medula óssea foi obtido dos animais sacrificados por deslocamento cervical utilizando-se 1ml de meio essencial mínimo (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, a suspensão foi lavada 3 vezes por 10 minutos a 300 x g utilizando o mesmo meio em que foi obtido o lavado. Após a última lavagem, as células foram fixadas em solução fixadora contendo 2% de paraformaldeído, 1,25% de glutaraldeído e 0,1% de sacarose em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 por 24 horas. Após a fixação, esta suspensão foi lavada por duas vezes em PBS-BSA 1% por 10 minutos a 300 x g. Depois da obtenção do “pellet”, este foi incluído em agarose 2%. Em seguida o timo e a medula óssea foram pós-fixado em 1% de tetróxido de ósmio tamponado (OsO₄), por 2 horas, desidratado em gradiente de etanol e óxido de

propileno, e incluído em resina (Epon 812). Após este tratamento, cortes semifinos foram obtidos em ultramicrotomo, corados com azul de toluidina e observados em microscópio de luz, para a escolha da área para a obtenção dos cortes ultrafinos. Após a obtenção dos cortes ultrafinos em telas de cobre, estes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss Leo 906) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura:

O lóbulo esquerdo do timo e o fêmur direito dos animais perfundidos foram, inicialmente, fixados da mesma forma da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Após a passagem pela solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) 1%, o material foi desidratado em diferentes gradientes de etanol. Em seguida, o material foi criofaturado em nitrogênio líquido. Após este procedimento o timo e o fêmur foram secos no ponto crítico com CO_2 líquido (Balzers CPD 030), fixado com adesivo em suporte de alumínio, recoberto com ouro-paládio (Sputer Coater Balzers SCD 050), e observados ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL 5800LV) do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp, com aceleração de voltagem de 10 Kv.

3.9. Análise Estatística:

Foi utilizado o Teste de Correlação de Pearson para a correlação entre a atrofia tímica e a disseminação da infecção. Para as demais análises utilizou-se a Análise de Variância de 1 Via (ANOVA) seguida pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p era menor ou igual a 0,05. Todos os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad InStat

versão 3.0 (1997). O software GraphPad Prism versão 1.03 (1994) foi utilizado para a confecção dos gráficos.

IV. RESULTADOS

4.1. Indução de Atrofia Tímica e Formação de Granuloma:

A análise dos índices do timo, do baço e do fígado dos camundongos infectados experimentalmente com *P. brasiliensis* mostrou alterações sensíveis ao longo da infecção. O índice do timo começou a diminuir logo às 24 horas pós-inoculação (Figura 1) e persistiu de maneira crescente até o 7º dia, quando representava cerca de 1/3 do índice observado nos animais controles. Após este período, observou-se uma recuperação do índice do órgão, sendo que aos 14 dias pós-inoculação, o índice médio dos timos era de cerca de 2/3 do índice encontrado em animais não inoculados, sendo que este padrão persistiu até o final do período experimental.

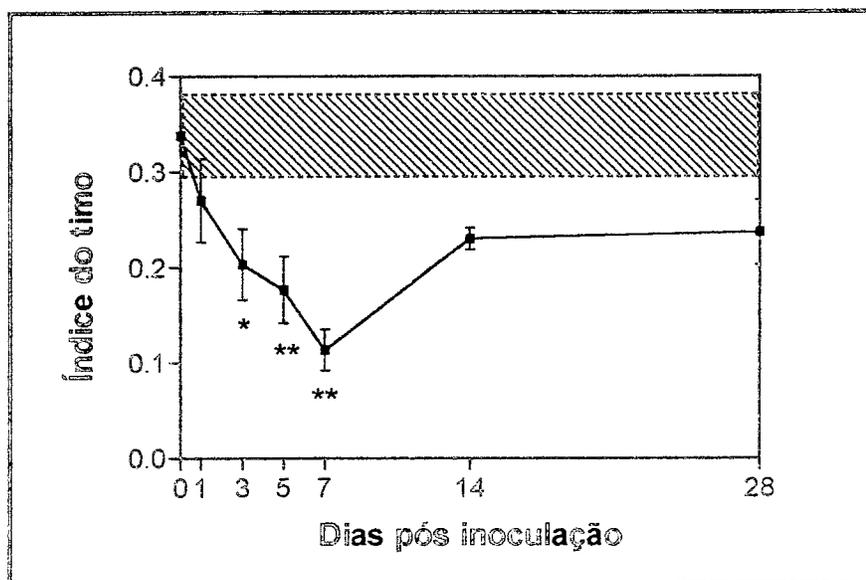


Figura 1: Cinética do índice do timo em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Paracoccidioides brasiliensis*. A ANOVA revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p=0,001$), enquanto o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significantes no índice do timo observado no 3º, 5º e 7º dia pós-inoculação, quando comparados aos animais controles (* $p<0,05$, ** $p<0,01$). Os valores representam a média do índice encontrado em 3 animais diferentes \pm o erro médio padrão.

O índice do fígado aumentou de modo exponencial a partir do 3º dia de inoculação, atingindo, ao 7º dia, o seu pico (Figura 2). A partir deste período o aumento do índice hepático tornou-se menos pronunciado. Entretanto, até o final do período experimental, o índice do fígado manteve-se acima do observado nos animais controles.

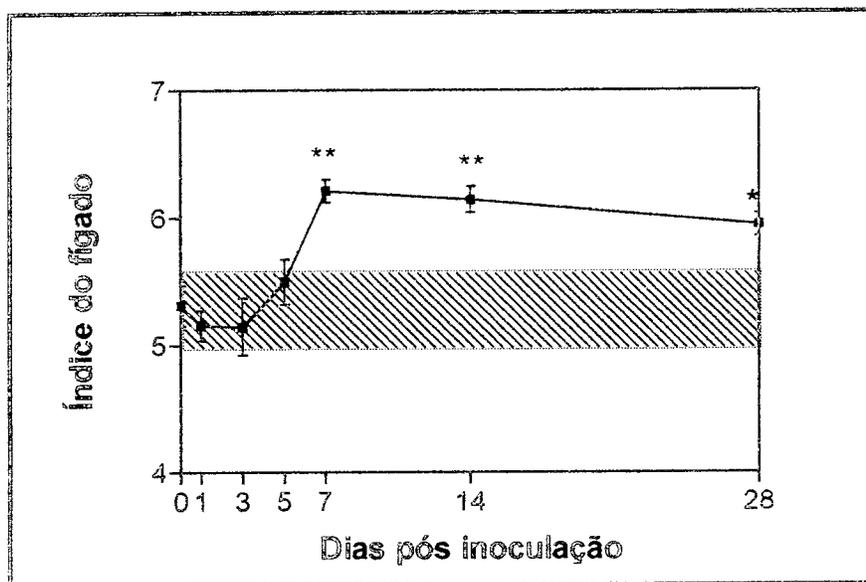


Figura 2: Cinética do índice do fígado em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*. A ANOVA revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p=0,0003$), enquanto o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significantes no índice do fígado observado no 7º, 14º e 28º dia pós-inoculação, quando comparados aos animais controles ($*p<0,05$, $**p<0,01$). Os valores representam a média do índice encontrado em 3 animais diferentes \pm o erro médio padrão.

Em relação ao baço observou-se que seu índice 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 do índice neste órgão tornou-se menos

pronunciado (Figura 3). Entretanto, ao final do período experimental, o índice do baço manteve-se acima do observado em animais controle.

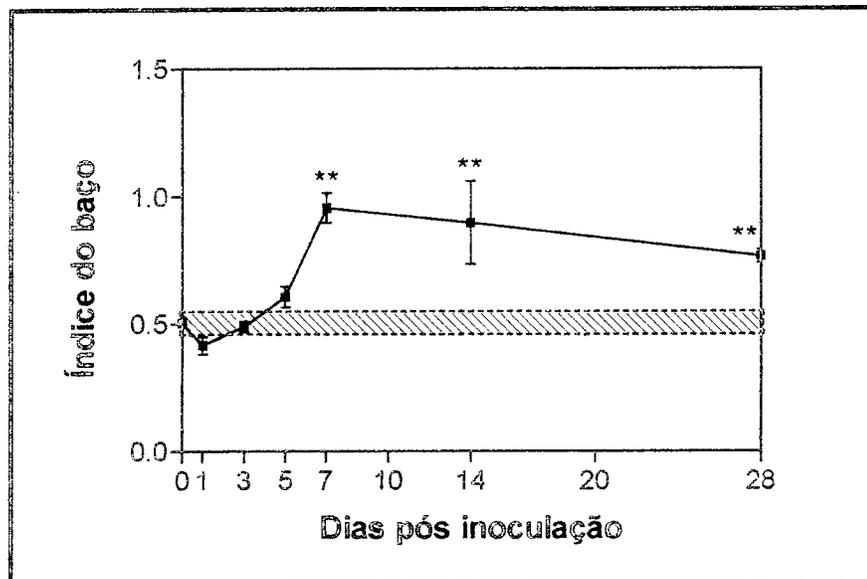


Figura 3: Cinética do índice do baço em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *P. brasiliensis*. A ANOVA revelou variações extremamente significativas neste grupo ($p < 0,0001$), enquanto o Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significantes no índice do fígado observado no 7º, 14º e 28º dia pós-inoculação, quando comparados aos animais controles (** $p < 0,01$). Os valores representam a média do índice encontrado em 3 animais diferentes \pm o erro médio padrão.

Dados obtidos anteriormente em nosso laboratório já haviam revelado que os índices hepáticos e esplênicos correlacionavam-se com a formação dos granulomas (dados não mostrados).

A atrofia do timo induzida pelo *Paracoccidioides brasiliensis* exibiu uma apreciável correlação inversa com a formação do granuloma hepático (Figura 4) e do granuloma esplênico (Figura 5).

