



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Vânia Niéto Brito

***“ATROFIA TÍMICA NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
EXPERIMENTAL: INFLUÊNCIA DA VIRULÊNCIA
FÚNGICA, DA LINHAGEM MURINA E DE CITOCINAS
PRÓ-INFLAMATÓRIAS.”***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
VÂNIA NIETO BRITO
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Liana Verinaud

Campinas

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Brito, Vânia Niéto

B777a

Atrofia tímica na paracoccidioidomicose experimental: influência da virulência fúngica, da linhagem murina e de citocinas pró-inflamatórias / Vânia Niéto Brito. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Liana Maria Cardoso Verinaud.

**Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.**

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Paracoccidioidomicose. 3. Timo. 4. Atrofia Tímica. 5. Fator de necrose tumoral. 6. Interferon-gama. I. Liana Verinaud. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Thymic atrophy during experimental paracoccidioidomycosis: influence of fungal virulence, murine strain and pro-inflammatory cytokines.

Palavras-chave em inglês: *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, thymus, atrophy, tumor necrosis factor, interferon-gamma.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Doutorado.

Banca examinadora: Liana Maria Cardoso Verinaud, Maria Esther Salles Nogueira, Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro, Clarice Weis Arns, Maria Cristina Roque-Barreira.

Data da defesa: 09/06/2005.

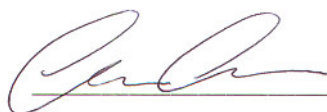
Campinas, 9/6/2005

BANCA EXAMINADORA

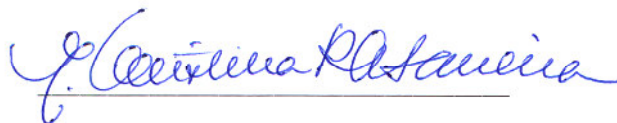
Profª. Drª. Liana Verinaud (Orientadora)



Profª. Drª. Clarice Weiss Arns



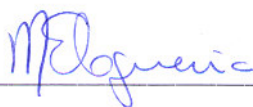
Profª. Drª. Maria Cristina Roque Antunes Barreira



Profª. Drª. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro



Profª. Drª. Maria Esther Salles Nogueira



Profª. Drª. Maria Alice da Cruz Hofling

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

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 CAPES, do FAEP/UNICAMP e da FAPESP (Processo # 03/01891-4).

“Vá até onde puder ver; quando lá chegar poderá ver ainda mais longe.”

Goethe

“A ciência tem as raízes amargas, mas os frutos são muito doces.”

Aristóteles

*Mãe, em sua doçura, bondade, infinito
amor e imparcial dedicação,
foi sempre meu alento.*

*Pai, com seu amor, sua confiança total
e suas palavras encorajadoras, foi
sempre meu grande incentivador.*

*Rô, sua disciplina, competência e força
foram sempre grande fonte inspiração.*

*Minha pequena e querida família,
dedico esta tese a vocês, sem os quais eu não seria
o que sou e a quem devo mais esta etapa de minha vida.*

Agradecimentos

A Deus, pelas oportunidades recebidas e pela força necessária para concretizá-las.

À minha família, Pai, Mãe, Rose e Tia Nena, pelo amor e incentivo constantes.

À Liana Verinaud, minha orientadora e inspiradora, pelo profundo carinho demonstrado; por acreditar em meu trabalho e permitir que eu alçasse meus próprios vôos, ainda que para longe; pelas grandes discussões sobre Imunologia que me fizeram imunologista.

Aos meus tios, Maria Aparecida e Alcindo e toda sua família, que me receberam com muito carinho em sua casa.

Às minhas grandes amigas Jacy e Paula, co-fundadoras da linha de pesquisas em paracoccidiodomicose no laboratório, pelo carinho e grande amizade em todos os momentos e pela ajuda nas tarefas diárias e nas discussões técnicas e científicas dos trabalhos.

Aos meus queridos amigos Livia, Janaína, Camila, Carol, Eliane e Wagner que tornaram mais leve e alegre minha estada em Campinas.

Aos queridos amigos do Laboratório 5, Peroni, Cristina, Márcio e Juliete, nossa convivência harmônica, amizade concreta e colaboração constante deixam muitas saudades.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por toda a colaboração e, em especial, Rose e Marcos César, pela contribuição técnica que se transformou em amizade, Dirce e José Raimundo pelo auxílio em muitos procedimentos e Lúcia e Lurdes pelo apoio em questões burocráticas.

Aos colegas de pós-graduação e estagiários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela convivência cordial e tantos favores prestados.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos conhecimentos compartilhados, pelas sugestões nos protocolos experimentais e pelo uso de equipamentos e reagentes.

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

À Prof^ª Dr^ª Maria Alice da Cruz-Höfling por sua colaboração ao longo do trabalho e tantas sugestões oferecidas.

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

Ao Prof. Dr. José Vassallo e a equipe do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM-UNICAMP, em particular ao biólogo Cristiano, pelo valioso auxílio na padronização da técnica de imuno-histoquímica para detecção de citocinas in situ.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, pela doação dos camundongos nocautes para TNFRp55.

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

À Prof^ª Dr^ª Clarice W. Arns, à Prof^ª Dr^ª Maria Cristina Roque-Barreira e à Dra. Maria Esther Salles Nogueira, pela participação como membros da banca examinadora.

Aos colegas do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo carinho e estímulo para a finalização desta tese, especialmente a Telma pelo seu empenho na impressão.

RESUMO

O timo é o local de maturação dos linfócitos T que coordenam a resposta imune após o reconhecimento de antígenos; apesar disso, torna-se alvo em diversas infecções. O *P. brasiliensis*, causador da paracoccidioidomicose, é capaz de invadir o timo e induzir atrofia deste órgão em animais experimentais. Neste estudo, foi analisada a influência da virulência fúngica (cepas Pb18 e Pb265), da linhagem murina (A/J e B10.A) e de citocinas pro-inflamatórias (TNF e IFN- γ) nesse fenômeno. As leveduras da cepa virulenta Pb18 persistiram no timo por um período maior e induziram alterações histopatológicas mais intensas, embora o isolado Pb265, de baixa virulência, também tenha causado atrofia. O padrão de atrofia, caracterizado por perda de peso do órgão, aumento na taxa de apoptose e perda de delimitação corticomedular foi semelhante nas duas linhagens, contudo os camundongos B10.A apresentaram também alterações quantitativas nas subpopulações de timócitos e linfócitos T esplênicos. A infecção fúngica também provocou a depressão da resposta proliferativa frente à ConA de timócitos e esplenócitos de camundongos B10.A por um período mais prolongado do que de animais da linhagem A/J. Em ambas as linhagens, a infecção provocou aumento na porcentagem de linfócitos T esplênicos de fenótipo CD4+CD8+. Houve redução no número de células tímicas positivas para TNF e IFN- γ após infecção com o *P. brasiliensis*. Utilizando-se camundongos deficientes para o receptor p55 de TNF ou para a produção de IFN- γ , verificou-se que o TNF medeia o aumento na apoptose de timócitos pós-infecção enquanto a perda de peso e da delimitação corticomedular são desencadeadas pelo IFN- γ . Nossos resultados indicam que a atrofia tímica observada na paracoccidioidomicose experimental envolve a interação de fatores relacionados ao fungo e ao hospedeiro, que podem influenciar o curso da doença.

SUMMARY

Thymus is the site of T cells maturation that orchestrates specific immune response following antigen recognition. In spite of this, it can be a target during many infectious diseases. *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiological agent of paracoccidioidomycosis, is able to invade the thymus inducing atrophy in experimental models. In this study, it was analyzed the influence of fungal virulence (Pb18 and Pb265 isolates), murine strain (A/J e B10.A) and pro-inflammatory cytokines (TNF e IFN- γ) in this phenomenon. Yeasts from virulent strain Pb18 persisted for a larger period in the thymus and induced stronger histopathological alterations, although poorly virulent Pb265 also has induced thymic atrophy. The pattern of atrophy that embodied organ weight decreases, increases in the apoptotic levels and the loss of corticomedullary delimitation was similar in both strains. However, B10. A strain also presented quantitative changes in the thymic and splenic T cell subpopulations. This strain showed a decreased proliferative response of thymocytes and splenocytes to Concanavalin A for a larger period than A/J strain, as well. Both strains had augmentation in the percentage of splenic CD4+CD8+ T cells. There was reduction in the amount of cells positive to TNF and IFN- γ in the thymus after infection with *P. brasiliensis*. By using mice deficient to production of IFN- γ or to p55 receptor of TNF it was seen that the TNF mediates the increase of apoptosis that takes place in the thymus after the infection, whereas organ weight decreases and loss of corticomedullary delimitation are performed by IFN- γ . Our results suggest that thymic atrophy observed during experimental paracoccidioidomycosis involves interaction of fungal and host related factors and, most probably, influences the course of disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)
ATP_e	Adenosine triphosphate extracelular (Adenosina trifosfato extracelular)
ConA	Concanavalina A
CSA	Catalyzed signal amplification (Amplificação catalizada de sinal)
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)
FADD	Fas associated death domain (Domínio de morte associado ao FAS)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
HIV	Human immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência humana)
ICAM	Intercellular adhesion molecule (Molécula de adesão intercelular)
IFN-γ	Interferon-gama
IFN-γ^{-/-}	Camundongo nocaute para interferon-gama
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Inductible nitric oxide synthase (Oxido nítrico sintase induzível)
ip	Intraperitonal
LD₅₀	Lethal dose 50% kill (Dose letal para 50%)
LIF	Leukemia inhibitory factor (Fator inibidor de leucemia)
LPS	Lipopolissacárideo

M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor (Fator estimulador de colônias de macrófagos)
MHC	Major histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)
MHV	Murine hepatitis virus (Vírus da hepatite murina)
MHV-3	Murine hepatitis virus-3 (Vírus da hepatite murina tipo 3)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Dimetiltiazol-2-il difenil brometo de tetrazolio)
NK cells	Natural killer cells (Células <i>natural killer</i>)
NO	Nitric oxide (Óxido nítrico)
OPD	Orto-fenil-diamina
OSM	Oncostatina M
PBS	Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato)
PE	Phicoeritrin (Ficoeritrina)
pi	Pós-inoculação
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucléico)
SDS	Sodium dodecylsulfate (Dodecil sulfato de sódio)
SIV	Simian immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência símia)
SPF	Specific pathogen free (Livre de patógenos específicos)
TCR	T cell receptor (Receptor de linfócito T)
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase (deoxinucleotidil transferase terminal)
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNC	Thymic nurse cell (Células “nurse” do timo)

TNF	Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)
TNFRp55	Tumor necrosis factor receptor p55 (Receptor p55 do fator de necrose tumoral)
TNFRp75	Tumor necrosis factor receptor p75 (Receptor p75 do fator de necrose tumoral)
TNFRp55^{-/-}	Tumor necrosis factor receptor p55 knockout mice (Camundongo nocaute para o receptor p55 do fator de necrose tumoral)
TNFRp75^{-/-}	Tumor necrosis factor receptor p75 knockout mice (Camundongo nocaute para o receptor p75 do fator de necrose tumoral)
TNFRp55^{-/-}p75^{-/-}	Tumor necrosis factor receptor p55 and p75 knockout mice (Camundongo duplo nocaute para os receptores p55 e p75 do fator de necrose tumoral)
TRADD	TNF-R1-associated death domain (Domínio de morte associado ao receptor TNFR1)
Treg	Linfócitos T regulatórios
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Avaliação do peso do timo em camundongos A/J e B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	38
Figura 2:	Avaliação da celularidade do timo em camundongos A/J e B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	39
Figura 3:	Córtex tímico em camundongos A/J infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	41
Figura 4:	Apoptose no timo de camundongos A/J infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	42
Figura 5:	Perda da delimitação corticomedular no timo de camundongos A/J infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	44
Figura 6:	Timo e linfonodo paratímico de camundongos A/J infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	45
Figura 7:	Infiltrado inflamatório na cápsula tímica de camundongos A/J infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	47
Figura 8:	Córtex tímico em camundongos B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	49
Figura 9:	Apoptose no timo de camundongos B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	50
Figura 10:	Perda de delimitação corticomedular no timo de camundongos B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	51
Figura 11:	Rarefação do córtex tímico em camundongos B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	52
Figura 12:	Linfonodos paratímicos de camundongos B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	54
Figura 13:	Infiltrado inflamatório no timo e cápsula tímica de camundongos B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> . Coloração HE.	56

Figura 14:	Avaliação da área total do timo em camundongos A/J e B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	57
Figura 15:	Avaliação da razão entre córtex e medula no timo de camundongos A/J e B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	58
Figura 16:	Análise ultra-estrutural do timo de camundongos A/J inoculados com <i>P. brasiliensis</i> .	60
Figura 17:	Ultra-estrutura do timo de camundongos A/J inoculados com <i>P. brasiliensis</i> .	61
Figura 18:	Análise ultra-estrutural do timo de camundongos B10.A inoculados com <i>P. brasiliensis</i> .	63
Figura 19:	Ultra-estrutura do timo de camundongos B10.A inoculados com <i>P. brasiliensis</i> .	64
Figura 20:	Avaliação das subpopulações de timócitos em camundongos A/J infectados com <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo.	65
Figura 21:	Avaliação das subpopulações de timócitos em camundongos B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo.	66
Figura 22:	Imuno-histoquímica para detecção <i>in situ</i> de IFN- γ e TNF em camundongos controles ou infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	70
Figura 23:	Avaliação do peso do timo em camundongos C57Bl/6 wt, IFN- $\gamma^{-/-}$ e TNFRp55 $^{-/-}$ infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	71
Figura 24:	Timo de camundongos C57Bl/6 wt ou IFN- $\gamma^{-/-}$ controles ou infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	73
Figura 25:	Timo de camundongo C57Bl/6 TNFRp55 $^{-/-}$ controle ou infectado com <i>P. brasiliensis</i> .	74
Figura 26:	Apoptose no timo de camundongos C57Bl/6 wt infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	76

Figura 27:	Apoptose no timo de camundongos C57Bl/6 TNFRp55 ^{-/-} infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	77
Figura 28:	Infiltrados inflamatórios induzidos por <i>P. brasiliensis</i> (cepa Pb18) em baço e fígado de camundongos A/J e B10.A.	80
Figura 29:	Granulomas induzidos por <i>P. brasiliensis</i> (cepa Pb18) em camundongos A/J e B10.A.	81
Figura 30:	Granulomas induzidos por <i>P. brasiliensis</i> (cepa Pb18) em camundongos B10.A.	82
Figura 31:	Avaliação das subpopulações linfocitárias no baço de camundongos A/J infectados com <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo.	83
Figura 32:	Avaliação das subpopulações linfocitárias no baço de camundongos B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo.	84
Figura 33:	Avaliação da resposta proliferativa frente à ConA de timócitos de camundongos A/J e B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> .	85
Figura 34:	Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos de camundongos A/J e B10.A infectados com <i>P. brasiliensis</i> frente à ConA.	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	2
1.2. Paracoccidioidomicose	4
1.3. Paracoccidioidomicose Experimental	6
1.4. Timo	9
1.5. O Timo como Alvo em Infecções	12
1.6. Interferon-gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF)	17
1.7. Papel do TNF e do IFN- γ no Timo	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Animais	25
3.2. Fungos	25
3.3. Preparo do Inóculo	26
3.4. Avaliação da Influência da Virulência do <i>P. brasiliensis</i> na Indução de Atrofia Tímica em Camundongos Susceptíveis e Resistentes.....	27
3.4.1. Infecção Experimental	27
3.4.2. Sacrifício e Coleta de Material	27
3.4.3. Avaliação do Peso do Timo	27
3.4.4. Avaliação da Celularidade do Timo	27
3.4.5. Avaliação da Viabilidade do <i>P. brasiliensis</i> no Timo	28
3.4.6. Análise Histopatológica do Timo	28
3.4.7. Detecção de Morte Celular por Apoptose no Timo	29
3.4.8. Detecção Imuno-histoquímica do <i>P. brasiliensis</i> no Timo	29
3.5. Caracterização das Alterações Morfofisiológicas no Timo de Camundongos Susceptíveis e Resistentes à Paracoccidioidomicose Experimental.....	30

3.5.1. Infecção Experimental	30
3.5.2. Análise Morfométrica	30
3.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
3.5.4. Citometria de Fluxo	31
3.6. Avaliação da Participação de Citocinas Pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) na Atrofia Tímica	33
3.6.1. Dosagem de TNF e IFN- γ por ELISA	33
3.6.2. Detecção <i>In Situ</i> de TNF e IFN- γ no Timo	33
3.6.3. Infecção Experimental de Camundongos TNFRp55 ^{-/-} e IFN- γ ^{-/-}	34
3.7. Avaliação da Resposta Imunológica	35
3.7.1. Análise das Lesões Induzidas pelo <i>P. brasiliensis</i> no Fígado e no Baço ..	35
3.7.2. Análise das Subpopulações de Linfócitos T no Baço	35
3.7.3. Resposta Proliferativa frente à Concanavalina A	35
3.8. Análise Estatística	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Influência da Virulência do <i>P. brasiliensis</i> na Indução de Atrofia Tímica em Camundongos Susceptíveis e Resistentes	38
4.1.1. Peso do Timo	38
4.1.2. Celularidade no Timo	39
4.1.3. Achados Histopatológicos no Timo	40
4.1.4. Viabilidade do <i>P. brasiliensis</i> no Timo	55
4.2. Alterações Morfofisiológicas no Timo de Camundongos Susceptíveis e Resistentes à Paracoccidioidomicose Experimental	57
4.2.1. Análise Morfométrica	57
4.2.2. Análise Ultra-estrutural	59
4.2.3. Quantificação das Subpopulações de Timócitos	65
4.3. Participação de Citocinas Pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) na Atrofia Tímica ..	67

4.3.1. Dosagem Sérica	67
4.3.2. Dosagem no Sobrenadante do Macerado de Timo e Baço	67
4.3.3. Detecção <i>In Situ</i> de TNF e IFN- γ no Timo	67
4.3.4. Infecção Experimental em Camundongos TNFRp55 ^{-/-} e IFN ^{-/-}	71
4.4. Análise de Parâmetros da Resposta Imunológica em Camundongos A/J e B10.A Infectados com <i>P. brasiliensis</i>	78
4.4.1. Análise Histopatológica das Lesões Induzidas pelo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em Fígado e Baço.....	78
4.4.2. Quantificação das Subpopulações Linfocitárias no Baço	83
4.4.3. Resposta Proliferativa frente a Concanavalina A	85
5. DISCUSSÃO.....	87
5.1. Virulência do <i>P. brasiliensis</i> e Atrofia Tímica em Camundongos Susceptíveis e Resistentes.....	89
5.2. Alterações Morfofisiológicas no Timo de Camundongos Susceptíveis e Resistentes Infectados com a Cepa Pb18	94
5.3. Participação de Citocinas Pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) na Atrofia Tímica..	96
5.4. Influência da Inoculação de <i>P. brasiliensis</i> na Resposta Imunológica Sistêmica..	103
5.5. Considerações Finais e Perspectivas.....	107
6. CONCLUSÕES.....	110
7. REFERÊNCIAS.....	112
ANEXOS	136
Artigo 1	137
Artigo 2	141

Introdução

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis*

O *Paracoccidioides brasiliensis*, descrito por Lutz em 1908, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose. Esse fungo, anteriormente tido como um deuteromiceto, foi realocado dentro do reino Fungi e classificado como pertencente ao Filo Ascomycota, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae, através de comparação filogenética baseada nas seqüências de RNA ribossomal (Leclerc et al., 1994).