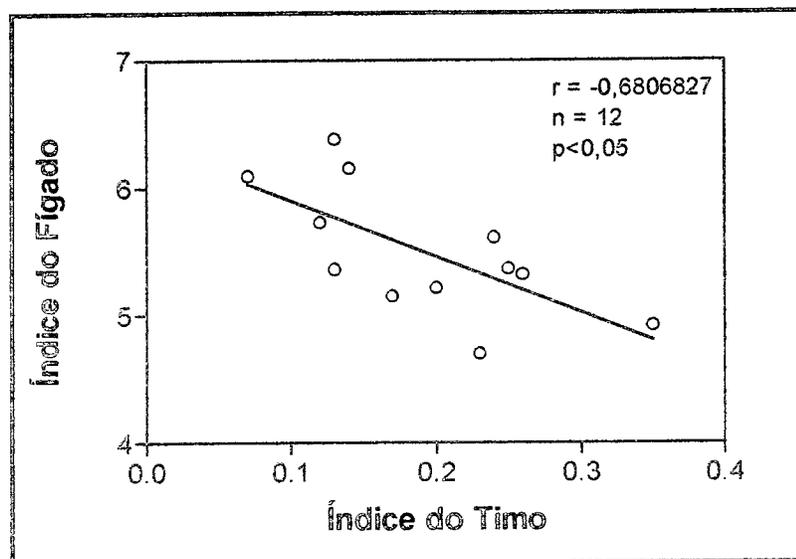


Figura 4: Correlação entre o índice do timo e o índice do fígado em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *P. brasiliensis*, entre 1 e 7 dias de infecção.

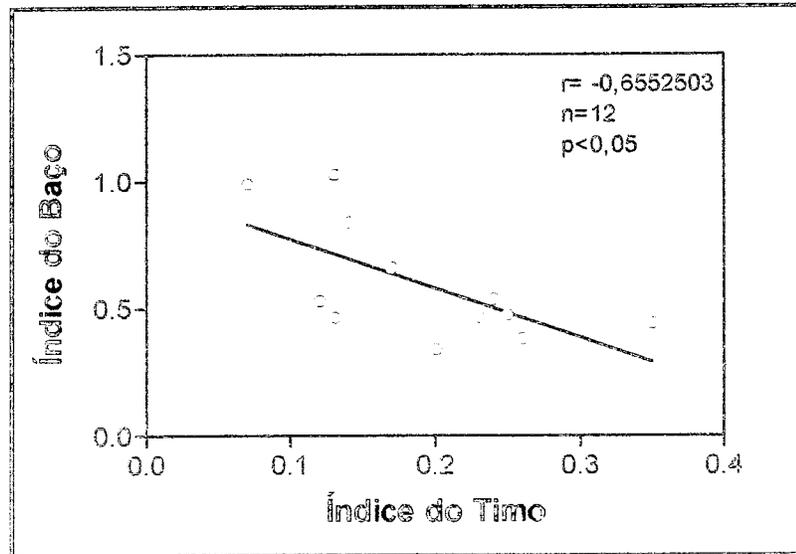


Figura 5: Correlação entre o índice do timo e o índice do baço em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *P. brasiliensis*, entre 1 e 7 dias de infecção.

4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão:

4.2.1. Timo:

Através da análise dos cortes ultrafinos do timo dos animais infectados experimentalmente com o *P. brasiliensis* foi possível detectar achados importantes para o entendimento da infecção paracoccidioidomicótica.

Logo às 24 horas p.i. observou-se grande quantidade de mitocôndrias nos timócitos de animais infectados (Figura 6A) quando comparado aos timócitos dos animais controle (Figura 6B). A partir dos 3 dias p.i. essas mitocôndrias apresentavam características de degeneração (Figura 7).

Outra alteração ultra-estrutural bastante significativa relaciona-se ao aparelho de Golgi. A partir das 24 horas p.i. estas estruturas apresentavam-se hipertrofiadas mostrando sinais de ativação (Figura 8).

A partir das 24 horas p.i. até os 7 dias p.i., notou-se que os mastócitos presentes no timo apresentavam características de desgranulação (Figura 9).

Além disso, observou-se no início do período experimental a presença de uma discreta quantidade de vacúolos contendo substância amorfa (Figura 10A), sendo que a partir de 7 dias p.i. houve um aumento considerável na quantidade destes em todo o estroma tímico (Figura 10B). Notou-se, também, durante todo o período experimental, um grande número de macrófagos com substâncias fagocitadas (Figura 11).

Aos 7 dias p.i., foi encontrado uma grande quantidade de fibroblastos na região medular que se mantiveram presentes até o final do período experimental (Figura 12).

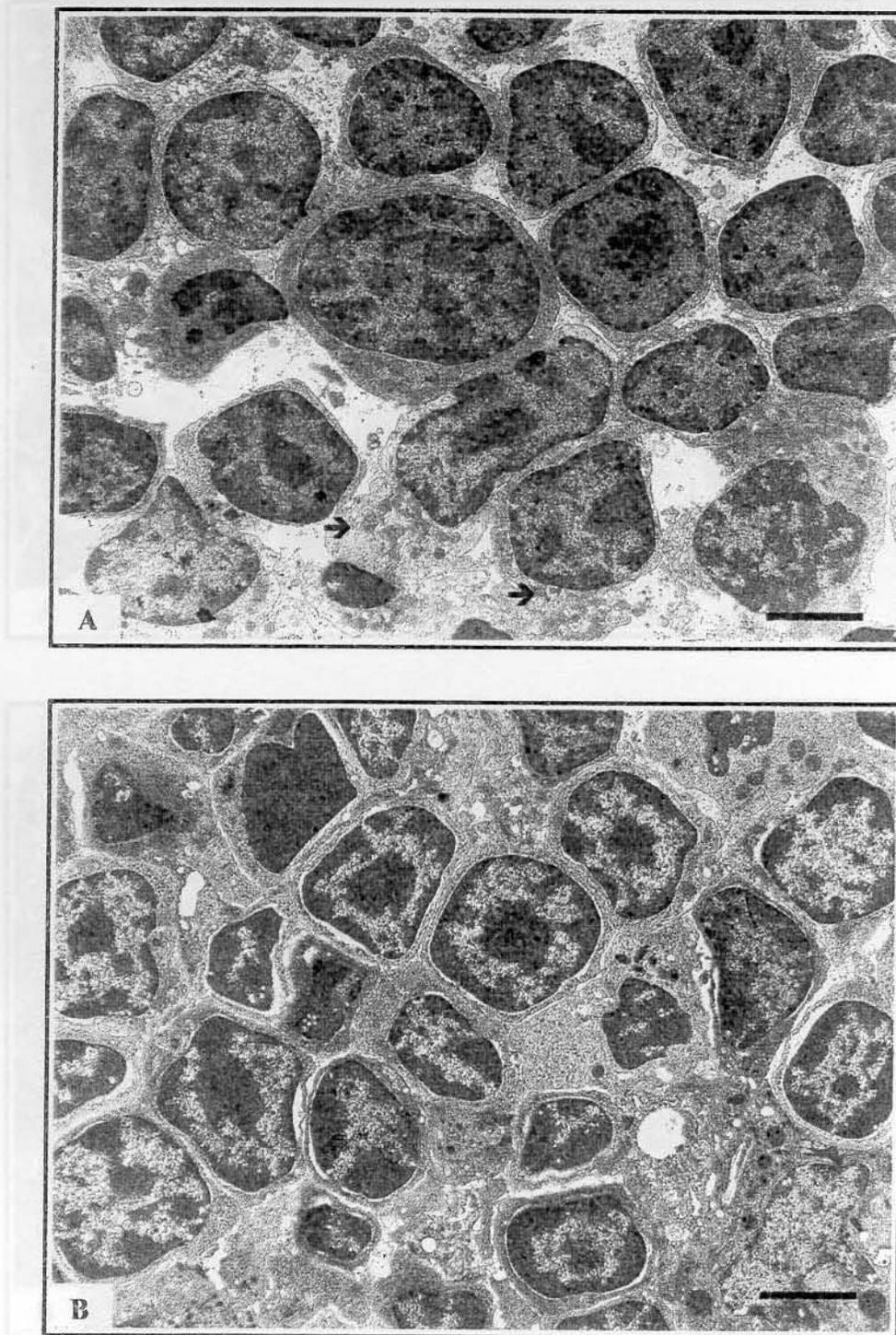


Figura 6: Micrografia eletrônica do timo.

(A) Animal infectado experimentalmente com *P. brasiliensis*. 24 horas p.i.. No início da infecção observa-se um aumento no número de mitocôndrias (→) nos timócitos.

(B) Animal controle. Nos animais normais notam-se poucas ou nenhuma mitocôndria nos timócitos.

Barra = 5 µm

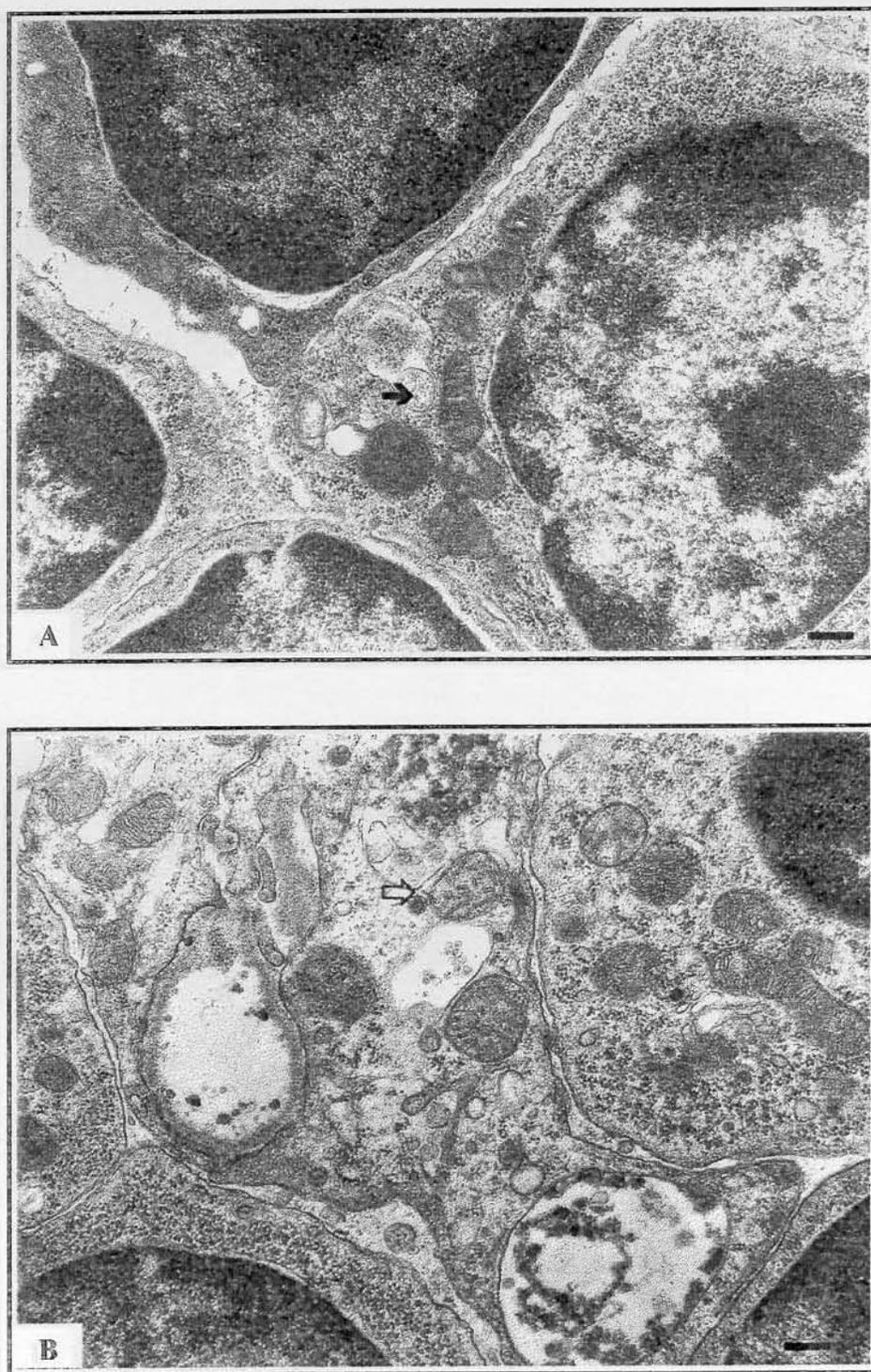


Figura 7: Micrografia eletrônica do timo.

(A) Animal controle. Mitocôndrias com característica normal (→).

(B) Animal infectado. 3 dias p.i.. A partir dos 3 dias p.i. as mitocôndrias dos animais infectados começaram a apresentar-se com características de degeneração (⇨).

Barra = 5 µm

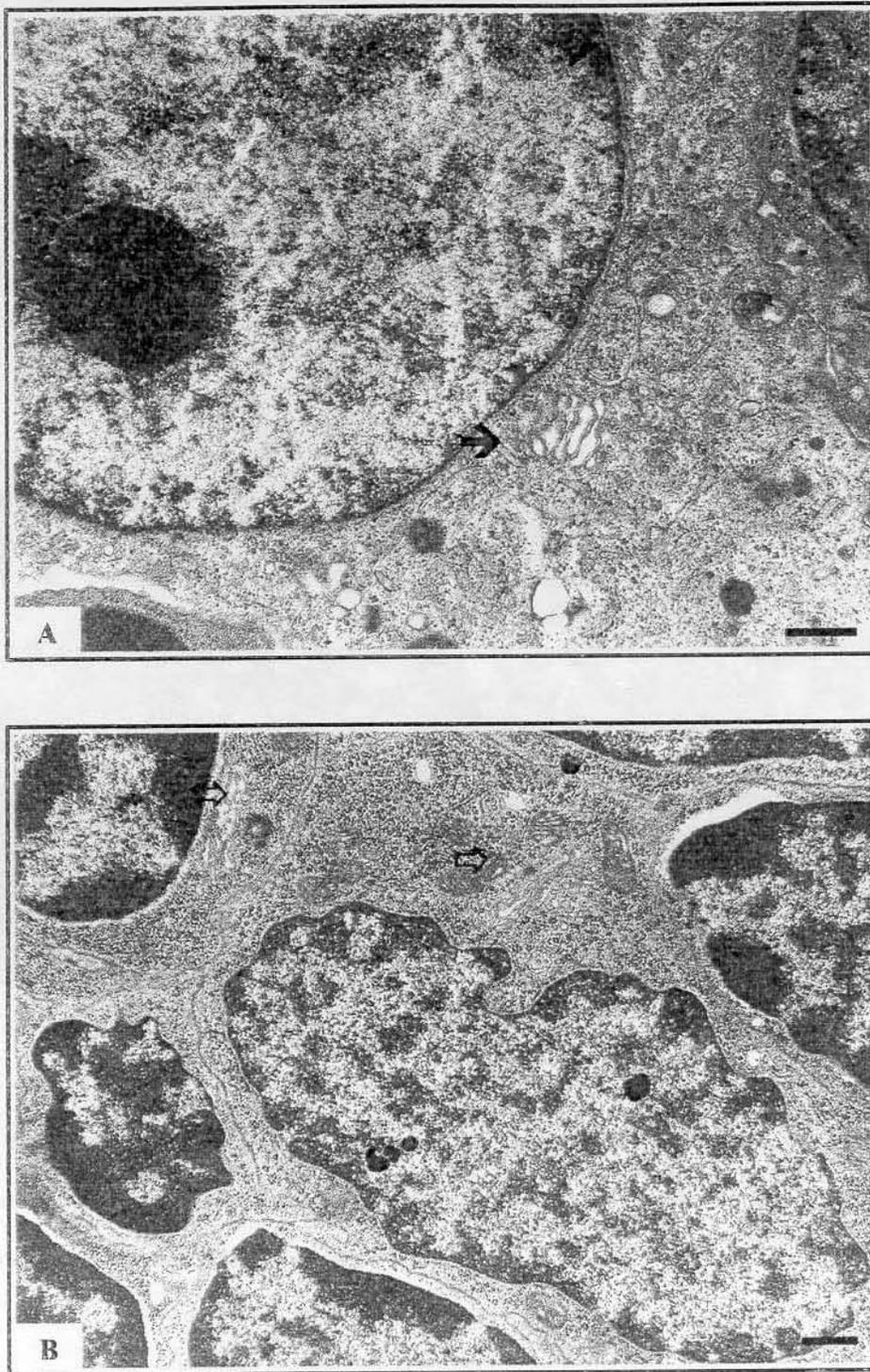


Figura 3: Micrografia eletrônica do timo.

(A) Animal controle. Aparato de Golgi (→).

(B) Animal experimental. 24 horas p.i.. Logo no início da infecção observou-se a presença de vários Aparatos de Golgi hipertróficos (⇨).

Barra = 1 μ m

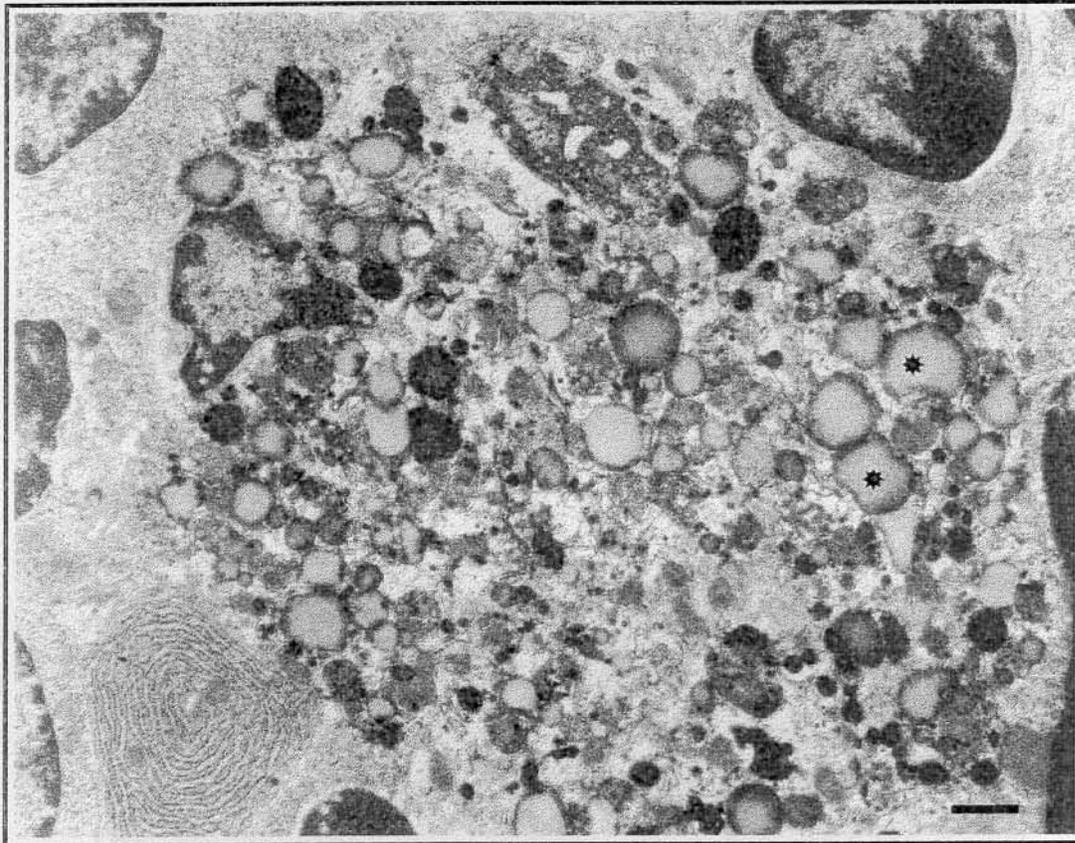


Figura 9: Micrografia eletrônica de transmissão de timo. Animal infectado experimentalmente com *P. brasiliensis*. 5 dias p.i.. Até os 7 dias p.i. notou-se que os mastócitos presentes no timo apresentavam-se com características de desgranulação (*). Barra = 2 μ m.