Nos tecidos do hospedeiro e em laboratório, quando incubado a 37°C, o *P. brasiliensis* apresenta-se como levedura. As colônias são moles e rugosas, de coloração creme, compostas por células ovais ou alongadas que variam de 4 a 30 µm e possuem múltiplos brotamentos. Se cultivado à temperatura ambiente, o *P. brasiliensis* desenvolve-se sob a forma de colônias brancas, pequenas e de contornos irregulares, cobertas por um curto micélio aéreo; esta é, provavelmente, a forma como o fungo ocorre no ambiente natural. Microscopicamente, a forma micelial é constituída por hifas finas e septadas, enquanto as leveduras apresentam-se como células mães rodeadas por células filhas menores, que compõem a forma característica do fungo em roda de leme (revisto por Brummer et al., 1993).

Embora existam ainda incertezas sobre o seu habitat natural, o *P. brasiliensis* parece viver saprofiticamente na natureza, provavelmente no solo (Medina & Bodziat, 1949) ou em restos de vegetais (Lacaz, 1949). Corrobora esta hipótese o fato do *P. brasiliensis* ter sido isolado no solo de Brasil, Argentina e Venezuela, áreas onde a paracoccidioidomicose é endêmica (revisto por Silva-Vergara et al., 1998), e, mais recentemente, em tatus de áreas com alta incidência da doença (Bagagli et al., 1998).

Regiões com temperaturas amenas, vegetação abundante e umidade parecem ser ideais para o desenvolvimento das formas saprofíticas do *P. brasiliensis* (Restrepo, 1985) que infectam o homem e animais (Franco et al., 2000). Nesse contexto, o tatu pode representar um marcador epidemiológico da doença (Restrepo et al., 2001).

A infecção humana dá-se pela inalação de propágulos do *P. brasiliensis*, tais como conídios e esporos sexuais, produzidos pela forma micelial, que sofrem dispersão aérea e alojam-se nos pulmões. No tecido pulmonar, o fungo assume a forma de levedura, o que constitui uma etapa fundamental para a colonização do hospedeiro (revisto por Franco, 1986).

As partículas fúngicas inaladas sofrem a ação do sistema imune e, na maioria das vezes, são eliminadas sem ocorrência de sintomatologia. Por razões ainda não esclarecidas, o *P. brasiliensis* pode resistir à resposta imune e proliferar, levando à paracoccidioidomicose ou persistir viável no hospedeiro por intervalos variados de tempo, após o que ocorre a reativação do foco infeccioso e a emergência da doença (Franco et al., 1989 e Brummer et al., 1993). Assim, a conjunção de fatores do hospedeiro, do ambiente e do próprio fungo dita a ocorrência desta micose.

Diferentes cepas de *P. brasiliensis* variam quanto à virulência. Este fenômeno pode estar relacionado com variações na composição da parede do fungo que influenciam sua susceptibilidade aos mecanismos imunológicos do indivíduo, influenciando o curso da doença (Franco, 1986).

Os isolados empregados neste estudo foram classificados por Singer-Vermes et al. (1989) de acordo com sua virulência. O isolado Pb18 que mostrou um baixo valor de LD50, elevado número de lesões peritoniais e disseminação para vários

órgãos, notadamente, fígado, baço e pulmões, foi classificado como altamente virulento, enquanto, o isolado Pb265 foi considerado como fracamente virulento por não apresentar letalidade, induzir poucas lesões peritoniais e raras lesões de disseminação.

1.2. Paracoccidioidomicose

Anteriormente conhecida como blastomicose sul-americana, a paracoccidioidomicose é encontrada no continente americano desde o México até a Argentina, constituindo-se na micose profunda de maior relevância desta região. Embora a área endêmica seja extensa, existem diferenças regionais, sendo a maior prevalência encontrada na América do Sul e Nicarágua; Guiana e Chile não registram casos da doença (Restrepo et al., 2001). O Brasil abriga cerca de 80% dos casos de paracoccidioidomicose, sendo o estado de São Paulo o detentor do maior número de pacientes (revisto por Brummer et al., 1993).

Os indivíduos mais acometidos são trabalhadores rurais do sexo masculino moradores das regiões endêmicas (Restrepo, 1985). Em adultos, a razão entre homens e mulheres infectados chega a 13:1, embora testes cutâneos de hipersensibilidade realizados em moradores das regiões endêmicas não revelem diferenças entre os sexos e, em crianças e adolescentes esta razão esteja próxima de 1 (Restrepo, et al.; 1984, revisto por Franco et al.; 1989 e Brummer, et al., 1993). A resistência feminina à doença está ligada ao estradiol que atua na fase inicial da

infecção impedindo a conversão dos propágulos infecciosos do *P. brasiliensis* em leveduras (Restrepo et al., 1984).

Clinicamente, a paracoccidioidomicose pode apresentar-se sob duas formas: aguda ou juvenil e crônica ou adulta. Em ambas as formas, verifica-se baixa atividade imune específica e altos índices de mortalidade na ausência de terapia antifúngica (revisto por Brummer et al., 1993).

A forma aguda da doença restringe-se à cerca de 5% dos casos e acomete, especialmente, crianças e adultos jovens de ambos os sexos. Caracteriza-se pela sua rápida evolução e pelo comprometimento do sistema monocítico fagocitário no baço, fígado, linfonodos e medula óssea (revisto por Brummer et al., 1993). Na maioria das vezes, verificam-se altos níveis de resposta imune humoral em detrimento da resposta imune celular que, em geral, é deficiente. Microscopicamente, as lesões são pouco organizadas e ricas em fungos com muitos brotamentos (Revisto por Franco, 1986).

A forma crônica é a mais comum, ocorre principalmente em adultos do sexo masculino, apresenta uma evolução lenta, podendo demorar anos ou décadas para o aparecimento dos sintomas. Embora os pulmões sejam os órgãos mais atingidos, a disseminação para outros tecidos é freqüentemente relatada. Neste caso, as lesões acometem principalmente as mucosas nasal e oral, a pele, linfonodos e glândulas adrenais (revisto por Brummer et al., 1993). Indivíduos com esta forma da doença desenvolvem resposta imune humoral específica contra o fungo e a resposta celular apresenta-se menos deprimida do que na forma aguda, dando origem a granulomas epitelióides típicos, capazes de conter a multiplicação do *P. brasiliensis* (revisto por Franco, 1986).

A resposta imune celular representa a ferramenta mais eficaz para o combate ao *P. brasiliensis*. Assim, os pacientes com as formas disseminadas que freqüentemente apresentam depressão da resposta imune celular, diminuição da reatividade a testes cutâneos, altos níveis de anticorpos contra o *P. brasiliensis* e granulomas frouxos com muitos fungos representam o pólo anérgico ou a forma maligna da paracoccidioidomicose. Por outro lado, indivíduos com as formas localizadas, respostas positivas para provas de hipersensibilidade tardia, baixos níveis de anticorpos específicos e granulomas epitelióides compactos com poucos fungos encontram-se no pólo hiperérgico (forma benigna) da doença (Silva et al., 1981; Franco, 1986 ; Franco et al., 1987).

1.3. Paracoccidioidomicose Experimental

A preocupação em se reproduzir experimentalmente a paracoccidioidomicose iniciou-se a partir de sua descrição (Lutz, 1908). Entretanto, somente em 1927 Montenegro obteve sucesso inoculando cobaias por via intratesticular com suspensão de tecidos humanos infectados. A partir daí, diversas espécies animais foram utilizadas, fornecendo informações importantes para o entendimento 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 necrópsias humanas.

Em 1959, Mackinnon comparou o desenvolvimento da paracoccidioidomicose a partir de sete diferentes vias de inoculação, em

camundongos *Swiss*. Esse estudo revelou que os camundongos infectavam-se facilmente pela via broncoalveolar, desenvolvendo broncoalveolite seguida por disseminação hematogênica do fungo para outros órgãos. Tais dados permitiram ao autor aventar a hipótese, atualmente aceita, de que o início da paracoccidioidomicose dá-se nos pulmões por inalação do fungo e a disseminação para outros tecidos acontece por via hematogênica. Os achados de Moreno & Espinosa (1976), utilizando a forma micelial do *P. brasiliensis*, confirmam a teoria de Mackinnon, mostrando que a inalação do fungo pode dar início à paracoccidioidomicose ativa com disseminação para baço e fígado.

Vários estudos sobre o papel da resposta imune na paracoccidioidomicose também empregam modelos experimentais. Utilizando a via intratesticular de inoculação em hamsters, Peraçoli (1978) observou que na fase final da infecção, quando as lesões são generalizadas, os níveis de resposta imune celular são muito baixos ou negativos, enquanto que os títulos de anticorpos permanecem elevados. Esses resultados confirmaram a ausência de correlação entre a função reposta imune celular e os níveis de anticorpos circulantes anteriormente observada na paracoccidioidomicose humana, corroborando a hipótese de que os anticorpos não apresentam papel protetor nas micoses em geral.

Atualmente, a espécie mais utilizada como modelo experimental para paracoccidioidomicose é o camundongo, baseado na facilidade de obtenção, manutenção e na disponibilidade de linhagens isogênicas que permitem analisar a influência de certas características isoladamente. Utilizando as linhagens murinas isogênicas A/Sn e B10.A, Calich et al. (1985), estabeleceram um modelo experimental da paracoccidioidomicose capaz de mimetizar os pólos hipérgico e anérgico da doença, relacionados aos padrões de resposta do tipo T helper 1 (Th1)

e T helper 2 (Th2), respectivamente (Calich & Kashino, 1998). As diferentes respostas observadas nestas linhagens não estão ligadas ao complexo principal de histocompatibilidade, uma vez que ambas compartilham o mesmo haplótipo H-2 (H-2^a), nem ao sistema complemento, pois, coincidentemente as duas são deficientes para o componente C5 deste sistema (Calich et al, 1985).

Os camundongos da linhagem B10.A, considerados susceptíveis, apresentam doença progressiva com grande número de fungos viáveis nas lesões e diminuição da resposta imune com anergia após 16 semanas de inoculação. Por outro lado, os camundongos da linhagem resistente A/Sn, apresentam baixo número de fungos viáveis, elevados níveis de resposta de hipersensibilidade do tipo tardia e tendência à cura espontânea (Singer-Vermes et al., 1993).

Histologicamente, granulomas numerosos e pouco organizados, com muitos fungos viáveis e infiltrado plasmocitário evidente, caracterizam as lesões encontradas em camundongos susceptíveis, ao passo que, um número menor de granulomas bem delimitados nos quais a maioria dos fungos é inviável e o número de plasmócitos está reduzido constituem as lesões típicas encontradas em camundongos resistentes (Calich et al., 1994).

Nosso grupo de estudos também tem utilizado modelos experimentais para o entendimento dos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro durante a paracoccidiodomicose experimental. Nós observamos que na fase aguda da infecção experimental ocorre uma intensa atrofia do timo (Brito et al, 2003), entretanto os mecanismos envolvidos neste processo e suas conseqüências permanecem obscuros.

1.4. Timo

O timo é o órgão linfóide primário responsável pela geração dos linfócitos T, que discriminam antígenos próprios e não-próprios apresentados no contexto das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Kendall, 1991). O processo de timopoiese é essencial para o estabelecimento e manutenção do repertório de linfócitos T ao longo da vida (Sempwski & Haynes, 2002).

A função deste órgão permaneceu obscura durante muito tempo e somente a partir da década de 60 o timo passou a figurar entre os órgãos com reconhecida atividade imunológica (Kendall, 1991).

Na Grécia antiga, o timo era tido com a sede da alma e durante a Idade Média como o coração da boa saúde (Kendall, 1991). Somente em 1900 o inglês John Beard sugeriu ser o timo a fonte dos linfócitos, que se estabeleciam por todo o organismo (apud Kendall, 1991). A relação direta do timo com a resposta imune celular foi descoberta, por acaso, em 1961 quando Miller, após timectomizar camundongos neonatos na tentativa de prevenir a ocorrência de leucemia causada por um vírus timotrópico, observou que estes manifestavam várias alterações na resposta imune e não eram capazes de rejeitar aloenxertos.

Situado na porção superior do mediastino, imediatamente atrás da extremidade superior do esterno, o timo é um órgão bilobado derivado da terceira e quarta bolsas faríngeais. Elementos de origem mesenquimal circundam-no formando uma cápsula cujos prolongamentos adentram o parênquima e dividem-no em múltiplos lóbulos, com uma camada periférica densamente povoada,

denominada córtex, e uma camada medular interna, menos povoada (Suster & Rosai, 1997).

O microambiente tímico corresponde a uma rede tridimensional com a qual os timócitos em diferenciação interagem, e que inclui: células epiteliais com extensos prolongamentos citoplasmáticos, que provém suporte mecânico e estímulos para a diferenciação dos timócitos; macrófagos; células dendríticas e elementos da matriz extracelular (Savino et al., 1992; Suster & Rosai, 1997).

Algumas vezes, as células epiteliais tímicas unem-se formando estruturas multinucleadas que abrigam vários timócitos em maturação, mimetizando o microambiente tímico. Estes complexos linfoepiteliais são conhecidos como células “nurse” do timo (TNC) e podem ser isolados e utilizados como modelos para a análise da maturação tímica *in vitro* (Wekerle & Ketelson, 1980).

Os linfócitos T derivam de precursores linfóides (linfócitos pró-T) oriundos da medula óssea e chegam ao córtex tímico através da corrente sanguínea apresentando o fenótipo triplo negativo (TCR-CD4-CD8). Estes pró-linfócitos proliferam e se desenvolvem em timócitos duplo positivos que expressam os co-receptores CD4 e CD8 e baixos níveis de receptor de célula T (TCR) (Mota, 1989). A partir daí uma série de eventos moleculares conhecidos como seleção positiva e negativa ocorre no timo.

A seleção positiva envolve interações dos timócitos com moléculas do MHC expressas no epitélio cortical e resulta na perda de um dos seus co-receptores (CD4 ou CD8) e na restrição ao MHC próprio. Os timócitos podem ainda sofrer seleção negativa, através da qual aqueles que apresentam TCRs de alta afinidade para antígenos próprios são eliminados.

Tanto na seleção positiva quanto negativa, a morte dos timócitos dá-se por apoptose. Aqueles que sobrevivem, por outro lado, migram para a periferia como linfócitos T maduros e povoam os órgãos linfóides secundários onde participam do desenvolvimento de respostas imunes específicas (Boyd & Hugo, 1991).

Assim, o microambiente tímico controla e influencia o desenvolvimento dos timócitos através do contato célula-célula e produção de fatores solúveis. Porém, uma série de fatores, tais como, hormônios, estresse, gravidez, má nutrição, substâncias tóxicas, temperatura, doenças infecciosas e o próprio envelhecimento, pode alterar o microambiente tímico (Kendall, 1991; Savino et al., 1992).

Ao nascimento, o timo apresenta seu maior peso relativo, embora continue crescendo continuamente até a puberdade. Depois disso, sob influência de vários fatores, incluindo hormônios adrenais e sexuais, inicia um processo de involução, caracterizado pela substituição do tecido epitelial por tecido adiposo e diminuição da produção de linfócitos T (Gaudecker, 1991). Contudo, uma parte do tecido epitelial contendo timócitos corticais é preservada até além dos 100 anos de vida e permanece ativa exportando linfócitos T funcionais para a periferia (Jamieson et al., 1999).

Embora a retração da função tímica ao longo do envelhecimento seja bem documentada, os mecanismos envolvidos não estão esclarecidos. Metcalf (1963), transplantando timos entre camundongos com diferentes idades observou que o desenvolvimento deste órgão não era influenciado pela idade do receptor e concluiu que o timo deve possuir mecanismos de auto-regulação para seu desenvolvimento e função.

Recentemente, Sempowski e Haynes (2002), sugeriram que a atrofia tímica decorrente do envelhecimento estaria diretamente ligada ao aumento na expressão de citocinas como: Fator Inibidor de Leucemia (LIF), Oncostatina M (OSM), Interleucina 6 (IL-6) e Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF) produzidas por adipócitos e células epiteliais do órgão.