Figura 10: Micrografia eletrônica de transmissão de timo.

(A) Animal infectado: 24 dias p.i. Notam-se características de mastócitos (*) com características de desgranulação.

(B) Animal controle: 14 dias p.i. Observa-se um aumento na quantidade de mastócitos (*) e a ausência de desgranulação de mastócitos.

Barra = 2 μ m

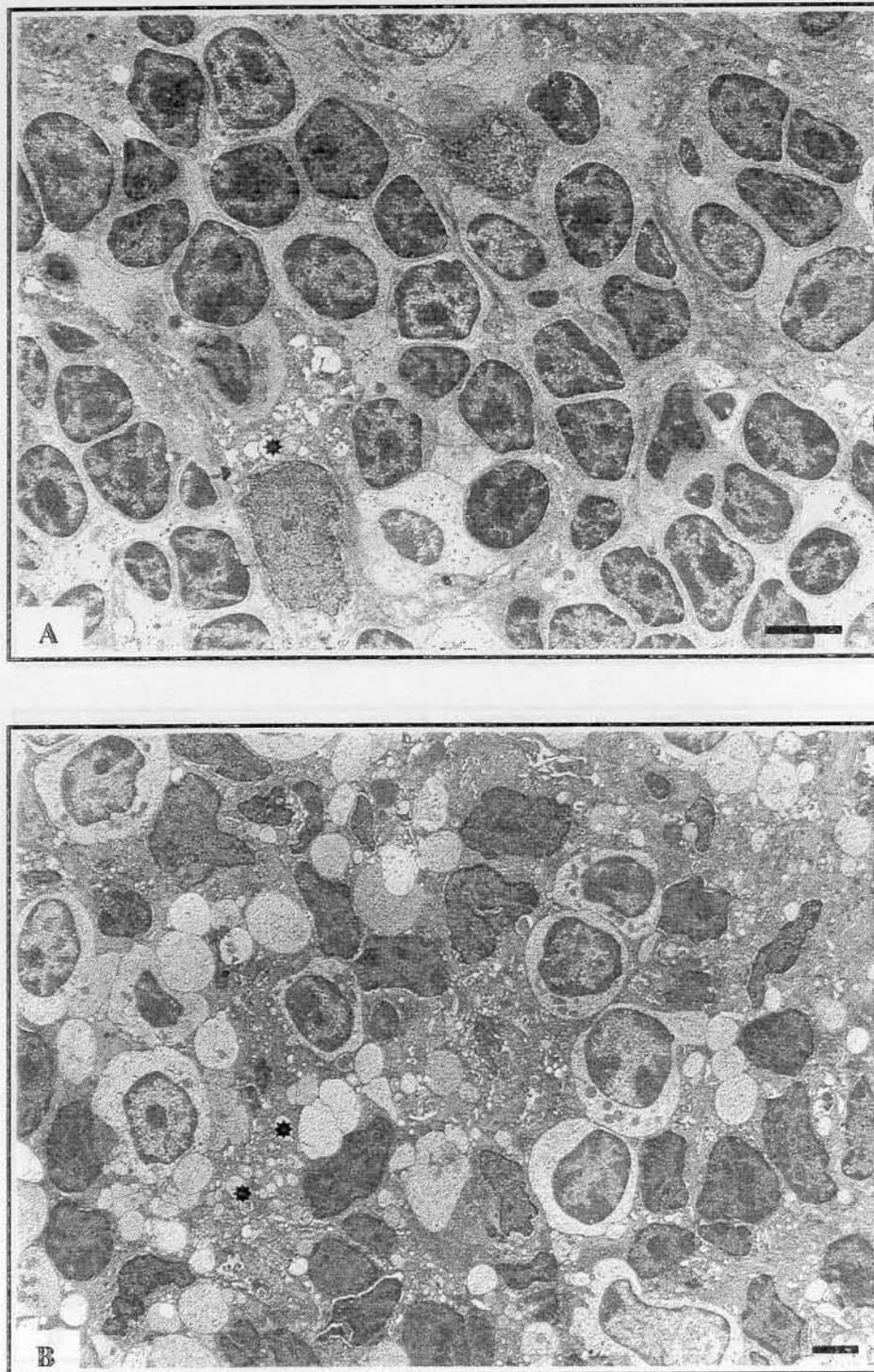


Figura 10: Micrografia eletrônica do parênquima tímico.

(A) Animal infectado. 24 horas p.i.. Nota-se o aparecimento de vacúolos (*) contendo substância amorfa.

(B) Animal infectado. 14 dias p.i.. Observa-se um aumento na quantidade de vacúolos (*) e a completa desestruturação do tecido.

Barra = 5 µm

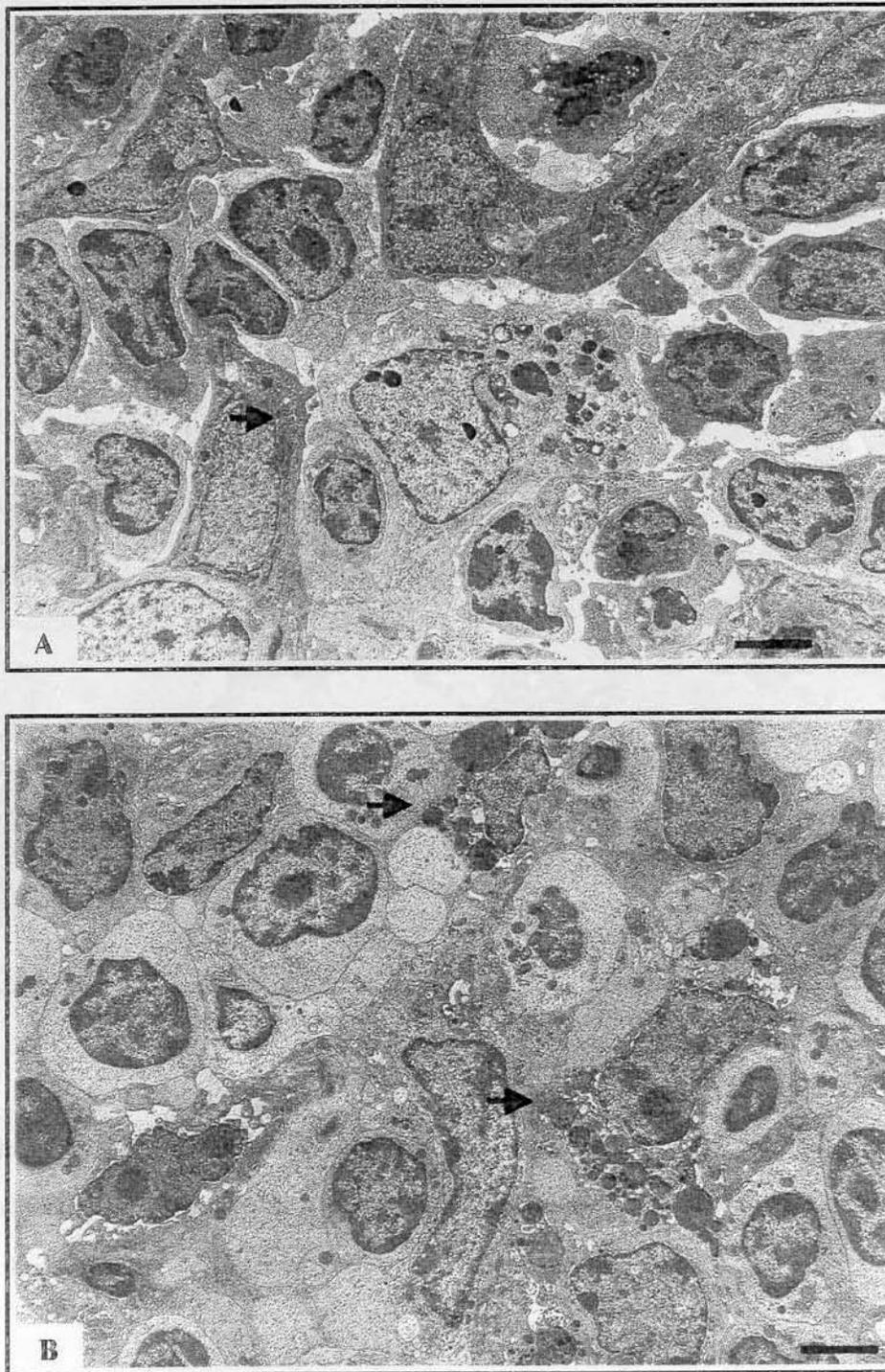


Figura 11: Micrografia eletrônica de transmissão de parte do parênquima tímico.

- (A) Animal controle. Nos animais normais observa-se a presença de macrófagos (→) com pouca substância fagocitada.
- (B) Animal infectado. 14 dias p.i.. Nestes animais observa-se um aumento no número de macrófagos (→) em intensa atividade fagocítica.

Barra = 5 μ m

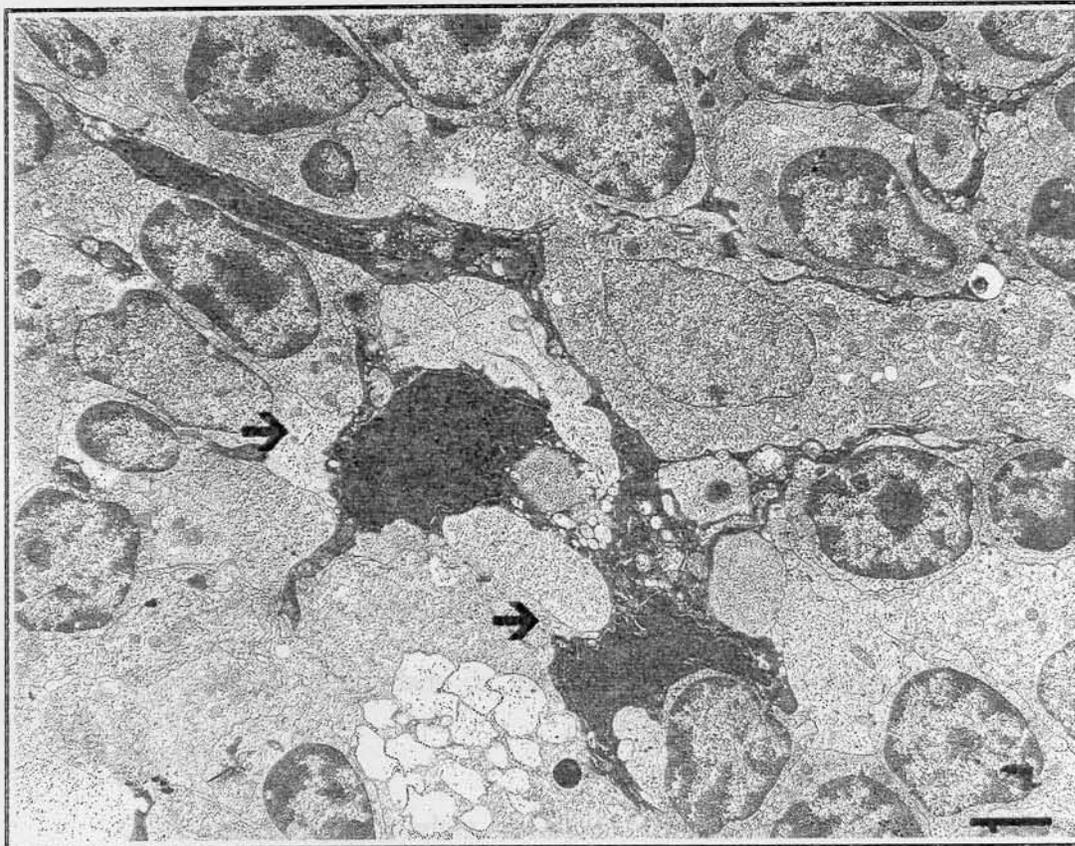


Figura 12: Micrografia eletrônica de transmissão da região medular do timo de animal infectado experimentalmente com *P. brasiliensis* (7 dias p.i.). A partir dos 7 dias p.i. observou-se um aumento no número de fibroblastos (⇒) presentes na região medular. Barra = 5 μ m

4.2.2. Medula Óssea:

A análise da medula óssea de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *P. brasiliensis* revelou alterações típicas de um processo infeccioso sistêmico. Logo no início da infecção, notou-se grande atividade celular caracterizada pela presença de grande quantidade de Reticulo Endoplasmático Rugoso e Aparelhos de Golgi hipertrofiados no interior das células. Associado a isso, observou-se também um número marcante de precursores imaturos de eosinófilo (Figura 13) a partir de 24 horas p.i., sendo que este quadro permaneceu durante todo o período experimental.

O número de megacariócitos (Figura 14) também se mostrou sensivelmente aumentado aos 5 dias de inoculação.

O quadro de reatividade da medula óssea foi observado durante todo o período experimental.

O acometimento da medula óssea pelo *P. brasiliensis* não foi observado ao longo da infecção experimental. Além disso, nenhum tipo de resposta granulomatosa, que pudesse indicar que o fungo foi capaz de invadir a medula óssea, foi detectada ao longo de toda a infecção.

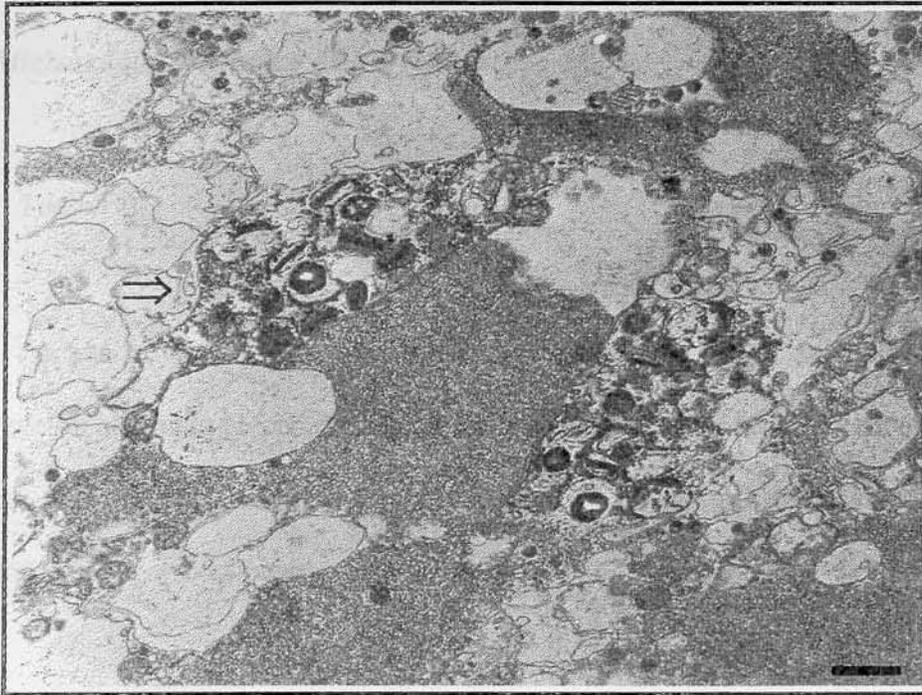


Figura 13: Micrografia eletrônica de transmissão da medula óssea. Animal infectado experimentalmente com *P. brasiliensis*. 24 horas p.i. A partir deste período observa-se um aumento de precursores imaturos de eosinófilos (⇒). Barra = 2 µm.

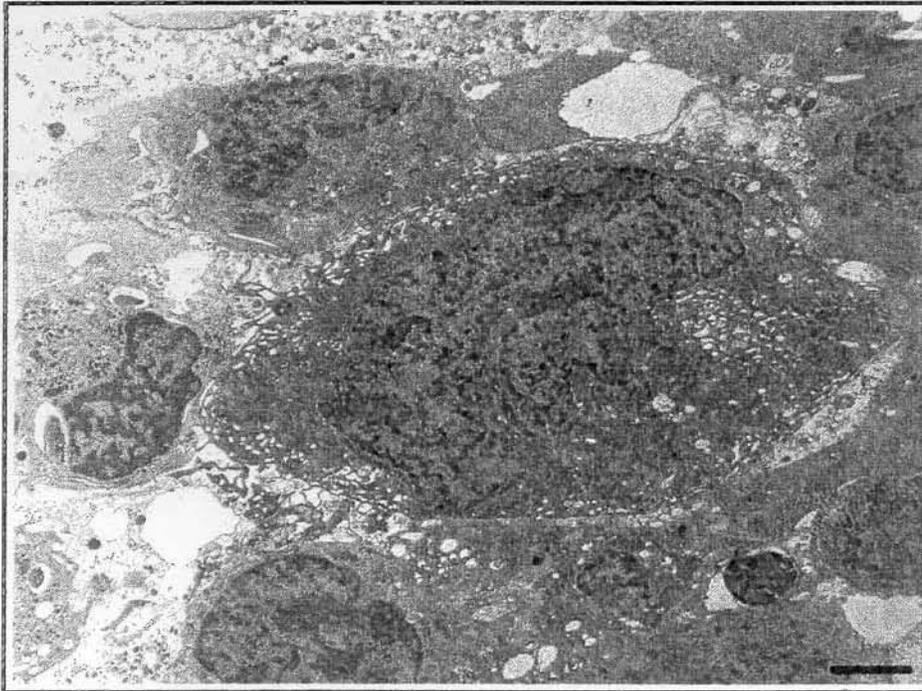


Figura 14: Micrografia eletrônica de transmissão da medula óssea. Animal infectado. 5 dias p.i. Os animais infectados apresentavam um aumento na quantidade de megacariócitos a partir dos 5 dias pós inoculação. Barra = 5 µm.

4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura:

4.3.1. Timo:

A análise do timo dos animais experimentalmente infectados com *P. brasiliensis* não revelou alteração perceptível na morfologia externa das células pertencentes ao estroma tímico. Através desta análise foi possível ainda detectar a presença do fungo neste órgão durante todo o período experimental (Figura 15).

4.3.2. Medula Óssea:

A análise da medula óssea dos animais infectados com *P. brasiliensis* (Figura 16A) não mostrou a presença do fungo neste órgão, além de nenhuma alteração marcante na morfologia externa das células e na sua distribuição quando comparado com a medula óssea dos animais controle (Figura 16B).