Embora a função tímica esteja diminuída na vida adulta, em situações onde ocorre destruição do pool de linfócitos periféricos o timo contribui ativamente para o re-povoamento dos linfócitos T. Nesse sentido, tem sido observado que indivíduos com AIDS que apresentam significativo decréscimo no número de linfócitos T CD4⁺ periféricos conseguem, após o tratamento como coquetel anti-retroviral, recompor o repertório linfocitário com células recém emigradas do timo (Douek et al., 1998; Sempowski & Haynes, 2002). Tal recapitulação da função tímica poderia ser desencadeada por aumento na produção de citocinas estimulatórias na periferia, diminuição na expressão de citocinas regulatórias e/ou indução patológica de um ambiente hematopoiético atípico (McCune, 1997).

1.5. O Timo como Alvo em Infecções

Diferentes graus de atrofia tímica podem ocorrer durante o curso de infecções, alterando a liberação de linfócitos pelo timo, o que pode resultar em pior prognóstico para a doença (Kendall, 1991). Na maioria dos casos, esta atrofia é caracterizada por depleção da camada cortical, perda da delimitação corticomedular e aumento nos níveis de apoptose, especialmente em timócitos CD4⁺CD8⁺. O grau de atrofia pode correlacionar-se com a duração da doença (van

Baarlen et al., 1988), ou, em modelos experimentais, com a dose do agente infeccioso (Savino et al., 1992).

A depleção de timócitos pode ter conseqüências negativas para o hospedeiro, uma vez que existe uma contínua necessidade de reposição dos linfócitos T maduros que sofrem renovação naturalmente (Roggero et al., 2002).

O processo de atrofia tímica pode ser desencadeado pela ação direta do patógeno, contradizendo a idéia de que a maturação dos linfócitos T ocorre num ambiente livre de antígenos (Verinaud et al., 2004). Já em 1961 Rowe & Capps, descreveram um vírus murino com tropismo para o timo. Tal vírus, posteriormente denominado vírus tímico murino, infecta timócitos CD4⁺, induzindo sua apoptose o que leva a perda da atividade “helper” (Morse & Valinsky, 1989).

O timo é também alvo do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que o ataca de diversas formas, incluindo a destruição da arquitetura tímica com perda da atividade dos timócitos, depleção celular devido a sua replicação e morte ou maturação anormal do timócitos por fatores virais ou do hospedeiro (Meissner et al., 2003). Além disso, infecção de plasmócitos com o desenvolvimento de folículos de células B na região medular do timo e geração de células gigantes multinucleadas também foram relatadas (McCune, 1997).

De modo semelhante, Rosenzweig et al. (2000), relataram que o vírus da imunodeficiência símia (SIV) também leva ao aumento da apoptose de timócitos, possivelmente de modo indireto uma vez que o número de células apoptóticas é significativamente maior do que o de células infectadas. Além disso, a apoptose foi detectada principalmente no córtex, ao passo que as células infectadas concentravam-se na região medular.

Camundongos infectados com o vírus da coriomeningite linfocitária no período intra-uterino ou ao nascimento possuem uma elevada carga viral, inclusive no timo, e apresentam uma supressão da resposta imune específica para o vírus. Após a eliminação da infecção tímica ocorre o desenvolvimento de resposta imune adequada. Entretanto, a infecção tímica persistente mantém a tolerância ao vírus (King et al., 1992), confirmando a ocorrência de supressão imunológica devido à presença de antígenos heterólogos no timo.

Na fase aguda da doença de Chagas experimental murina também ocorre o acometimento tímico. Nesse modelo, são relatados presença de ninhos de *Trypanosoma cruzi* no parênquima tímico, adensamento da rede de células epiteliais, aumento na produção de hormônios tímicos e componentes da matriz extracelular, mudanças topográficas no padrão de expressão de citoqueratinas por células epiteliais (Savino et al, 1989), além de alterações nas TNCs, tais como, redução na granulose, tamanho e número e alterações ultraestruturais indicativas de dano celular (Cotta-de-Almeida et al., 1997). Mais recentemente, esses efeitos deletérios em TNCs foram atribuídas à enzima trans-sialidase, um possível fator de virulência, presente no *T. cruzi* (Mucci et al., 2002).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado a ocorrência de atrofia tímica em modelos experimentais de doenças infecciosas que causam diminuição da resposta imune. Na infecção experimental pelo vírus da hepatite murina (MHV), foi verificada a ocorrência de severa atrofia tímica caracterizada pela diminuição no peso e na celularidade e aumento na taxa de apoptose. Quando os animais foram co-infectados com *T. cruzi*, foi observado um aumento na gravidade da doença, sugerindo que danos ao timo podem afetar a resposta imune sistêmica para antígenos não-relacionados (Verinaud et al., 1998).

Mais recentemente, observamos que a infecção pelo *P. brasiliensis* também leva a um quadro de atrofia tímica, com invasão do timo pelo fungo. As principais alterações observadas foram: diminuição do peso do órgão, degeneração da camada cortical com aumento na taxa de apoptose e morte celular autofágica, perda da delimitação corticomedular e presença e infiltrado inflamatório justacapsular (Brito et al., 2003; Souto et al., 2002 e Souto et al., 2003).

Em outras micoses a atrofia tímica também tem sido relatada. Fungos do gênero *Saprolegnia* que infectam naturalmente salmonídeos, causando uma micose tegumentar, alteram drasticamente o microambiente tímico. Como consequência, ocorre perda da regionalização tímica e uma marcada redução na densidade celular do parênquima (Alvarez et al., 1995). Essas alterações são ainda mais pronunciadas nos casos onde o fungo invade o timo o que coincide com quadros exacerbados da micose.

A infecção de camundongos por *Cryptococcus neoformans* seguida por imunização com soro albumina humana também leva a várias alterações no microambiente tímico (Sotomayor et al., 1989). A presença do fungo foi observada no timo de todos os animais infectados e, em alguns casos, houve envolvimento da camada cortical, acompanhado de reações granulomatosas fracas ou moderadas, perda da arquitetura do órgão, além de hiperplasia e aparecimento de centros germinativos. Tais reações não ocorreram nos animais controle, imunizados apenas com soro albumina humana.

A atrofia tímica pode ainda derivar de fatores produzidos pelo hospedeiro, tais como citocinas e mediadores solúveis. Barke et al. (1994), por exemplo, notaram redução no córtex tímico com aumento no nível de apoptose dos timócitos na sepse peritoneal e sugeriram que este fenômeno resultaria da inibição da

produção de IL-2, um potente fator de crescimento para timócitos com possível papel protetor contra a apoptose.

Por outro lado, a linfotoxina, previamente conhecida como Fator de Necrose Tumoral-beta e produzida durante infecções bacterianas, induz ativamente uma profunda atrofia tímica, com decréscimo de 95% dos timócitos corticais (Kusumi et al, 1992).

Além das citocinas, outras moléculas endógenas mais simples, com papel fisiológico bem definido parecem participar da atrofia tímica durante infecções. Entre elas está o ATP extracelular (ATP_e), um co-sinalizador que aumenta a concentração de Ca²⁺ nos timócitos corticais e modifica suas propriedades funcionais (Gregory, 1978). O ATP_e também induz acidificação citosólica, despolarização ou hiperpolarização de membrana (Nagy et al., 2000), fragmentação de DNA (Zheng, 1991) e lise de timócitos (Nagy et al., 2000).

O óxido nítrico (NO), uma molécula simples, porém com múltiplos efeitos biológicos, incluindo citotoxicidade para microrganismos (Adams, 1990) e células tumorais (Stuehr & Nathan, 1989), também tem sido implicado como mediador de atrofia tímica. Embora fisiologicamente o NO seja produzido em baixos níveis pelas células endoteliais, atuando como regulador da pressão sanguínea (Rees et al., 1989), durante infecções e após a inoculação de lipopolissacarídeos (LPS), sua produção torna-se elevada devido à expressão da enzima óxido nítrico sintase-induzível (iNOS) em células endoteliais, macrófagos e células dendríticas. Fehsel et al. (1995), relataram *in vitro* apoptose de timócitos dose-dependente quando estes foram cultivados com doadores de NO e sugeriram que o NO poderia ter esta ação também *in vivo*, uma vez que, em camundongos inoculados com *Salmonella typhimurium* os focos de apoptose tímica encontravam-se próximos a vasos

sangüíneos. Além disso, houve aumento nos níveis de apoptose quando os timócitos foram cultivados com células endoteliais e o aumento foi proporcional à concentração de NO presente na cultura.

Outras citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) anteriormente conhecido como Fator de Necrose Tumoral-alfa e o Interferon-gama (IFN- γ) também podem mediar a atrofia tímica.

1.6. Interferon-gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O IFN- γ é uma citocina regulatória que atua no crescimento e diferenciação das células envolvidas na resposta imunológica. Seu campo de atuação abrange desde aumento na expressão de moléculas de MHC de classe II (Basham & Merigan, 1983), diferenciação em células com fenótipo Th1, com conseqüente ativação de macrófagos (Schultz & Keinschmich, 1989), aumento na produção de IgG_{2a} (Snapper et al., 1988) até regulação de respostas Th2 (Gajewski & Fitch, 1988).

Assim, a produção de IFN- γ é crucial para o desenvolvimento de respostas do tipo Th1 que resultam em imunidade protetora contra patógenos intracelulares (Mossman, 1991). As células natural killer (NK) estimuladas por Interleucina-12 (IL-12) (Kasahara et al., 1983) e os linfócitos Th1 (num processo de retro-alimentação) são as principais fontes desta citocina, embora macrófagos e linfócitos B também possam contribuir para sua produção.

O TNF, anteriormente conhecido como TNF- α , é uma citocina produzida principalmente por macrófagos ativados por IFN- γ , com múltiplos efeitos

biológicos, diretamente envolvida nos processos inflamatórios e que pode atuar de maneira parácrina ou endócrina (Beutler & Cerami, 1987). Outras fontes de TNF incluem linfócitos, mastócitos, neutrófilos, astrócitos e células da microglia, células musculares lisas e células tumorais (Bárbara et al., 1996).

Embora a ação tumoricida do TNF tenha sido relatada há muito tempo, sua identificação ocorreu há cerca de 30 anos. Já no final do século XVIII, Willian B. Coley obteve algum sucesso ao tratar pacientes com câncer com extratos bacterianos. Em 1962, O'Malley e colaboradores relataram que a regressão tumoral observada por Coley era mediada por uma proteína presente no soro, à qual chamaram de fator necrozante de tumor. Entretanto, somente em 1975, Elizabeth Carswell e seus colaboradores identificaram tal proteína após tratar camundongos portadores de sarcoma com soro de camundongos inoculados com LPS (apud Bárbara et al., 1996).

O TNF também foi descrito como indutor da caquexia ligada a infecções parasitárias e tumores (Beutler et al., 1985). A importância desta citocina entre os mecanismos de defesa contra infecções só foi relatada posteriormente.

O TNF participa do recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação, induzindo a produção de citocinas quimiotáticas (Seelentag et al., 1987) e a expressão de moléculas de adesão no endotélio (Pober et al., 1986). Esta citocina constitui ainda um potente ativador da função macrofágica, estimulando a síntese de NO, a diferenciação em células gigantes e epitelióides (Trinchieri et al, 1986) e o desenvolvimento de granulomas epitelióides com alta capacidade bactericida (Kindler et al., 1989).

Apesar de sua importância como mediador da imunidade, o TNF exerce efeitos danosos como o choque séptico, no qual sua liberação descontrolada pode

ser fatal. O resultado benéfico ou patogênico da produção de TNF depende da quantidade, do local da liberação e de sua duração (Beutler & Grau, 1993).

As atividades biológicas do TNF são mediadas por dois receptores distintos de alta afinidade. O receptor de 55 kDa (TNFRp55), também conhecido como p55, TNFR1, tipo B ou CD120a, é amplamente distribuído, exceto em hemácias e linfócitos T não estimulados, enquanto o receptor de 75 kDa (TNFRp75) é expresso na linhagem hematopoiética e no endotélio. Embora estes receptores possuam 28% de homologia extracelular não há homologia na porção intracelular. Acredita-se que o TNFRp75 seja primariamente ativado pela forma transmembrana do TNF, indicando o envolvimento deste receptor nas respostas locais mediadas por TNF, enquanto que o TNFRp55 liga-se a forma solúvel do TNF mediando as ações parácrinas desta citocina (revisto por Bárbara et al., 1996).

Na paracoccidioidomicose experimental, o TNF e o IFN- γ exercem um importante papel na ativação de macrófagos, estimulando a formação de granulomas, a diferenciação em células epitelióides e a síntese NO. Assim, estas citocinas promovem aumento da capacidade fungicida dos macrófagos, o que as torna fatores cruciais na determinação da resistência a doença experimental e humana (Souto et al., 2000 e Karhawi et al., 2000).

1.7. Papel do TNF e do IFN- γ no Timo

O TNF é fisiologicamente expresso no timo humano e murino, assim como seus receptores (TNFRp55 e TNFRp75) são expressos pelos timócitos (Murphy et al., 1994). Células epiteliais tímicas, células mióides, timócitos e mastócitos

produzem TNF, sendo estes últimos considerados a principal fonte intratímica desta citocina (revisado por Yarilin & Belyakov, 2004).

O TNF contribui para a maturação de timócitos, embora camundongos TNF^{-/-} apresentem desenvolvimento tímico normal (Marino et al., 1997). Os mecanismos de interferência do TNF na maturação dos timócitos são complexos uma vez que esta citocina pode induzir ora proliferação ora eliminação. De acordo com Baseta & Stutman (2000), os efeitos pró-apoptóticos seriam mediados pelo TNFRp55 enquanto a resposta proliferativa seria derivada da sinalização via TNFRp75.

Durante infecções agudas, os níveis séricos de TNF aumentam e esta citocina pode funcionar como um indutor da apoptose de timócitos (Isogai *et al.*, 1996). O mecanismo de indução de apoptose parece envolver o TNFRp55. A ativação desse receptor leva à associação do complexo à proteína adaptadora TRADD que, em reposta, liga-se ao FADD. A via apoptótica é então desencadeada pela ativação das caspases, uma família de enzimas proteolíticas, que atuam no citoplasma e no núcleo (Ashkenazi & Dixit, 1998).

O IFN- γ , que é produzido por timócitos em diferenciação, pode promover aumento na expressão de moléculas de MHC de classe II em culturas de células epiteliais tímicas (Berrih et al., 1985), modular a expressão de proteínas da matriz extracelular e alterar os padrões de adesão e proliferação de células do epitélio tímico (Lannes-Vieira, 1991, Lagrota-Candido et al, 1996).

Além disso, o pré-tratamento de camundongos com IFN- γ leva a um significativo aumento na apoptose de timócitos corticais induzida por LPS. Embora o IFN- γ não induza diretamente apoptose, a administração de anticorpos anti-IFN- γ previne a apoptose (Koj, 1998). Considerando que a administração de IFN- γ

promove elevação nos níveis séricos de TNF e cortisol este parece ser um dos mecanismos envolvido no aumento de apoptose tímica (Kato et al., 1997).

Assim, tendo conhecimento de que o *P. brasiliensis* é capaz de induzir atrofia tímica e que citocinas pró-inflamatórias podem estar envolvidas neste processo, nos propusemos a investigar as alterações tímicas induzidas por cepas de alta e baixa virulência do fungo em camundongos susceptíveis e resistentes à infecção experimental e o possível papel do TNF e do IFN- γ nesse processo.

Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral:

- Buscar novos subsídios que contribuam para a compreensão das modificações morfofisiológicas desencadeadas no timo durante infecções e agregar informações que auxiliem no entendimento da relação hospedeiro-parasita na paracoccidiodomicose experimental e humana;

Objetivos específicos:

- Avaliar a influência da virulência do *P. brasiliensis* na atrofia tímica de camundongos susceptíveis e resistentes à paracoccidiodomicose experimental.
- Caracterizar as alterações morfofisiológicas do timo de camundongos susceptíveis e resistentes infectados por via ip com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis*.
- Estimar o papel das citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN- γ na atrofia em camundongos infectados com o *P. brasiliensis*.
- Estimar as consequências da atrofia tímica na resposta imune de camundongos susceptíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*.

Material e Métodos

3.1. Animais:

Foram utilizadas as seguintes linhagens de camundongos isogênicos:

- A/J, C57Bl/6 “selvagem” (C57Bl/6 wt) e C57Bl/6 nocaute para IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB/UNICAMP.

- B10.A obtida do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

- C57Bl/6 nocaute para o receptor TNFRp55 (TNFRp55 $^{-/-}$) gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Santana da Silva do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais obtidos em condição livre de patógenos específicos (SPF), foram mantidos, durante todo o período experimental em isoladores tipo Trexler (Trexler, 1959) com água e ração estéreis fornecidos em livre demanda. Foram utilizados sempre camundongos machos entre 8 e 10 semanas de idade.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Unicamp.

3.2. Fungos:

Foram utilizados dois isolados de *P. brasiliensis*: o isolado virulento Pb18 e o isolado de baixa virulência Pb265. A patogenicidade destas cepas foi confirmada 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.

Estes isolados foram originalmente obtidos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e têm sido mantidos em nosso laboratório na fase leveduriforme em meio de cultivo de Fava Netto a 35°C, com repiques quinzenais. Periodicamente, a patogenicidade das cepas é verificada através da inoculação em animais com posterior recuperação.

3.3. Preparo do Inóculo:

Para o preparo da suspensão fúngica, o *P. brasiliensis* foi cultivado em meio de cultivo de Fava Netto e coletado em sua fase de crescimento exponencial (7 dias). As leveduras foram ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) pH 7.2, agitadas em aparelho tipo Vortex, em dois ciclos de 15 segundos cada, centrifugadas por 10 minutos a 300g e lavadas 2 vezes em PBS.