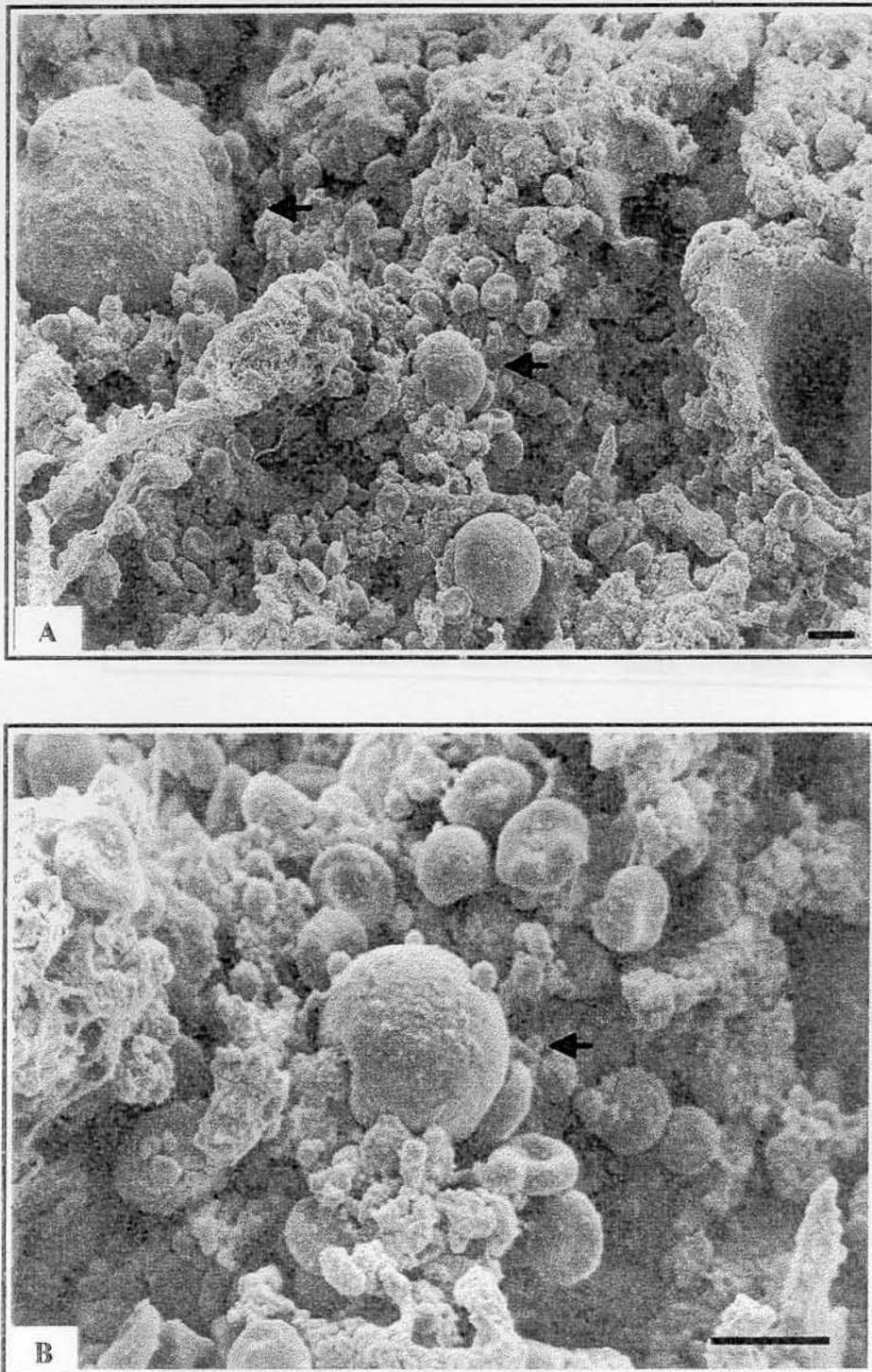


Figura 15: Micrografia eletrônica de varredura do timo.

(A) Animal experimental. 24 horas p.i.. Observou-se a presença do fungo () no estroma tímico durante todo o período experimental.

(B) Aumento maior da figura 7A.

Barra = 5 μ m

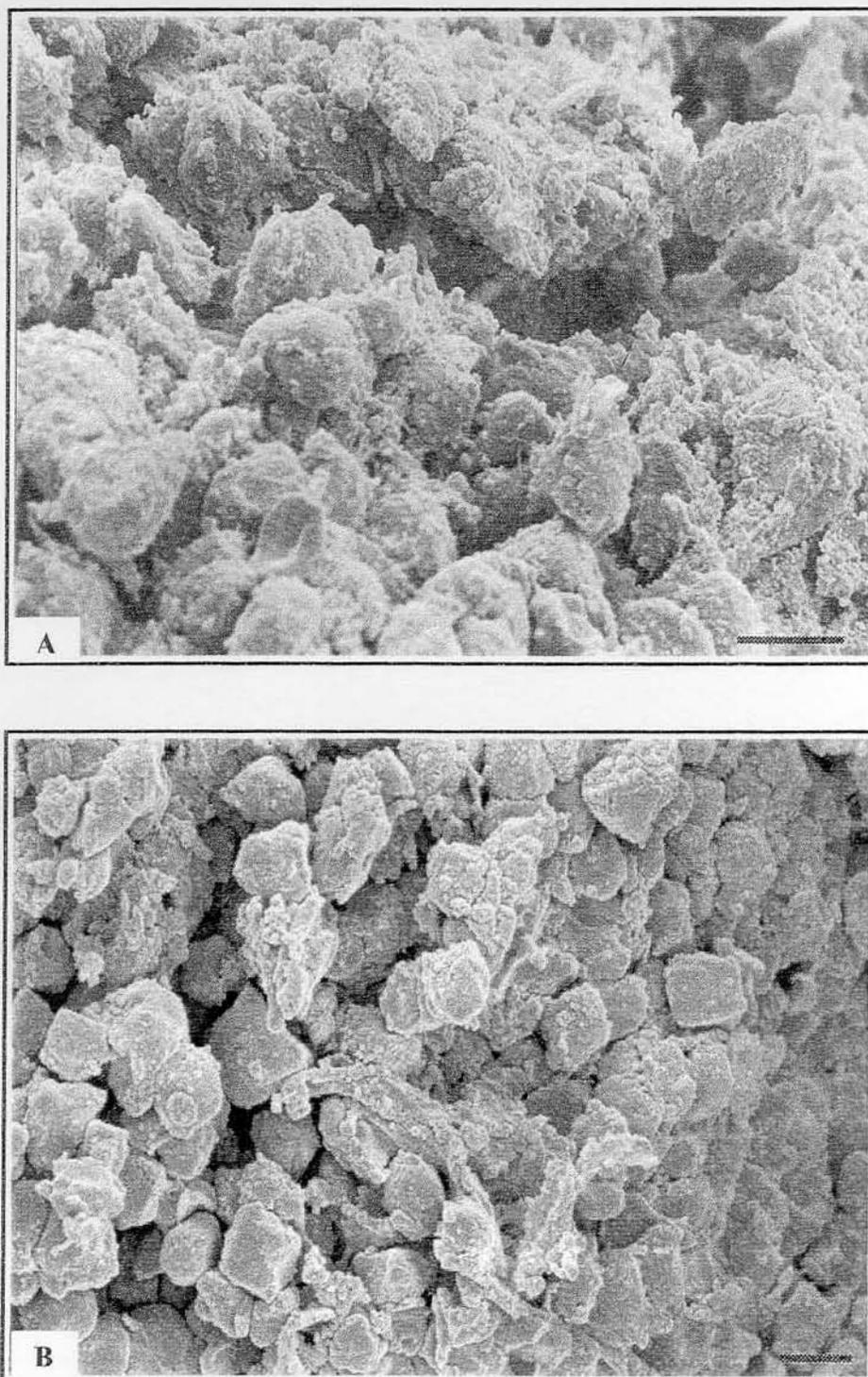


Figura 16: Micrografia eletrônica de varredura da medula óssea.

(A) Animal experimental. 7 dias p.i..

(B) Animal controle.

Barra = 5 μm

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários trabalhos propondo o envolvimento de diferentes mecanismos na depressão da resposta imune celular observada na paracoccidiodomicose têm sido publicados. Neste estudo, observamos as alterações dos órgãos linfóides primários durante a infecção experimental pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, na tentativa de melhor compreender o fenômeno da imunossupressão.

Os resultados obtidos indicam que a infecção pelo fungo é capaz de induzir uma severa atrofia tímica que tem lugar logo no início do processo infeccioso. Nossos achados sugerem, entretanto, que vários mecanismos podem estar envolvidos no processo de atrofia observado durante esta infecção.

A constatação da presença do fungo no interior do timo aponta para a possibilidade de uma ação direta do patógeno sobre o órgão. Trabalhos mostrando a ação direta de patógenos sobre o timo utilizando vários modelos experimentais têm sido encontrados na literatura. SAVINO *et al.* (1989), estudando a doença de Chagas experimental em camundongos C57Bl/6, detectaram a ocorrência de atrofia tímica com perda de células da camada cortical dos lóbulos tímicos e até mesmo desaparecimento do córtex tímico. Os autores associaram a extensa atrofia a presença de ninhos de *Trypanosoma cruzi* em meio ao parênquima tímico. PRICE *et al.* (1993), observaram, em camundongos BALB/c infectados pelo citomegalovírus murino, lesões no timo semelhantes às observadas em nosso estudo. Entre 4 e 6 dias p.i., houve perda de 80-90% das células tímicas, seguida por recuperação entre 7 e 16 dias. Os autores detectaram redução da camada cortical, perda de delimitação corticomedular, presença de focos perivasculares de neutrófilos e de infiltrado mononuclear, associadas à infecção lítica de células tímicas pelo vírus.

Em micoses, fungos do gênero *Sapronegnia*, parasitas naturais de salmonídeos, provocam uma grande alteração no microambiente tímico, com perda da regionalização

tímica e marcada redução na densidade celular do parênquima. Quando presentes no ambiente tímico, estes fungos, provocam um aumento nos danos causados a este órgão (ALVAREZ *et al.*, 1995). Em micoses humanas, estudos com o *Cryptococcus neoformans* em infecção experimental em camundongos, também correlacionam a presença do fungo no timo com várias alterações estruturais do órgão (SOTOMAYOR *et al.*, 1989).

A liberação, pelo próprio *P. brasiliensis*, de substâncias capazes de alterar a fisiologia do timo, poderia estar envolvida na atrofia observada neste tipo de infecção. A secreção de produtos fúngicos ou metabólitos no microambiente tímico tem sido relatada como responsável pela indução das alterações tímicas em infecções com diferentes fungos. A gliotoxina, por exemplo, produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, produz um quadro de imunossupressão induzindo apoptose no timo, além de baço e linfonodos (SUTTON *et al.*, 1994). A toxina T-2, produzida por *Fusarium* sp. e outros gêneros fúngicos, é responsável pela indução de imunossupressão através da redução do peso e da celularidade tímica e aumento da ocorrência de apoptose em células tímicas (ISLAM *et al.*, 1998).

Alternativamente, a atrofia tímica poderia ser causada pela ação de produtos envolvidos na formação do granuloma ou por ele liberados, uma vez que se observou uma apreciável correlação entre a atrofia do timo e a formação de granulomas. O estudo cinético dos índices dos órgãos demonstrou que o tempo máximo de atrofia tímica coincide exatamente com o pico de formação de granulomas no fígado e no baço. OZEKI *et al.* (1997), estudando a resposta de camundongos BALB/c frente à inoculação de Fator Corda Micobacteriano, um componente virulento presente na parede celular de micobactérias, também observaram uma forte correlação entre a atrofia tímica e a resposta granulomatosa. Os autores relatam ainda que, anticorpos monoclonais anti-TNF α são capazes de inibir a

atrofia tímica através da inibição da formação dos granulomas, sugerindo que a liberação de seus produtos ou fatores seriam responsáveis pela atrofia observada durante a infecção.

A participação de TNF α na indução de atrofia tímica através de uma ação direta sobre timócitos, induzindo-os à apoptose, também tem sido bastante descrita tanto em experimentos *in vivo* como *in vitro* (HERNANDEZ-CASELLES & STUTUMAN, 1993; WANG *et al.*, 1994; NORIMATSU *et al.*, 1995). De fato, estudos preliminares, realizados em nosso laboratório, indicam um aumento no nível de morte por apoptose das células tímicas na fase inicial da infecção paracoccidiodomicótica (dados não demonstrados). Em nosso modelo experimental, a apoptose das células tímicas parece ser devido à morte celular passiva desencadeada pela perda de estímulo de sobrevivência, uma vez que foi detectada uma grande quantidade de mitocôndrias com características de degeneração. Entretanto, a ocorrência da outra via de morte celular programada, mediada pelos receptores Fas/TNF, não pode ser descartada. Isso porque, FIGUEIREDO *et al.* (1993), utilizando camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis*, relataram a elevação dos níveis séricos de TNF- α a partir do 4º dia de infecção. Embora neste período nossos resultados demonstrem um decréscimo no número de células apoptóticas no timo (dados não demonstrados), existe a possibilidade de que o TNF- α produzido precocemente no local da infecção estimule a produção de outras citocinas indutoras da apoptose de timócitos.

Uma outra hipótese, seria que a involução tímica, estaria relacionada à retenção dos progenitores de linfócitos T na medula óssea. Entretanto, a análise da medula óssea não demonstrou alterações na maturação desta linhagem celular.

Apesar de existirem alguns relatos do achado de *P. brasiliensis* na medula óssea de

pacientes (CASTRO *et al.*, 1958; TERRA *et al.*, 1991; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992; OZAKI *et al.*, 1996), inclusive com a presença de granulomas típicos abrigando células gigantes (PIMENTA DE MELLO, 1955) e também em camundongos experimentalmente infectados (CALICH, comunicação pessoal), a invasão medular não foi observada em nosso modelo de estudo. Tal discrepância de resultados pode ser decorrente do fato da linhagem BALB/c, utilizada neste estudo, apresentar susceptibilidade intermediária à infecção, mimetizando a forma moderada da paracoccidiodomicose humana (CALICH *et al.*, 1985). Estudos estão em andamento no sentido de se verificar a possível invasão da medula óssea pelo fungo em animais altamente susceptíveis à esta infecção. Nossos resultados mostram que as alterações histopatológicas, observadas na medula óssea dos animais experimentalmente infectados pelo fungo, são características de medula reativa frente a infecção sistêmica e não justificam o aparecimento da imunossupressão freqüentemente observada neste tipo de patologia. A infecção direta de células da medula óssea levando a distúrbios na hematopoiese, com conseqüente leucopenia, tem sido considerada como a causa da imunossupressão observada em algumas infecções virais humanas (RE *et al.*, 1994; MORI *et al.*, 1999). Em nosso modelo, a presença do fungo na medula óssea não pôde ser evidenciada mesmo com a utilização de técnicas imuno-histoquímicas específicas em cortes de tecido.

Uma apreciável correlação inversa entre o índice tímico e o controle da disseminação do fungo, medida pela formação de granulomas hepáticos e esplênicos, foi observada. Resultados semelhantes foram descritos por OZEKI *et al.* (1997) quando do estudo da inoculação de Fator Corda Micobacteriano em camundongos Balb/c. Estes autores observaram que o pico de atrofia do timo coincidia com o pico de hipertrofia do pulmão e que estes dois fenômenos eram dependentes da produção de TNF uma vez que a

administração de anticorpos anti-TNF inibia a atrofia tímica. Entretanto, os autores sugerem que talvez o TNF não tenha um papel direto na atrofia tímica, uma vez que não foram detectadas alterações nos níveis sistêmicos desta citocina. Assim, é possível que o TNF, que é essencial para a formação dos granulomas, seja produzido no local das lesões e desencadeie a produção de outros mediadores que agem sobre o timo induzindo-o à atrofia.

A existência de uma correlação entre a formação do granuloma e a atrofia tímica levanta duas possibilidades, ambas com o sentido de proteger o organismo. A primeira hipótese seria aquela onde mediadores inflamatórios envolvidos na gênese do granuloma induziriam a atrofia tímica para diminuir a quantidade de linfócitos liberados para a periferia com o objetivo de impedir que mais linfócitos migrassem para os focos inflamatórios, onde ampliariam os danos teciduais causados pela resposta granulomatosa que, por si só, é, muitas vezes, mais prejudicial ao organismo que o próprio microorganismo invasor. A segunda possibilidade para a reação granulomatosa induzir a atrofia do timo estaria relacionada com nossa observação de que o fungo é capaz de invadir este órgão onde células, futuramente comprometidas com a resposta imune, adquirem sua imuno-competência. A presença do fungo *P. brasiliensis* no timo, indica a quebra de possíveis barreiras que normalmente impedem a entrada de proteínas não-próprias do organismo. Neste caso, antígenos do *P. brasiliensis* poderiam ser processados e apresentados como proteínas próprias aos timócitos, que então amadureceriam tolerantes à elas. Assim, a eliminação de timócitos, durante a infecção, estaria impedindo que linfócitos tolerantes ao *P. brasiliensis* migrassem para a periferia, atrapalhando, ou até mesmo impedindo, uma resposta imune eficaz contra o fungo.

Em resumo, nossos resultados ratificam a observação prévia de que o *P. brasiliensis* é capaz de invadir o microambiente tímico, induzindo severas alterações estruturais em sua

arquitetura, o que poderia contribuir para a imunossupressão observada neste tipo de infecção. Estudos complementares, e que estão em andamento em nosso laboratório, são ainda necessários para se esclarecerem os mecanismos envolvidos neste processo. A correlação inversa observada entre a atrofia tímica e o controle da disseminação da infecção, medido pela formação dos granulomas no fígado e no baço, mostra que apesar da atrofia no timo, o animal é capaz de manter o fungo, ainda que vivo, em granulomas compactos e bem formados impedindo assim o seu espalhamento pelo organismo. O possível envolvimento da medula óssea no processo de imunossupressão durante a infecção paracoccidioidomicótica ainda não nos é totalmente claro e, neste sentido, mais experimentos são imprescindíveis para uma posição firme em relação à sua não participação neste fenômeno.

VI. CONCLUSÕES

A invasão do timo pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, levando o órgão à severa atrofia, as marcantes alterações ultra-estruturais tímicas observadas e a acentuada correlação inversa entre o índice tímico e o controle da disseminação fúngica encontradas no presente trabalho, denotam um profundo acometimento deste órgão linfóide primário durante o desenvolvimento da infecção paracoccidioidomicótica.

Estes achados nos levam a supor que a ação, direta ou indireta, do fungo sobre o timo pode estar relacionada com o fenômeno de imunossupressão frequentemente observado nesta infecção. Entretanto, outros estudos são ainda necessários para a completa determinação das possíveis causas e conseqüências desta ação com o objetivo de se melhor entender a dinâmica fungo-imunossupressão-doença.