O número total de células presente na suspensão foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e a concentração final ajustada para 10^7 leveduras de *P. brasiliensis*/ml. A viabilidade fúngica foi determinada pela coloração vital Lactofenol Azul de Algodão, conforme descrito por Sano et al. (1993).

3.4. Avaliação da Influência da Virulência do *P. brasiliensis* na Indução de Atrofia Tímica em Camundongos Susceptíveis e Resistentes:

3.4.1. Infecção Experimental:

Camundongos das linhagens A/J e B10.A foram inoculados intraperitonealmente (ip) com 5×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* das cepas Pb18 ou Pb265 contidas em 0,5 ml de PBS estéril, enquanto os animais controle receberam igual volume de PBS estéril.

3.4.2. Sacrifício e Coleta de Material:

Lotes de pelo menos 4 animais infectados e controles foram anestesiados, através da injeção ip de 100 µl de hidrato de cloral 0.1g/ml, submetidos à sangria pelo plexo braquial e sacrificados por deslocamento cervical às 24 horas e aos 3, 5, 7 e 14 dias após a inoculação. Foram coletados timo, baço e fígado, sendo o que timo foi dividido em dois lóbulos: o esquerdo destinado à análise histopatológica e o direito à avaliação da celularidade e viabilidade do *P. brasiliensis*.

3.4.3. Avaliação do Peso do Timo:

A variação do peso do timo foi avaliada ao longo da infecção. Para tanto, após o sacrifício do animal o timo foi retirado, lavado em PBS, seco em papel de filtro e pesado em balança analítica.

3.4.4. Avaliação da Celularidade do Timo:

Para a avaliação da celularidade, imediatamente após o sacrifício, o lobo tímico direito foi macerado em meio de cultivo RPMI 1640 (Cultilab, Campinas,

Brasil) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, Brasil) com o auxílio de peneira e êmbolo estéreis. A partir desta suspensão celular foi estimado o número total de células através da contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer.

3.4.5. Avaliação da Viabilidade do *P. brasiliensis* no Timo:

A viabilidade foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias. Para tanto, 100µl da suspensão obtida a partir do lobo direito do timo foram semeados em meio BHI (OXOID – Wade Road, Basingstoke, Reino Unido) suplementado com 4% de soro de cavalo (gentilmente cedido pela Dra. Clarice W. Arns, do Depto. De Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp) e 5% de filtrado de cultura da cepa Pb192, como fator de crescimento, conforme previamente descrito (Singer-Vermes et al., 1992). As placas foram incubadas a 37°C e o surgimento de colônias foi avaliado diariamente.

3.4.6. Análise Histopatológica do Timo:

O lóbulo esquerdo do timo, bem como o baço e o fígado foram fixados por 24 horas em formalina 10% tamponada, lavados em água corrente, desidratados em gradiente de álcool e incluídos em Histosec (Merck - Darmstadt, Alemanha).

Após a inclusão, o material foi submetido à microtomia para obtenção de cortes finos (4 µm). Estes cortes foram desparafinizados, hidratados em gradiente de álcool, corados por hematoxilina-eosina e analisados por microscopia de luz, em microscópio Olympus BX-40 (Olympus Optical, Tokio, Japão).

3.4.7. Detecção de Morte Celular por Apoptose no Timo:

O Kit TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling* - Boehringer, Alemanha) para a detecção de apoptose *in situ* foi utilizado. O princípio da técnica consiste em identificar a fragmentação de DNA nuclear através da incorporação de nucleotídeos marcados com fluoresceína mediada pela enzima TdT (transferase deoxinucleotidil terminal).

Para tanto, os cortes foram desparafinizados, hidratados em gradiente de etanol, lavados em PBS e incubados em proteinase K, para digestão do tecido. Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% em metanol. Procedeu-se, então, a reação pela adição de uma mistura otimizada da enzima TdT e nucleotídeos marcados com fluoresceína. Um anticorpo anti-fluoresceína marcado com peroxidase foi empregado para a conversão histoquímica da reação e a revelação foi feita utilizando-se H₂O₂ 0,03% como substrato e 3-3 Diamino-benzidina (DAB) 0,01% em PBS pH 7.4 como cromógeno. Em seguida o material foi contracorado com Verde de Metila 0.1% em tampão acetato de sódio, desidratado e montado em Permount (Fischer Scientific, Nova Iorque, EUA). Controles positivo e negativo incluíram respectivamente cortes de tecidos tratados com DNase (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, EUA) e omissão da enzima TdT.

3.4.8. Detecção Imuno-histoquímica do *P. brasiliensis* no Timo:

Para a detecção do fungo, os cortes foram desparafinizados, hidratados em gradiente de etanol e lavados em PBS. Em seguida, procedeu-se o bloqueio dos sítios inespecíficos de reação com soro normal de camundongo (1:50) e o bloqueio da peroxidase endógena utilizando H₂O₂ 3% em metanol.

Foi utilizado soro de paciente com paracoccidiodomicose com alto título de anticorpos anti-*P. brasiliensis* (gentilmente cedido pela Dra. Heloísa Blotta do Depto de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp) como fonte de anticorpos primários, e anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, EUA) como anticorpo secundário.

A reação foi revelada utilizando-se H₂O₂ 0,03% como substrato da enzima e 3-3 Diamino-benzidina 0,01% como cromógeno em PBS pH 7.4. Em seguida o material foi contracorado com Hematoxilina de Harris, desidratado e montado em Permunt (Fischer Scientific, Nova Iorque, EUA). Controles positivos e negativos para a reação incluíram, respectivamente, cortes histológicos com granulomas ricos em fungos e omissão o anticorpo primário.

3.5. Caracterização das Alterações Morfofisiológicas no Timo de Camundongos Susceptíveis e Resistentes à Paracoccidiodomicose Experimental.

3.5.1. Infecção Experimental:

Camundongos das linhagens A/J e B10.A, foram inoculados ip com 5x10⁶ leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 contidas em 0,5 ml de PBS estéril.

3.5.2. Análise Morfométrica:

Para a análise morfométrica, o timo foi coletado nos tempos 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias pi, fixado em formalina tamponada, submetido aos procedimentos rotineiros para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina-eosina. A área total do timo, bem como as áreas cortical e medular foram mensuradas utilizando o

microscópio Neophot 32 e o programa Q-500 MC Leica para aquisição de imagens do Departamento de Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP.

3.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão:

Às 24 horas e aos 3, 5, 7 e 14 dias após a inoculação, lotes de 4 animais infectados e controles foram perfundidos, pela artéria aorta, com PBS seguido 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*.

O timo foi, então, fragmentado e imerso em solução fixadora por cerca de 24 horas. Em seguida foi pós-fixado em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) tamponado, por 2 horas, desidratado em gradiente de etanol e acetona, e incluído em resina (Epon 812). 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, procedeu-se a contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo. A análise do material foi feita no microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss Leo 906, Alemanha) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.5.4. Citometria de Fluxo

A caracterização das populações de timócitos foi feita por citometria de fluxo. Esta caracterização estendeu-se também ao baço para avaliação dos linfócitos T periféricos. Para tanto, às 24 horas e aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias pi, 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 o auxílio de peneiras e êmbolos estéreis. A suspensão celular obtida foi centrifugada por 10 minutos a 300g a 4º C, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80ºC, para utilização posterior na pesquisa de citocinas, e o botão de células resultante foi ressuspensão em meio de cultivo. Nas amostras de baço procedeu-se, ainda, à lise das hemácias em tampão de lise (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 1mM).

O número de células presente na suspensão foi estimado por contagem em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 5x10⁶ células/ml. Foram utilizados 200µl desta suspensão (1x10⁶ 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 e o botão de células ressuspensão e incubado com 1µl de anticorpo anti-CD8 marcado com ficoeritrina e anticorpo anti-CD4 marcado com isotiocianato de fluoresceína (Biosource, Camarillo - California), sob refrigeração e ao abrigo de luz por 30 minutos. Após a marcação, a suspensão foi centrifugada, lavada por três vezes em PBS e, finalmente, ressuspensão em 1 ml 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, EUA) localizado no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED – FCM/UNICAMP) e a análise dos dados utilizou o programa EXPO (Applied Cytometry Systems, Dinnington, Sheffield, Inglaterra).

3.6. Avaliação da Participação de Citocinas Pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) na Atrofia Tímica.

3.6.1. Dosagem de TNF e IFN- γ por ELISA

A dosagem de citocinas foi realizada no soro e sobrenadante do macerado de timo e baço de camundongos susceptíveis e resistentes às 24 horas e aos 3, 5, 7 e 14 dias pi, utilizando os kits DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

As placas foram sensibilizadas com anticorpos de captura (anti-TNF ou anti-IFN- γ) durante toda a noite a temperatura ambiente e lavadas com PBS-Tween 20 0,05%. Procedeu-se, então, o bloqueio dos sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (PBS + 5% de leite em pó desnatado) por 1 hora a temperatura ambiente. Após a lavagem, os padrões (TNF ou IFN- γ recombinantes), em diluições crescentes para construção da curva, e as amostras foram adicionados à placa, seguindo-se sua incubação por 2 horas a 37°C e posterior lavagem. Foi realizada então, a incubação por 2 horas com os anticorpos de detecção biotinilados (anti-TNF ou anti-IFN- γ). Após a lavagem, realizou-se a incubação com o conjugado avidina-peroxidase a 37°C por 1 hora, sendo este então desprezado e as placas lavadas. Adicionou-se, finalmente, o substrato (H₂O₂) em tampão citrato-ácido cítrico com o cromógeno orto-fenil-diamina (OPD) e após 30 minutos as reações foram bloqueadas pela adição de 25 μ l de H₂SO₄ 2N a cada poço da placa. A absorbância foi lida em 492nm.

3.6.2. Detecção *In Situ* de TNF e IFN- γ no Timo

A detecção de TNF e IFN- γ foi feita em cortes de tecido de camundongos controles ou infectados com *P. brasiliensis* fixados com formalina tamponada,

utilizando-se anticorpos primários anti-TNF ou IFN- γ (Peprotech, Rocky Hill, NJ) e o kit de amplificação CSA (Dako, Carpinteria, CA). Primeiramente, os cortes foram desparafinizados, hidratados e tratados com H₂O₂ 3% em metanol para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, procedeu-se a recuperação antigênica com ácido cítrico 0,01M pH 6.0 em vapor fluente por 30 minutos. Foram realizados, então, bloqueio com soro normal de cabra e soro normal de camundongo em PBS molico 10% e a incubação com o anticorpo primário, anti-TNF ou IFN- γ por 30 minutos a 37°C e durante toda a noite a 4°C.

O material foi incubado com o anticorpo secundário biotinilado (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, procedeu-se a amplificação da reação com o kit CSA em 3 etapas de 15 minutos cada: (i) incubação com estreptoavidina e biotina-peroxidase, (ii) incubação com tiramida biotinilada e (iii) estreptoavidina-peroxidase, intercaladas por 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada, sob agitação. A revelação foi feita utilizando H₂O₂ como substrato e 3,3-Diaminobenzidina (DAB) como cromógeno e o tecido foi contracorado com Hematoxilina de Harris. Os controles positivos foram feitos através da utilização de granulomas macrofágicos observados em baço de camundongos resistentes infectados com *P. brasiliensis* e os negativos pela omissão do anticorpo primário.

3.6.3. Infecção Experimental de Camundongos TNFRp55^{-/-} e IFN- γ ^{-/-}.

Camundongos C57Bl/6 wt, TNFRp55^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} foram inoculados intraperitonealmente com 5x10⁶ leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 contidas em 0,5 ml de PBS.

Lotes de 4 animais foram pesados e sacrificados 0, 3 e 7 dias após a inoculação. O timo foi coletado e pesado para análise do peso e, ainda, submetido ao processamento histológico de rotina, coloração por hematoxilina-eosina e detecção de apoptose in situ pela técnica TUNEL, conforme descrito no item 3.4.6.

3.7. Avaliação da Resposta Imunológica.

3.7.1. Análise das Lesões Induzidas pelo *P. brasiliensis* no Fígado e no Baço:

O fígado e o baço de camundongos A/J e B10.A infectados 5×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 foram retirados após 24 horas e 3, 5, 7 e 14 dias de inoculação. Estes órgãos foram fixados em formalina tamponada por 24 horas e submetidos à rotina histológica para inclusão em parafina, coloração por hematoxilina-eosina e análise por microscopia de luz..

3.7.2. Análise das Subpopulações de Linfócitos T no Baço:

A análise das subpopulações CD4+ e CD8+ no baço em camundongos A/J e B10.A controles ou infectados com a cepa Pb18 foi feita através de citometria de fluxo seguindo-se a metodologia descrita no item 3.5.3.

3.7.3. Resposta Proliferativa frente à Concanavalina A (ConA):

A avaliação da resposta proliferativa frente à ConA foi feita em camundongos susceptíveis e resistentes inoculados com 5×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18. Após 1, 3, 5, 7, 14 e 28 dias de inoculação os animais foram sacrificados e o timo e o baço foram removidos. Estes órgãos foram lavados em PBS estéril gelado e macerados com peneira e êmbolo estéreis em meio RPMI

1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, Brasil) e antibióticos. A suspensão celular resultante foi centrifugada por 10 minutos a 300g a 4°C e o botão de células ressuspenso em 1 ml de meio RPMI completo. Nas suspensões de células esplênicas procedeu-se ainda a lise das hemácias com tampão de lise (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM e EDTA 1mM).

As células foram cultivadas em triplicata em placas de poliestireno de 96 poços na concentração final de 5×10^5 células/poço, com ou sem 2 $\mu\text{g/ml}$ de ConA, por 3 dias a 37°C em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 . Após este período foram adicionados 10 μl de MTT (Dimetiltiazol-2-il Difenil Brometo de Tetrazólio) em cada poço (5 mg/ml), procedendo-se incubação adicional por 4 horas. Acrescentou-se, a seguir, 100 μl de SDS 5% em HCl 0,01N e a cultura foi mantida até a manhã seguinte a 37°C em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 . Procedeu-se então a leitura da absorbância a 540nm.

A resposta proliferativa foi estimada como o aumento na densidade óptica observada nos poços cultivados com o mitógeno em relação à verificada nos poços cultivados somente com meio, e os valores foram expressos como porcentagem.

3.8. Análise Estatística

Quando cabível, os resultados foram avaliados por meio do software GraphPad InStat versão 3.0 (1997). Os valores obtidos foram submetidos à Análise de Variância de 1 Via (ANOVA), seguida pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunnet, considerando-se diferenças estatisticamente significantes quando o valor do p foi igual ou menor que 0,05.

Resultados

4.1. Influência da Virulência do *P. brasiliensis* na Indução de Atrofia Tímica em Camundongos Susceptíveis e Resistentes.

4.1.1. Peso do Timo

O peso do timo sofreu redução independente da linhagem ou da cepa fúngica empregadas (Figura 1). Os animais inoculados com a cepa Pb18 apresentaram redução somente aos 3 dias pi (Figura 1A), enquanto os infectados com Pb265 apresentaram além desta, uma queda acentuada no peso do timo aos 7 dias de inoculação (Figura 1B).

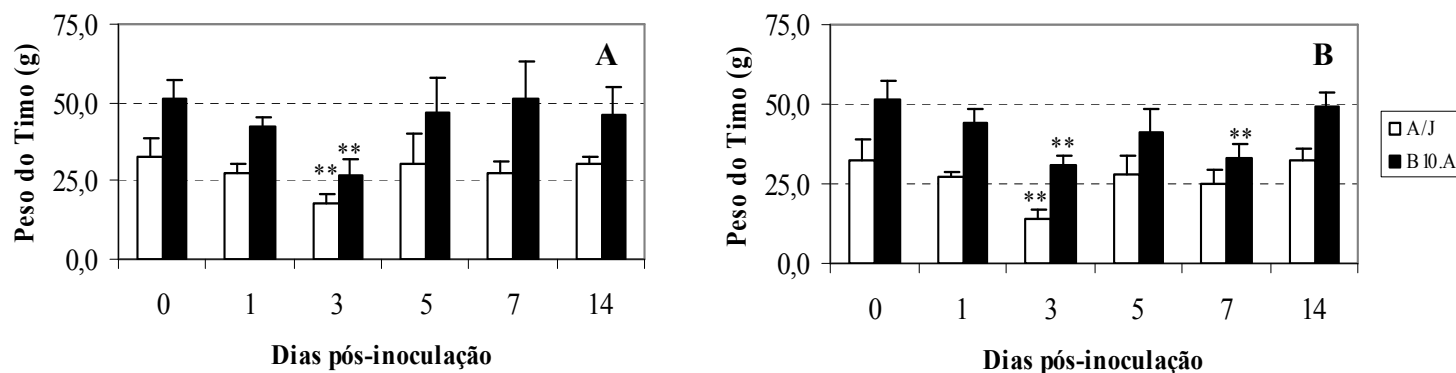


Figura 1: Avaliação do peso do timo em camundongos A/J e B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos controle (dia 0), infectados com Pb18 (A) ou Pb265 (B). Os valores representam o peso médio encontrado em 4 animais $\pm$ o desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados).

4.1.2. Celularidade no Timo

A infecção pelo *P. brasiliensis* levou a uma significativa redução no número de células presentes no timo tanto de camundongos susceptíveis quanto resistentes. Ambas as linhagens apresentaram um pico de atrofia aos 3 dias pi e uma nova redução aos 7 dias de inoculação, como demonstra a Figura 2.