VII. ABSTRACT

SOUTO, P.C.S. **Ultrastructural Analysis of Primary Lymphoid Organs of *Paracoccidioides brasiliensis* – Infected Mice.** Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

Paracoccidioidomycosis, a deep mycosis caused by the dimorphic fungus *P. brasiliensis*, is endemic in Brazil and other Latin American Countries. Many works have shown that immunosuppressive effects induced by systemic mycosis can be related to primary lymphoid organ damages. Previous studies in our laboratory have already showed histopathological alterations in thymus and bone marrow at different phases of this experimental infection. In this study we evaluated (i) the correlation between thymic atrophy and granuloma formation and (ii) ultrastructural alterations in primary lymphoid organs induced by *P. brasiliensis*-infected mice. Therefore, BALB/c male mice were inoculated i.p. with 5×10^6 yeasts and evaluated in relation to alterations in thymus and bone marrow, and control of fungal dissemination. It was observed that *P. brasiliensis* was able to invade the thymus, that suffered severe atrophy with alterations in its cellular components. On the other hand, the presence of fungus in bone marrow was not observed. This organ presented only alterations common to a systemic reaction front to an infectious process. Besides, an appreciable inverse correlation between the degree of thymic atrophy and the extent of granuloma formation could be observed. Thus, our results suggest that *P. brasiliensis* is capable to induce many ultrastructural alterations in the thymus, as mitochondria degeneration, an increase of Golgi apparatus and an augment of macrophages with debris, that could facilitate its persistence in host.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.*
- BAGAGLI, E.; SANO, A. & COELHO, K.I. 1998. *Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus novemcinctus) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **58**: 505-512.*
- BERNARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; JUVENALI, M.; MIRANDA, E.T. & DUARTE, A.J.S. 1997. *Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two Paracoccidioides brasiliensis glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, **175**: 1263-1267.*
- BRITO, V.N.; SOUTO, P.C.S.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; VASSALLO, J.; RICCI, L.C. & VERINAUD, L. 2002a. *Early histopathological changes in bone marrow of Paracoccidioides brasiliensis-infected mice. **Braz. J. Morphol. Sci.** In press.*
- BRITO, V.N.; SOUTO, P.C.S.; RICCI, L.C.; CRUZ-HÖFLING, M.A. & VERINAUD, L. 2002b. *Thymic invasion and atrophy induced in Paracoccidioides brasiliensis-infected mice. **Med. Mycol.** In press.*
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E. & RESTREPO, A. 1993. *Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6**: 89-117.*

- 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.
- CASTRO, R.M.; BASSOI, O.N.; DEL NEGRO, G. & FARIA, C.V. 1958. *Dificuldades diagnósticas na blastomicose sul-americana*. **Rev. Paul. Med.**, **53**: 479-496.
- 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, p. 69-84.
- FIGUEIREDO, F.; ALVES, L.M.C. & SILVA, C.L. 1993. *Tumor necrosis factor production in vivo and in vitro in response to Paracoccidioides brasiliensis and the wall fractions thereof*. **Clin. Exp. Immunol.**, **93**: 189-194.
- FRANCO, M. 1987. *Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, **25**: 5-18.

FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. & DEL NEGRO, G.

Paracoccidioidomycosis. Marcelo Franco *et al.* eds. CRC Press, Inc. Boca Raton, Ann Arbor, USA, 1994.

FRANCO, M.; MENDES, R.P. & MOSCADI-BACCHI, M. 1989. *Paracoccidioidomycosis*.

Baillière's Clin. Trop. Med. Comm. Dis., 4: 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.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIÉRREZ, F.; ROBIEDO, M.; LONDOÑO, F.;

HERNANDEZ, H.; SIERRA, F. & CALLE, G. 1976. *Pathogenesis of Paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients*. **Mycopathologia, 58:** 63-70.

GOLDANI, L.Z. & SUGAR, A.M. 1995. *Paracoccidioidomycosis and AIDS: an Overview*.

Clin. Infect. Dis., 21:1275-1281.

HERNANDEZ-CASELLES, T. & STUTUMAN, O. 1993. *Immune function 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 concentration of mitogenic co-stimulation. **J. Immunol., 151:** 3999-4012.

HOTCHKISS, R.S.; SWANSON, P.E.; COBB, J.P.; JACOBSON, A.; BUCHMAN, T.G. & KARL, I.E. 1997. *Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: Findings in normal and T-and B-cell-deficient mice. Crit. Care Med. 25: 1298-1307.*

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.*

JIMENEZ-FINKEL, B.E. & MURPHY, J.W. 1988a. *Characterization of efferent T supressor cells induced by Paracoccidioides brasiliensis-specific afferent T supressor cells. Infect. Immun., 56: 744-750.*

JIMENEZ-FINKEL, B.E. & MURPHY, J.W. 1988b. *Induction of antigen-specific T supressor cells by soluble Paracoccidioides brasiliensis antigen. Infect. Immun., 56: 734-743.*

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

LACAZ, C.S. 1949. *Novos dados em relação a blastomicose sul americana e seu agente etiológico. Rev. Med. Cir. S. Paulo, 9: 303-340.*

- LUTZ, A. 1908 *Una mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. contribuição ao conhecimento das Hyphoblastomycoses Americanas. Brasil-med., 22:121-124;141-144.*
- MEDINA, H. & BODZIAK-JUNIOR, C. *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.*
- MOK, P.W.Y. & GREER, D.L. 1997. *Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. Clin. Exp. Immunol., 28: 89-98.*
- MONTENEGRO, J. 1927. *Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. Brazil-med., 41: 808-812.*
- MORI, T.; NAKAMURA, M.; SHIMIZU, K.; IKEDA, Y. & ANDO, K. 1999. *In vivo disturbance of hematopoiesis in mice persistently infected with murine cytomegalovirus: impairment of stromal cell function. Virology, 253: 145-154.*
- NORAMATSU, M; ONO, T.; AOKI, A.; OHISHI, K. & TAMURA, Y. 1995. *In vivo induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolisaccharides. J. Med. Microbiol., 43: 251-257.*

OZAKI, K. S.; MUNHOZ-JUNIOR, S.; PINHEIRO, E.K.; TADANO, T. & FONTES, C.J.F. 1996. *Diagnóstico de paracoccidiodomicose disseminada grave em aspirado de medula óssea: relato de caso. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **29**: 263-366.

OZEKI, Y.; KANEDA, K.; FUJIWARA, N.; MORINOTO, 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.

PERAÇOLI, M.T.S. 1978. *Paracoccidiodomicose 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].*

PIMENTA DE MELLO, R. 1955. *Granuloma blastomicótico de medula óssea. O Hospital*, **48**: 135-138.

PRICE, P.; OLVER, S.D.; GIBBONS, A.E.; TEO, H.K. & SHELLAM, G.R. 1993. *Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. Immunol. Cell Biol.*, **71**: 155-165.

RE, M.C.; FURLINI, G.; ZAULI, G. & LA PLACA, M. 1994. *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human hematopoietic progenitor cells. Arch. Virol.* **137**: 1-23.

- RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, 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**: 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.
- 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.
- SAVINO, W.; LEITE-DE-MORAES, M.C.; 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.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A.; HIGAKI, Y.; UIP, E.D.; MORI, N.S.; DEL NEGRO, G.; MELO, N.T.; HUTZLER, R.U. & AMATO NETO, V. 1992. *Comprometimento da medula óssea e eosinofilia na paracoccidioidomicose.* **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **34**: 85-90.

SILVA, M.R.; MARQUES, A.S.; CAMPOS, D.S.; TABOADA, D.C.; SOARES, G.H.; BRASCHER, H.M.; VARGENS-NETO, J.R.; CRUZ, M.Q.; LABARTHE, N.V.; ROCHA, G.L. & LIMA, A.O. 1981. *Imunologia na paracoccidioidomicose*. **An. Bras. Dermatol.**, **56**: 227-234.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.B.; MAFFEI, C.M.L. & 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**: 193-199.

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.

SOTOMAYOR, C.E.; RUBISTEIN, H.R., CERVI, L.; RIERA, C.M. & MASIH, D.T. 1989. *Immunosuppression in experimental cryptococcosis in rats: induction of thymic suppressor cells*. **Mycopathology**, **108**: 5-10.

STANLEY, S.K.; MCCUNE, J.M.; KANESHIMA, H.; JUSTEMENT, J.S.; SULLIVAN, M.; BOONE, E.; BASELER, M.; ADELSBERGER, J.; BONYHADI, M. & ORENSTEIN, J. 1993. *Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. J. Exp. Med.* **178**: 1151-1163.

SUTTON, P.; NEWCOMBE, N.R.; WARING, P. & MÜLLBACHER, A. 1994. *In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. Infect. Immun.*, **62**: 1192-1198.

TEIXEIRA, H.C; CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; D'IMPERIO-LIMA, M.R. & RUSSO, M. 1987. *Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. Braz. J. Med. Biol. Res.*, **20**: 367-369.

TERRA, G.M.F.; RIOS-GONÇALVES, A.J.; LONDERO, A.T.; BRAGA, M.P.; OURICURI, A.L.; MESQUITA, C.C.; MARINHO, J.C.A.; ERVILHA, L.M.; VIEIRA, A.R.M.; DEKER-MACHER, S. & DUARTE, D.M.A. 1991. *Paracoccidioidomicose em crianças: apresentação de casos. Sup. Arq. bras. Med.*, **65**: 8-15.

TREXLER, P.C. 1959. *The use of plastic in the design of an isolator system. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **78**: 29-36.

VERINAUD, L.; CAMARGO, I.J.B.; VASSALLO, J.; SAKURADA, J.K. & RANGEL, H.A. 1999. *Lymphoid organ alterations enhanced by sublethal doses of coronaviruses in experimentally induced Trypanosoma cruzi infection in mice*. **Lab. Anim. Science**, 49: 35-41.

VERINAUD, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; SAKURADA, J.K.; RANGEL, H.A.; VASSALLO, J.; WAKELIN, D.; SEWELL, H.B. & CAMARGO, I.J.B. 1998. *Immunodepression induced by Trypanosoma cruzi and Mouse Hepatitis Virus type 3 is associated with thymus apoptosis*. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, 5: 186-191.

WANG, S.D.; HUANG, K.J.; LIN, Y.S. & LEI, H.Y. 1994. *Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice*. **J. Immunol.**, 152: 5014-5021.