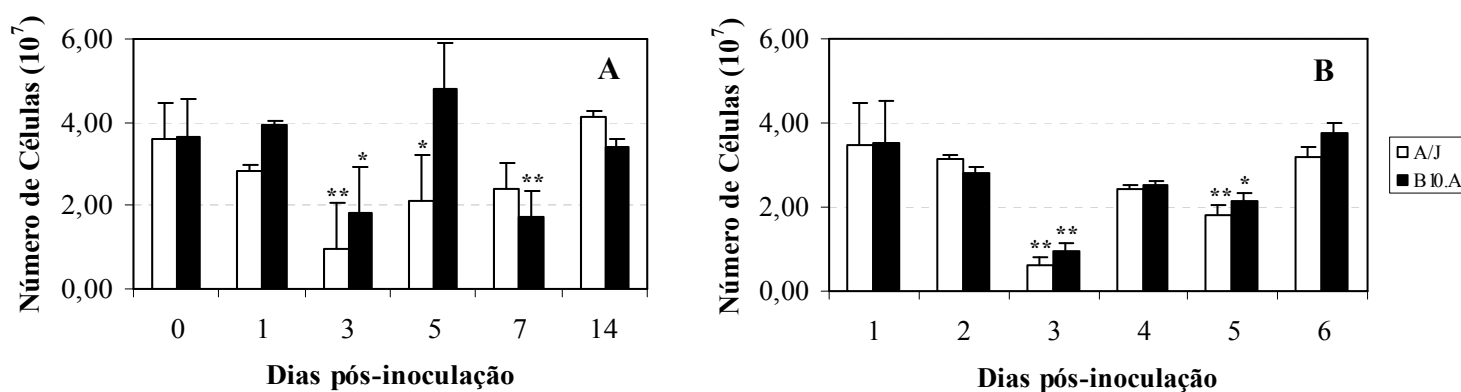


Figura 2: Avaliação da celularidade do timo em camundongos A/J e B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos controle (dia 0), infectados com Pb18 (A) ou Pb265 (B). Os valores representam o número médio de células encontrado em 4 animais $\pm$ o desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados).

4.1.3. Achados Histopatológicos no Timo

4.1.3.1. Animais Resistentes (Linhagem A/J)

Os camundongos controles inoculados com o veículo apresentaram a histologia normal do timo (Figura 3A), enquanto os infectados com a cepa virulenta Pb18, logo ao primeiro dia da infecção, mostraram rarefação do córtex tímico e presença de células com núcleo picnótico constituindo um padrão em céu-estrelado (Figura 3B). Os animais infectados com a cepa Pb265 também apresentaram alterações corticais, porém, estas foram menos intensas (Figura 3C). Nesse mesmo período, a região medular se mostrou, por outro lado, mais densamente povoada do que em animais controle e muitos neutrófilos puderam ser visualizados, especialmente próximos aos corpúsculos de Hassall (dados não mostrados).

O aumento no número de células em apoptose sugerido pela rarefação da camada cortical e ocorrência de células com núcleo picnótico foi avaliado pela reação TUNEL. Em comparação com os camundongos controle (Figura 4A), os animais infectados apresentaram aumento no número de células em apoptose, em menor intensidade nos infectados com a cepa Pb18 (Figura 4B) e mais pronunciada naqueles infectados com a cepa Pb265 (Figura 4C). Em ambos os grupos, uma taxa elevada de apoptose foi verificada ao longo de todo o período experimental.

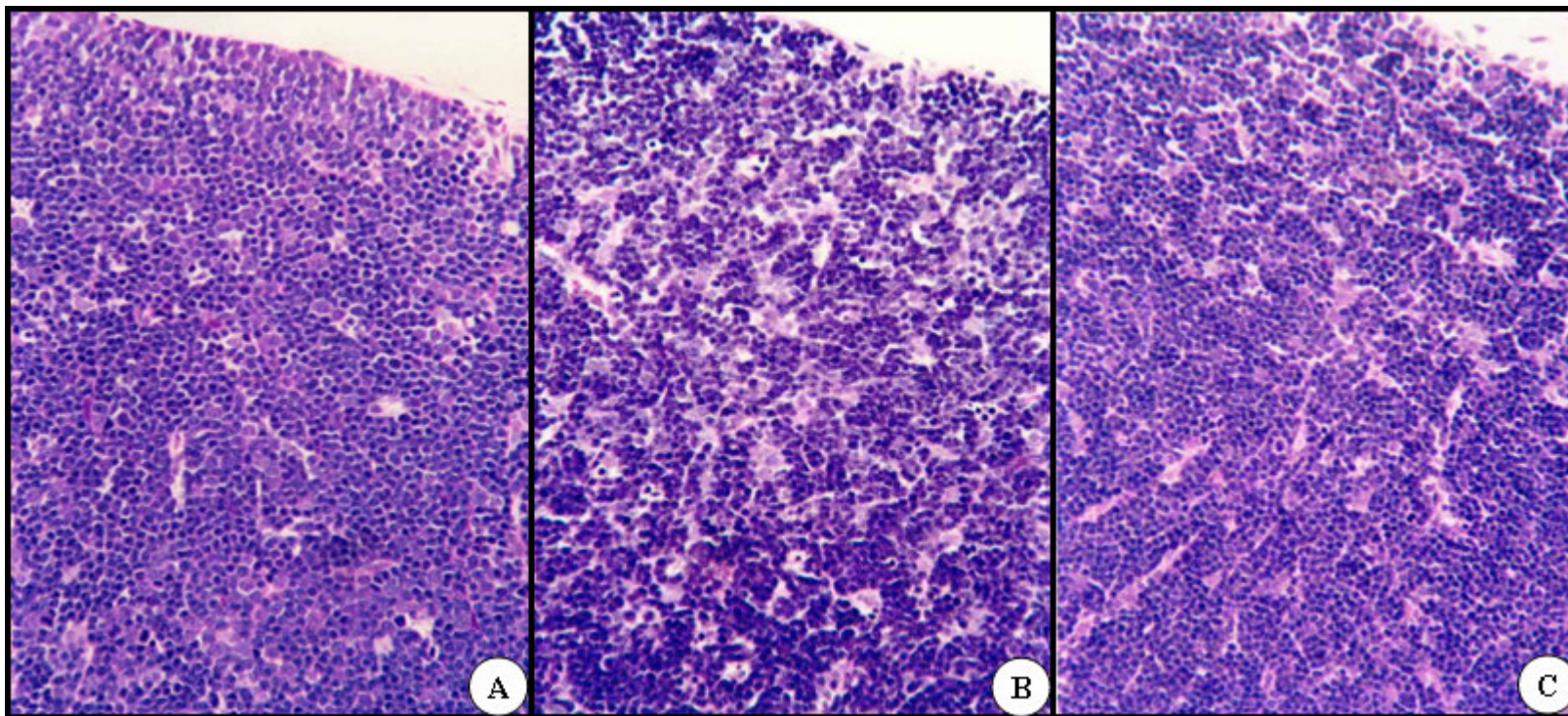


Figura 3: Córtex tímico em camundongos A/J infectados com *P. brasiliensis*. Controle (A), 24 horas após a infecção com Pb18 (B) ou Pb 265 (C). Notar a rarefação do córtex e a ocorrência de um padrão em céu-estrelado, especialmente em camundongos infectados com a cepa virulenta Pb18 (B). Coloração HE. Aumento original: 200x.

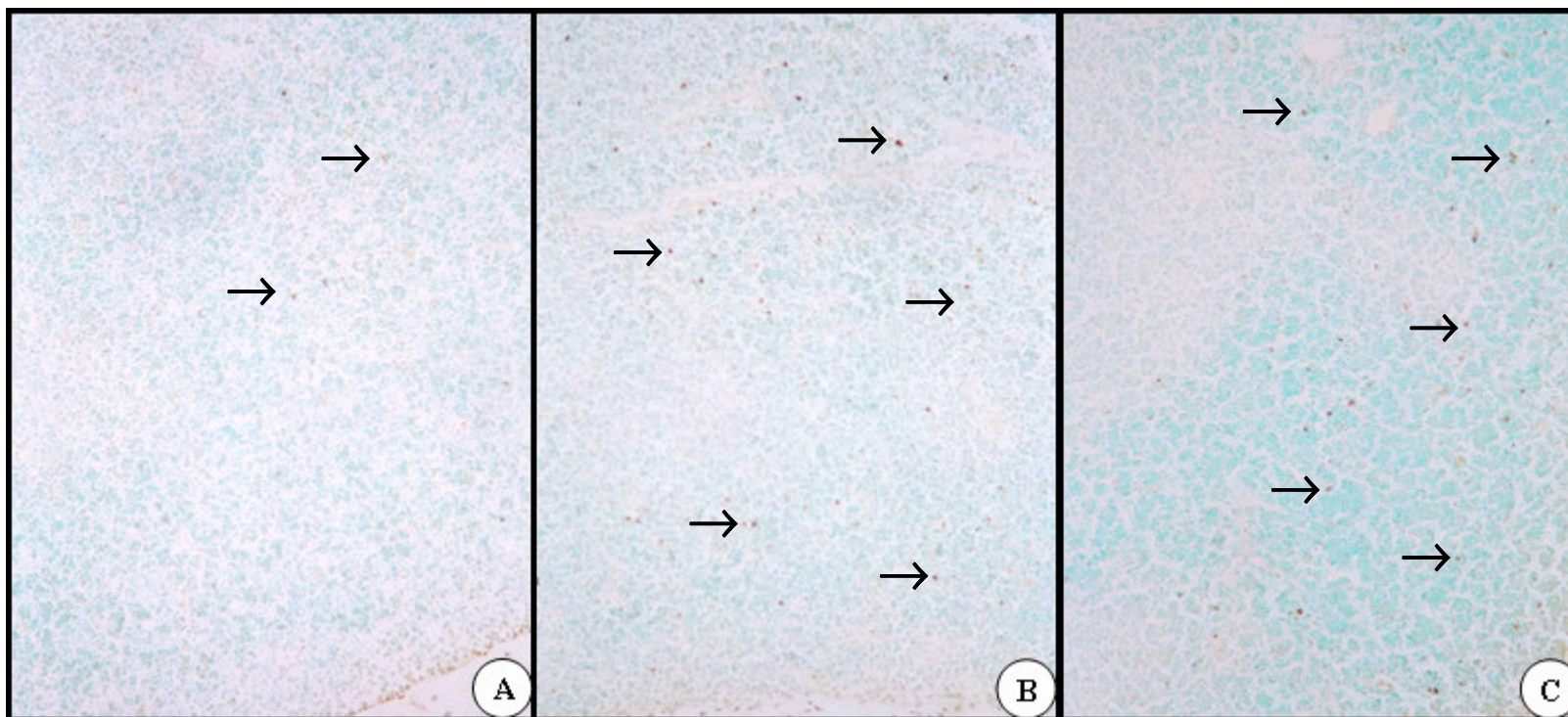


Figura 4: Apoptose no timo de camundongos A/J infectados com *P. brasiliensis*. Controle (A), 3 dias após a infecção com a cepa Pb18 (B) e 24 horas após a inoculação com a cepa Pb265 (C). Notar o aumento no número de células em apoptose (→) nos animais infectados. Método TUNEL contracorado com Verde de Metila. Aumento original: 200x.

Aos 3 dias de inoculação, em ambos os grupos, a delimitação entre córtex e medula tornou-se mais tênue, ou mesmo perdeu-se completamente como pode ser observado na Figura 5. Neste período, a região cortical mostrou-se rarefeita e a medular mais densamente povoada enquanto a cápsula tímica apresentou-se mais espessa e menos organizada que o normal.

A delimitação corticomedular foi recuperada já aos 5 dias pi em ambos os grupos. Em um camundongo infectado com a cepa Pb18 notou-se a presença de uma cavidade na medula tímica revestida por epitélio cúbico ciliado (Figura 6A). Notou-se ainda, em animais inoculados com esta cepa, a hipertrofia dos linfonodos paratímicos (Figura 6B) que apresentavam centros germinativos evidentes com células em apoptose e vários neutrófilos e plasmócitos em meio ao estroma.

Aos 7 dias de infecção, independente da cepa empregada, o timo mostrou um padrão histológico semelhante ao encontrado nos animais controle. Linfonodos paratímicos foram encontrados nos dois grupos experimentais e apresentaram características semelhantes às observadas aos 5 dias pi. A presença destes foi observada até os 14 dias pi nos animais inoculados com Pb18.

Leveduras de *P. brasiliensis* foram detectadas, por imuno-histoquímica, ao longo de todo o período experimental sempre na região medular (Figura 6C). Entretanto, o número de fungos foi maior nos animais inoculados com a cepa de alta virulência Pb18.

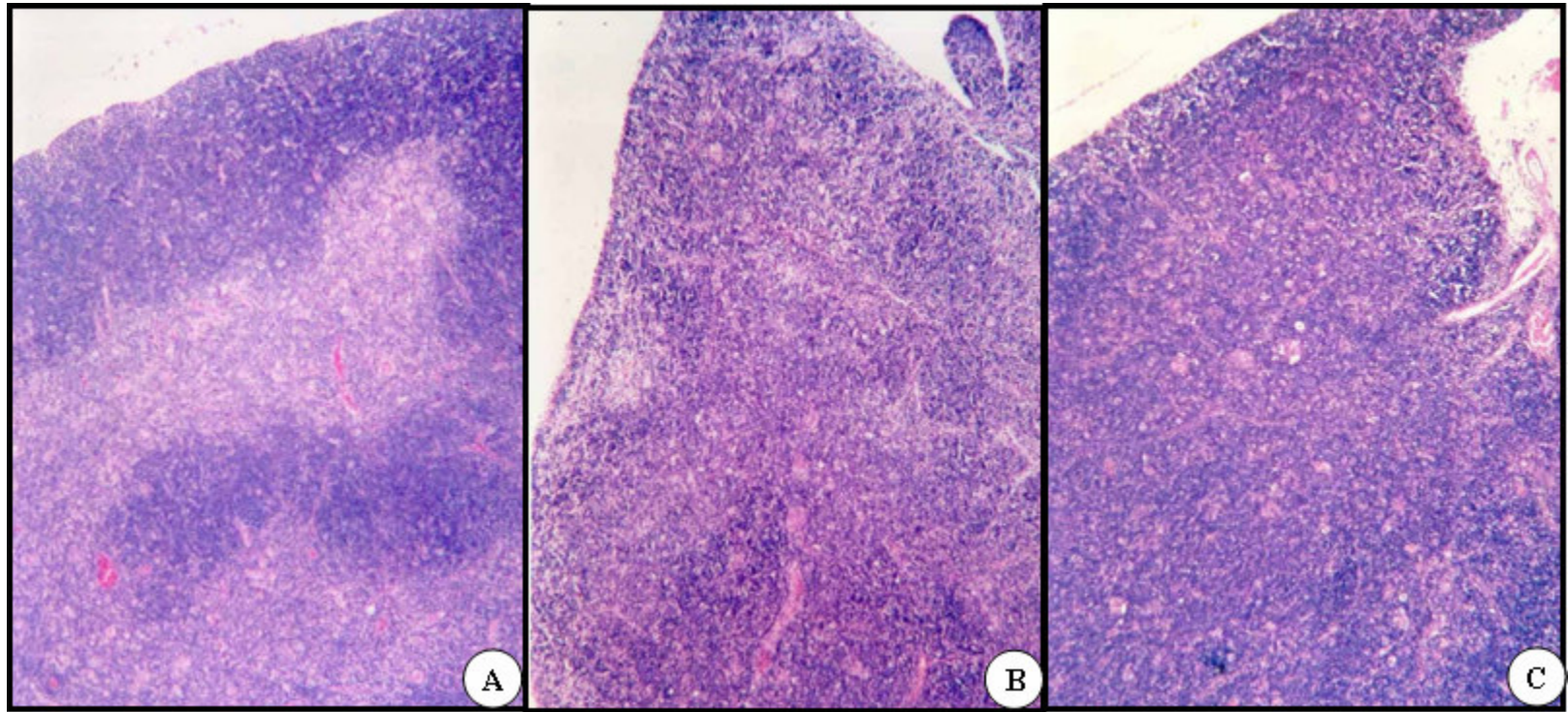


Figura 5: Perda da delimitação corticomedular no timo camundongos A/J infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos controle (A) e 3 dias após a infecção com Pb18 (B) ou Pb 265 (C). Notar a perda da regionalização nos camundongos infectados. Coloração HE. Aumento original 100x.

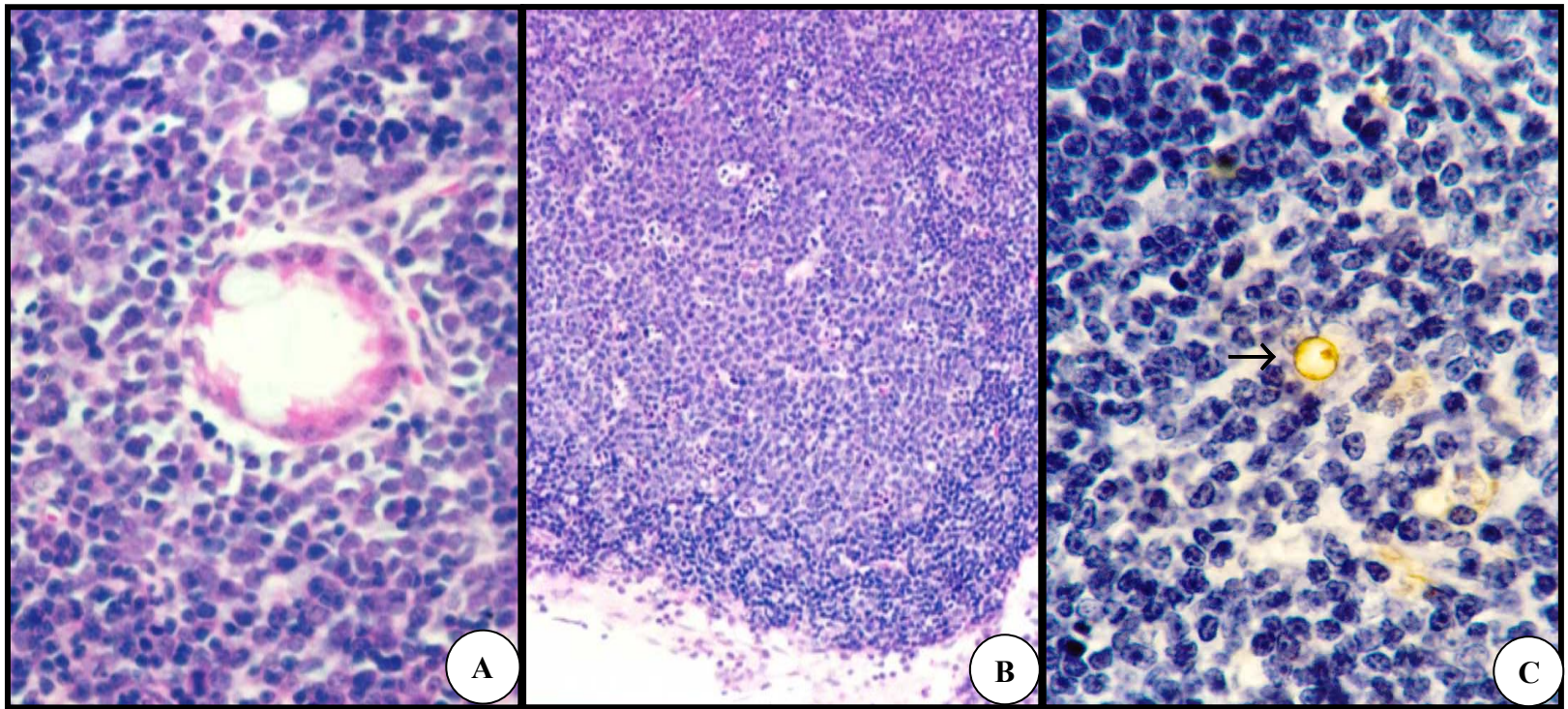


Figura 6: Timo e linfonodo paratímico de camundongos A/J infectados com *P. brasiliensis*.

A. Timo com cavidade revestida por epitélio ciliado. 5 dias pi. Coloração HE. Aumento original: 1.000x.

B. Linfonodo paratímico mostrando centro germinativo com células em apoptose (○) 5 dias pi. Coloração HE. Aumento original: 200x.

C. Medula tímica mostrando levedura de *P. brasiliensis* (→). 14 dias pi. Imuno-histoquímica contracorada com Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1.000x.

Infiltrados inflamatórios foram observados no timo ao longo de todo o período experimental. Às 24 horas pi observou-se, nos animais infectados com a cepa Pb18 ocorrência de um discreto infiltrado na cápsula, contendo células grandes com núcleo arredondado e células alongadas com núcleo fusiforme, também presentes em animais não infectados, além de alguns neutrófilos e eosinófilos, estes últimos somente presentes nos animais infectados (Figura. 7A) Estes eventos histológicos, se repetiram em animais infectados com a cepa de baixa virulência, porém em intensidade menor.

Um infiltrado inflamatório granulocítico, mais evidente em camundongos infectados com a cepa virulenta, também foi observado próximo à cápsula aos 3 dias de infecção (Figura 7B). Este infiltrado evoluiu, em ambos os grupos, até os 7 dias de infecção, período em que abrigava também numerosos plasmócitos (Figura 7C). A partir daí houve regressão na intensidade do infiltrado.

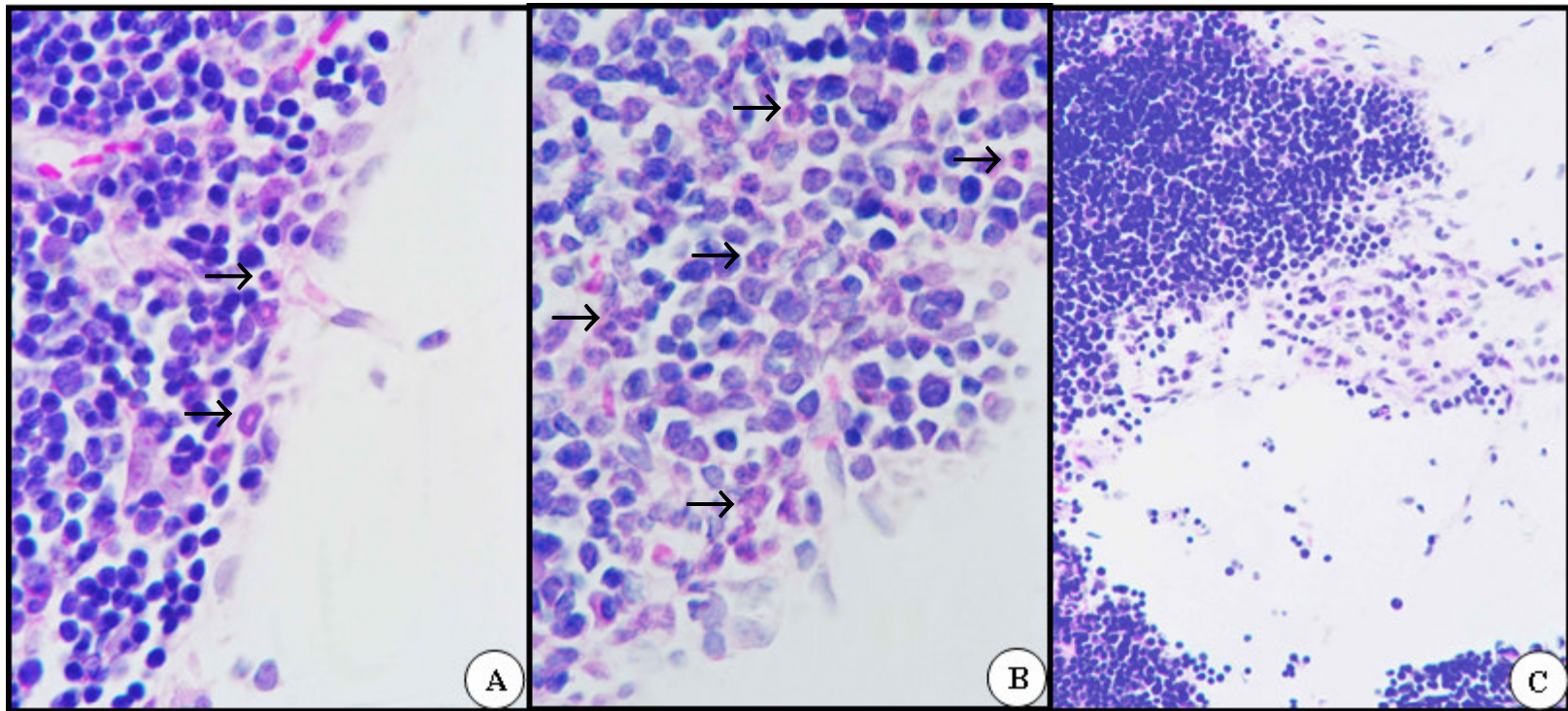


Figura 7: Infiltrado inflamatório na cápsula tímica de camundongos A/J infectados com *P. brasiliensis*.

A. Região capsular do timo de camundongo infectado com a cepa Pb18, mostrando vários granulócitos (→). 24 horas pi. HE. Aumento original: 1.000x.

B. Periferia cortical mostrando infiltração por polimorfonucleares (→) em timo de camundongo infectado com a cepa Pb18. 3 dias pi. HE. Aumento original: 1.000x.

C. Cápsula tímica em camundongo infectado com a cepa Pb265 mostrando infiltrado inflamatório composto predominantemente por plasmócitos. 7 dias pi. HE. Aumento original: 400x.

4.1.3.2. Animais Susceptíveis (Linhagem B10.A)

De modo semelhante ao observado nos camundongos da linhagem A/J, 24 horas pi, o córtex tímico mostrava-se normal nos camundongos B10.A inoculados com PBS (Figura 8A) e rarefeito nos camundongos infectados com *P. brasiliensis*, sendo que a presença de restos celulares e histiócitos conferia a essa região um padrão em “céu-estrelado” (Figuras 8B e 8C). Foram ainda observados grupos de células com núcleo picnótico na medula tímica (dados não mostrados).

O aumento na taxa de apoptose nessa linhagem também foi observado por meio da técnica TUNEL (Figura 9). Os animais infectados com a cepa Pb18 demonstraram um considerável aumento na taxa de apoptose desde as 24 horas pi; embora tenha ocorrido um decréscimo após o 3º dia de experimentação, os níveis de apoptose permaneceram superiores aos habituais durante todo o período experimental. De modo semelhante, camundongos infectados com a cepa Pb 265 apresentaram elevação na taxa de apoptose e esta também se manteve acima do normal até o fim do período de experimentação.

Decorridos 3 dias da inoculação, independente da cepa utilizada para a infecção, o timo dos camundongos B10.A apresentava padrão histológico semelhante, caracterizado pela perda da regionalização (Figura 10). A região cortical apresentava redução na densidade de timócitos e aumento no número de células estromais (Figura 11).

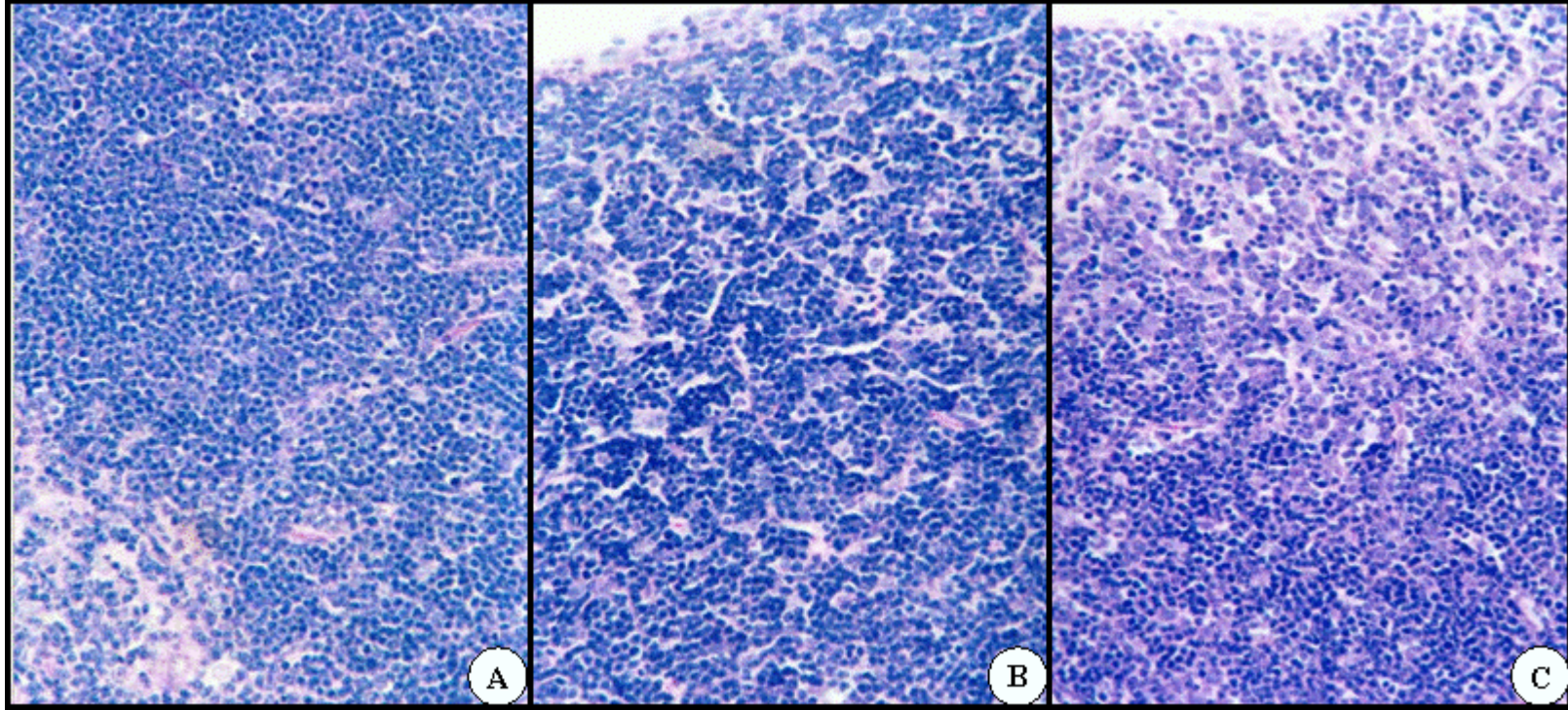


Figura 8: Córtex tímico em camundongos B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Controle (A), 24 horas após a infecção com Pb18 (B) e Pb 265 (C). Notar a rarefação do córtex e a ocorrência de um padrão em céu-estrelado. Coloração HE. Aumento original: 200x.

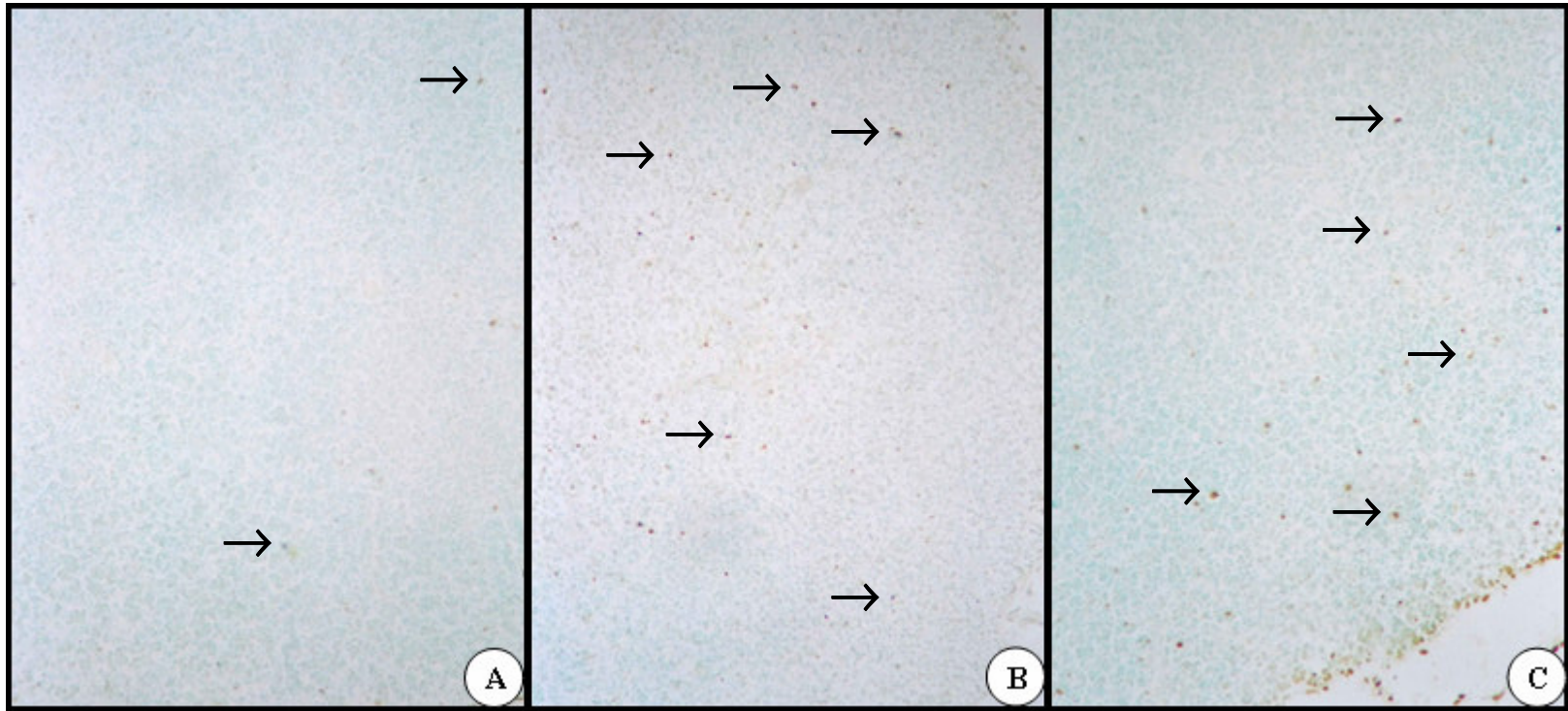


Figura 9: Apoptose no timo de camundongos B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Controle (A), 24 horas após a infecção com a cepa Pb18 (B) e 3 dias após a inoculação da cepa Pb265 (C). Notar aumento no número de células em apoptose (→) nos camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Método TUNEL contracorado com Verde de Metila. Aumento original: 200x.

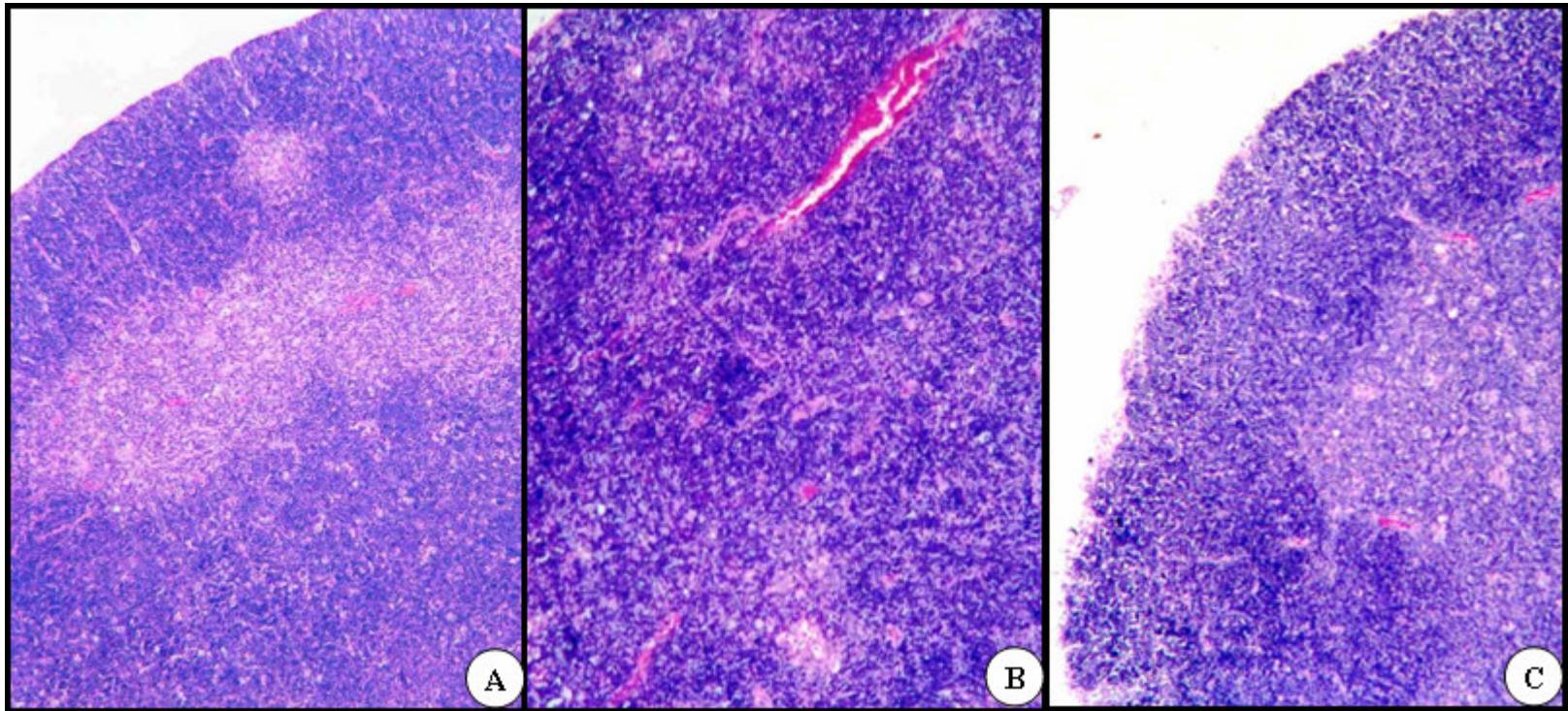


Figura 10: Perda de delimitação corticomedular no timo de camundongos B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos controles (A) e 3 dias após a infecção com Pb18 (B) ou Pb265 (C). Notar a perda da delimitação corticomedular nos camundongos inoculados com a cepa Pb18 (B) e atenuação nos inoculados com a cepa Pb265. Coloração HE. Aumento original 100x.

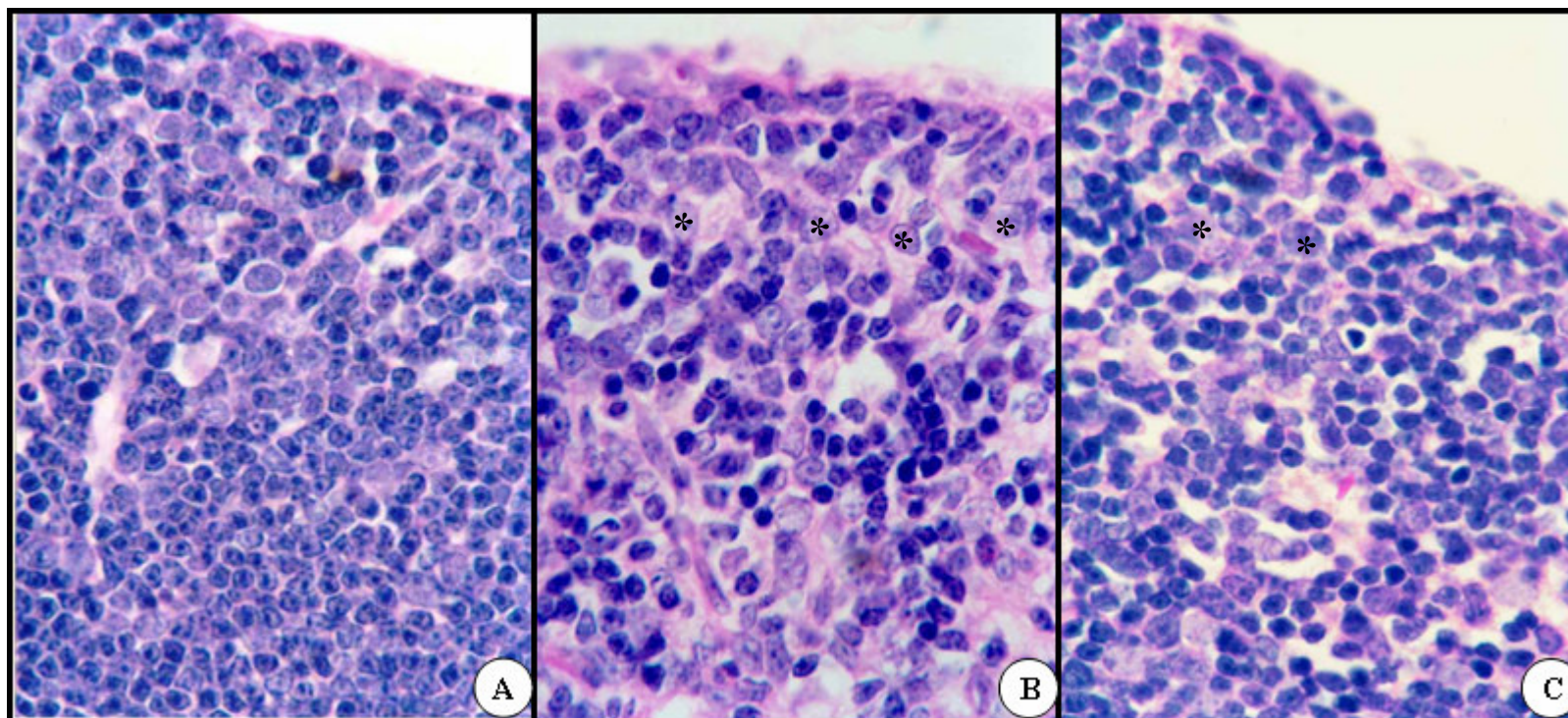


Figura 11: Rarefação do córtex tímico em camundongos B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos controles (A) e 3 dias após a infecção com Pb18 (B) ou Pb 265 (C). Notar a rarefação da camada cortical e o aumento no número de células estromais (*). Coloração HE. Aumento original: 1.000x.

Aos 5 dias de inoculação a arquitetura tímica foi recuperada em ambos os grupos. Neste período, nos animais infectados com a cepa Pb18 foi possível identificar, próximo ao timo, linfonodos paratímicos, os quais apresentavam centros germinativos com macrófagos contendo restos celulares (Figura 12A), além de várias leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 12B), localizados na região próxima à cápsula.

A hipertrofia dos linfonodos paratímicos foi observada também aos 14 dias pi, desta vez também em animais inoculados com a cepa não virulenta. Em ambos os grupos, os linfonodos apresentavam centros germinativos, macrófagos com restos celulares e intensa infiltração neutrofílica. O timo mostrou padrão histológico normal.

Por meio da técnica de imuno-histoquímica investigamos a presença do *P. brasiliensis* no timo. Em animais infectados com a cepa virulenta Pb18, figuras leveduriformes foram observadas desde 24 horas pi e estiveram presentes no timo, embora em menor número, até os 14 dias de inoculação. O timo de animais infectados com a cepa Pb265 apresentou menos leveduras e estas desapareceram após 7 dias de inoculação. Assim como na linhagem A/J, as leveduras de *P. brasiliensis* foram encontradas somente na região medular.

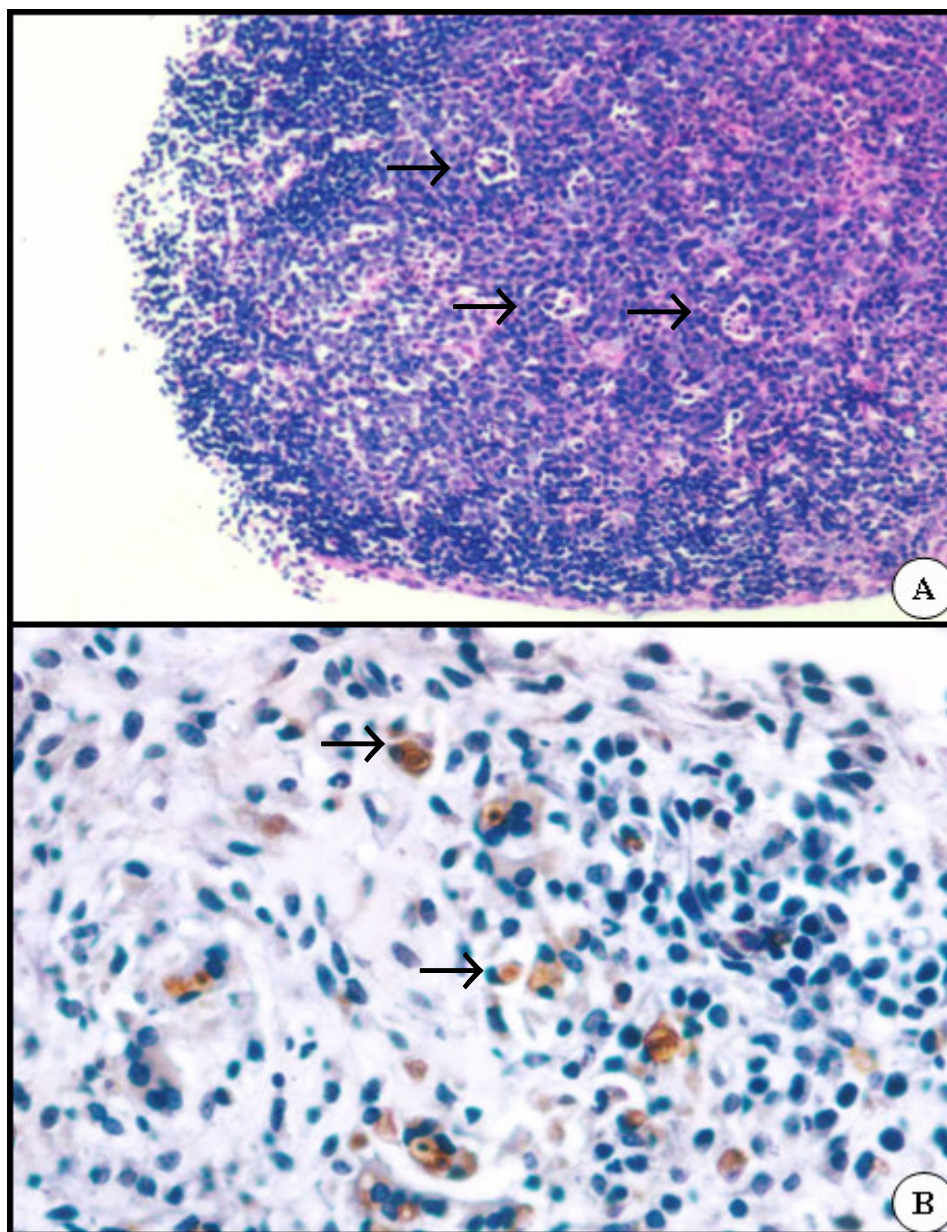


Figura 12: Linfonodos paratímicos de camundongos B10.A infectados com *P. brasiliensis*.

A. Linfonodo paratímico mostrando macrófagos contendo restos celulares (→). Coloração HE. 7 dias pi. Aumento original: 400x.

B. Linfonodo paratímico com leveduras de *P. brasiliensis* (→). 7 dias pi. Imuno-histoquímica contracorada com Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1.000x.

Assim como observado em camundongos resistentes, o timo dos camundongos susceptíveis infectados com a cepa Pb18 apresentou infiltrado inflamatório capsular, caracterizado pela ocorrência de neutrófilos desde 24 horas pi (Figura 13A), que foi mantido ao longo da infecção e tornou-se mais pronunciado aos 7 dias pi. Neste período, camundongos infectados com a cepa Pb265 também apresentaram infiltrado capsular com grande número de plasmócitos envolvendo quase todo o timo (Figura 13B).

Embora as modificações histológicas tenham obedecido ao mesmo padrão nos dois grupos experimentais, cabe ressaltar que as alterações foram mais pronunciadas e precoces em camundongos inoculados com a cepa de alta virulência Pb18.

4.1.4. Viabilidade do *P. brasiliensis* no Timo

Não foram recuperadas leveduras viáveis de *P. brasiliensis* no timo em nenhum dos períodos de infecção estudados independente da cepa ou linhagem envolvida, embora, tenha ocorrido recuperação destas a partir de amostras de fígado e o baço (dados não mostrados).

Tendo em vista que as principais alterações observadas no timo ocorreram quando da inoculação da cepa virulenta Pb18, optou-se por utilizar somente este isolado no restante dos experimentos. Assim, todos os resultados descritos a partir daqui foram obtidos utilizando-se a cepa Pb18.

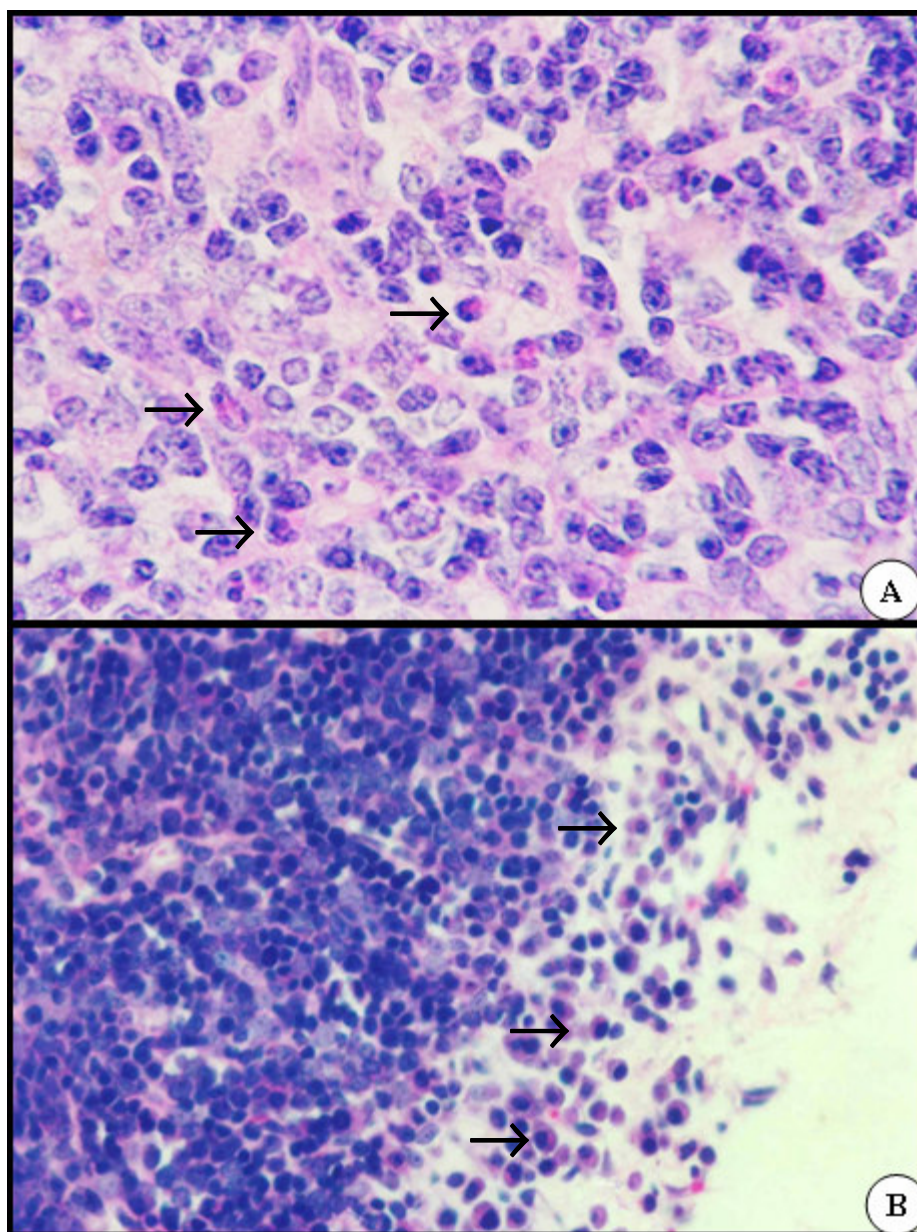


Figura 13: Infiltrado inflamatório no timo e cápsula tímica de camundongos B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Coloração HE.

A. Medula tímica em camundongo infectado com a cepa Pb18, mostrando vários granulócitos (→). 24 horas pi. Aumento original: 1.000x.

B. Cápsula tímica apresentando infiltrado com vários plasmócitos (→) em camundongo inoculado com a cepa Pb265. 7 dias pi. Aumento original: 400x.

4.2. Alterações Morfofisiológicas no Timo de Camundongos Susceptíveis e Resistentes à Paracoccidioidomicose Experimental.

4.2.1. Análise Morfométrica

4.2.1.1. Área Total do Timo

A área total do timo mostrou-se significativamente diminuída em ambas as linhagens (Figura 14) após a infecção com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis*. A redução na área teve início após 3 dias de inoculação e, apesar de uma pequena recuperação aos 5 dias, perdurou até os 14 dias pi.

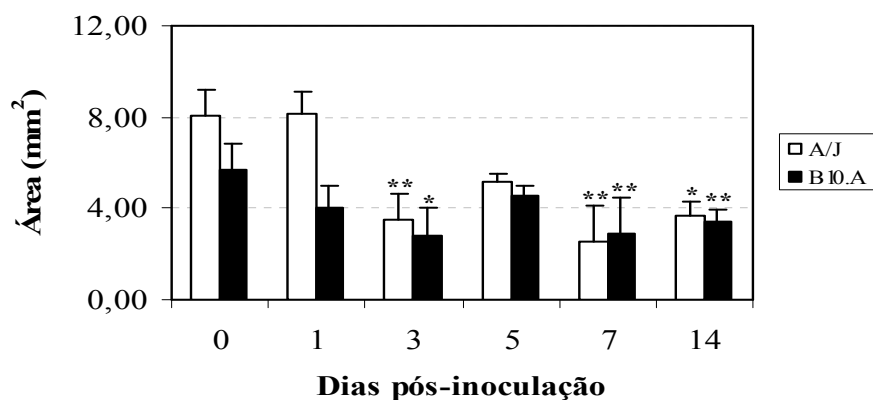


Figura 14: Avaliação da área total do timo em camundongos A/J e B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos controle (dia 0) ou infectados com Pb18. Os valores representam a área média encontrada em 4 animais $\pm$ o desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados).

4.2.1.2. Razão entre Córtex e Medula Tímica

A razão entre a área cortical e a área medular mostrou tendência à redução 24 horas pi. Após o 7º dia de inoculação houve aumento desta razão, como pode ser observado na Figura 15.

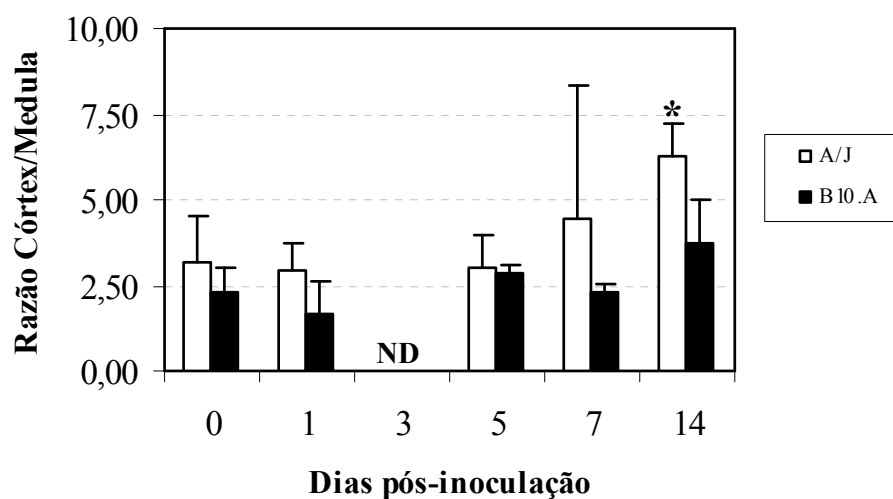


Figura 15: Avaliação da razão entre córtex e medula no timo de camundongos A/J e B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos controle (tempo 0) ou infectados com Pb18. Os valores representam a razão média encontrada em 4 animais $\pm$ o desvio padrão. ND: Não determinado. * $p < 0,05$ (Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados).

4.2.2. Análise Ultra-estrutural do Timo

4.2.2.1. Camundongos Resistentes (A/J)

Nestes camundongos, logo às 24 horas pi notou-se que o córtex tímico encontrava-se menos regular e organizado do que nos controles. Timócitos e células do estroma cortical mostraram sinais de degeneração, como intensa vacuolização (Figura 16A) e desorganização de mitocôndrias (Figura 16B). Macrófagos com vacúolos fagocíticos, contendo restos de células em apoptose também foram observados (Figura 16C). Além disso, vários eosinófilos, normalmente raros neste tecido, foram observados após a infecção.

Aos 3 dias pi, verificou-se a presença de muitos eosinófilos, além de fibroblastos e mastócitos (Figura 17A). Embora neste período tenha ocorrido uma redução na quantidade de vacúolos observados, em algumas células estromais observamos dilatação das cisternas do retículo endoplasmático (Figura 17B).

Após 5 dias de inoculação, o córtex mostrava-se ainda menos uniforme do que nos animais controle, os timócitos apresentavam citoplasma mais abundante, núcleo menos condensado e um número maior de mitocôndrias; restos celulares e corpos apoptóticos eram ainda vistos em abundância (Figura 17C). Várias figuras de mitose também foram observadas (dados não demonstrados).

Após este período as alterações tímicas mostraram-se menos pronunciadas e tenderam à resolução.

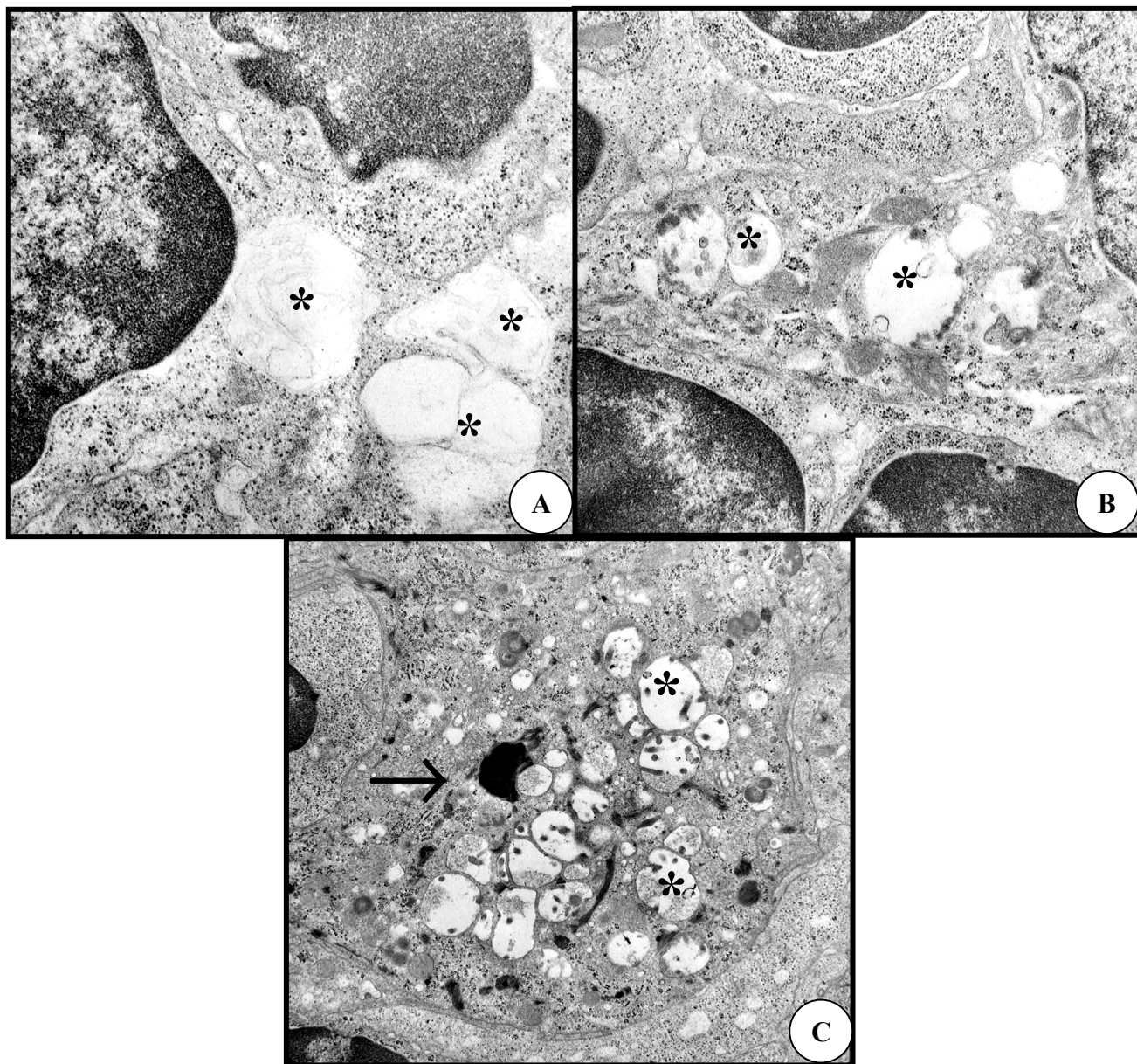


Figura 16: Análise ultra-estrutural do timo de camundongos A/J inoculados com *P. brasiliensis*.

D. Vacúolos presentes em célula estromal do córtex tímico (*). 24 horas pi. Aumento original: 12.930x.

E. Degeneração de mitocôndrias em timócitos corticais (*). 24 horas pi. Aumento original: 16.700x.

F. Macrófago com vacúolos fagocíticos (*) e corpo apoptótico (→). 3 dias pi. Aumento original: 7.750x.

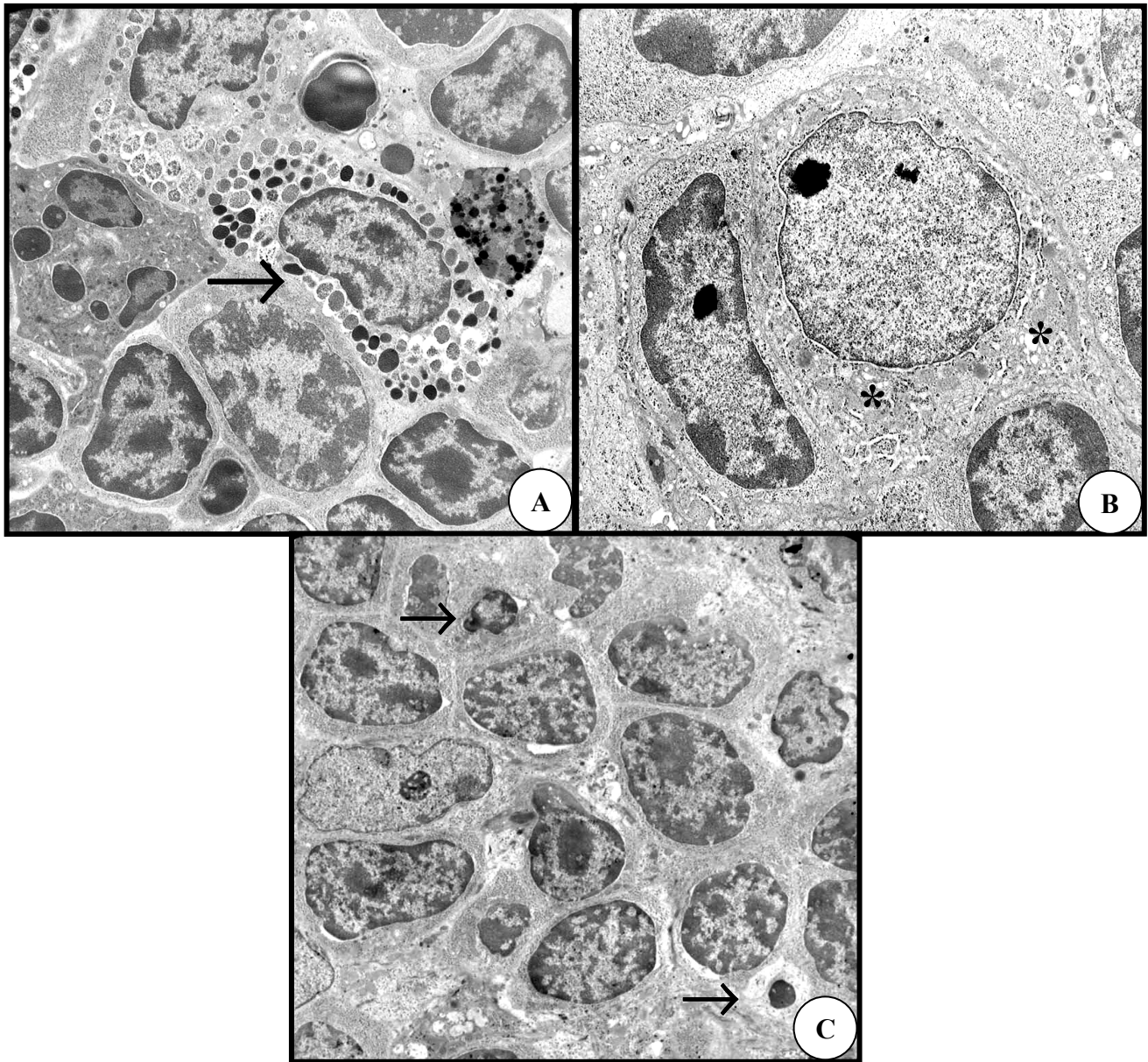


Figura 17: Ultra-estrutura do timo de camundongos A/J inoculados com *P. brasiliensis*.

A. Mastócito presente no córtex tímico (→). 3 dias pi. Aumento original: 3.597x.

B. Dilatação do retículo endoplasmático (*) em célula do estroma. 3 dias pi. Aumento original: 6.000x.

C. Córtex tímico mostrando timócitos com citoplasma abundante e núcleo pouco condensado. Corpos apoptóticos também são vistos (→). 5 dias pi. Aumento original: 2.784x

4.2.2.2. Camundongos Susceptíveis (B10.A)

Após 24 horas de inoculação notou-se aumento no número de células em apoptose, caracterizadas por apresentarem núcleos altamente condensados (Figura 18A). Muitas células com vacúolos e mitocôndrias degeneradas também foram observadas (Figuras 18B e 18C).

Aos 3 dias pi vários granulócitos foram observados, especialmente na medula tímica, além de várias células em apoptose e também macrófagos com diversos vacúolos fagocíticos. Muitas células em apoptose (Figura 19A) e timócitos com citoplasma eletroluminescente e organelas degeneradas (Figura 19B) foram ainda vistos aos 5 dias de inoculação. Neste período, muitas células em divisão também foram observadas no córtex tímico (Figura 19C).

Nesta linhagem, mesmo após 14 dias de inoculação, o timo manteve uma taxa de apoptose elevada caracterizada pela ocorrência de grande número de timócitos com citoplasma eletroluminescente e núcleo altamente condensados (Figura 19D).

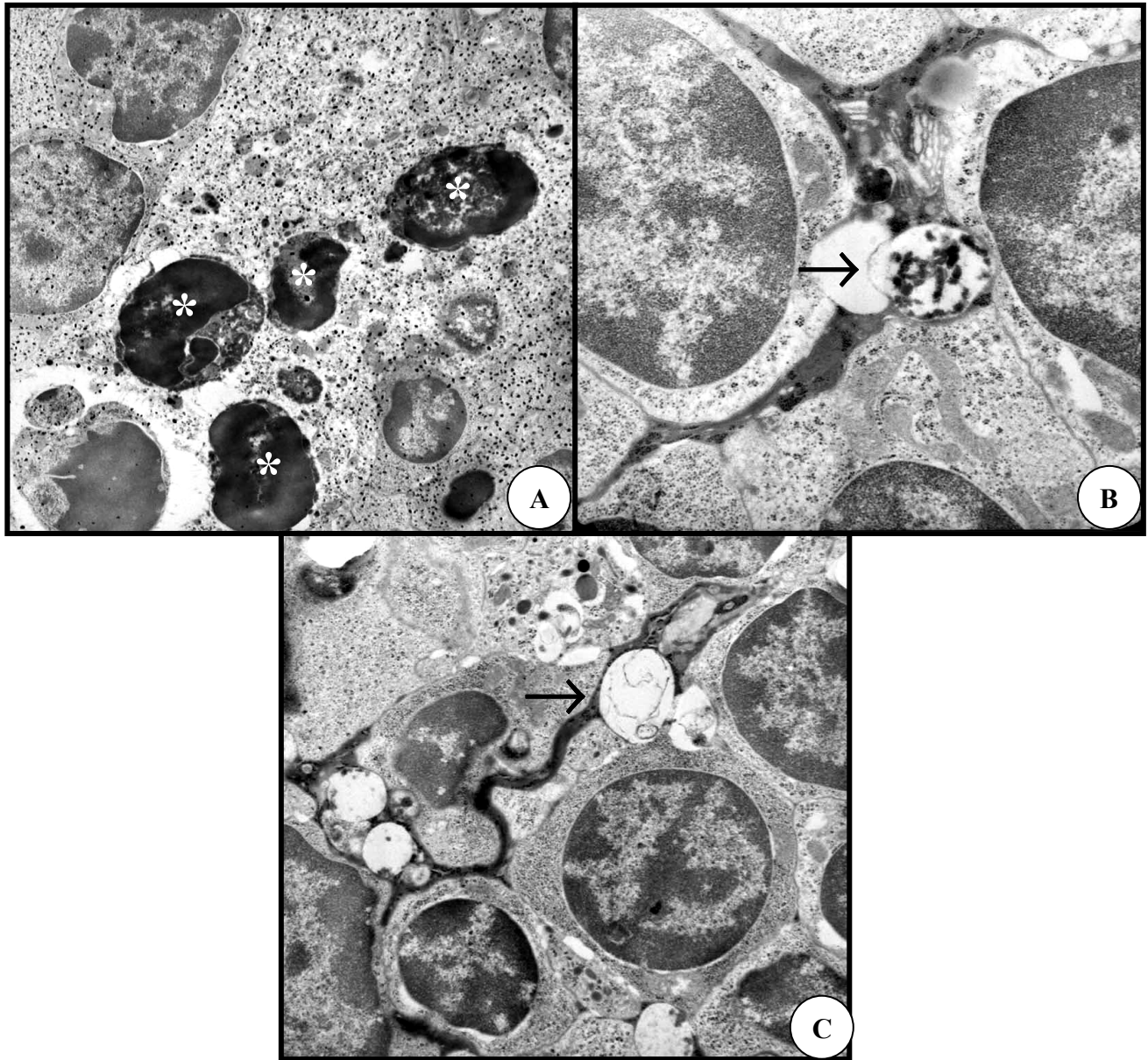


Figura 18: Análise ultra-estrutural do timo de camundongos B10.A inoculados com *P. brasiliensis*.

A. Células do córtex tímico em apoptose (*). 24 horas pi. Aumento original: 4.646x.

B. Timócito com mitocôndria degenerada (→). 24 horas pi. Aumento original: 12.930x

C. Timócito apresentado vacúolos (→). 24 horas pi. Aumento original: 6.000x

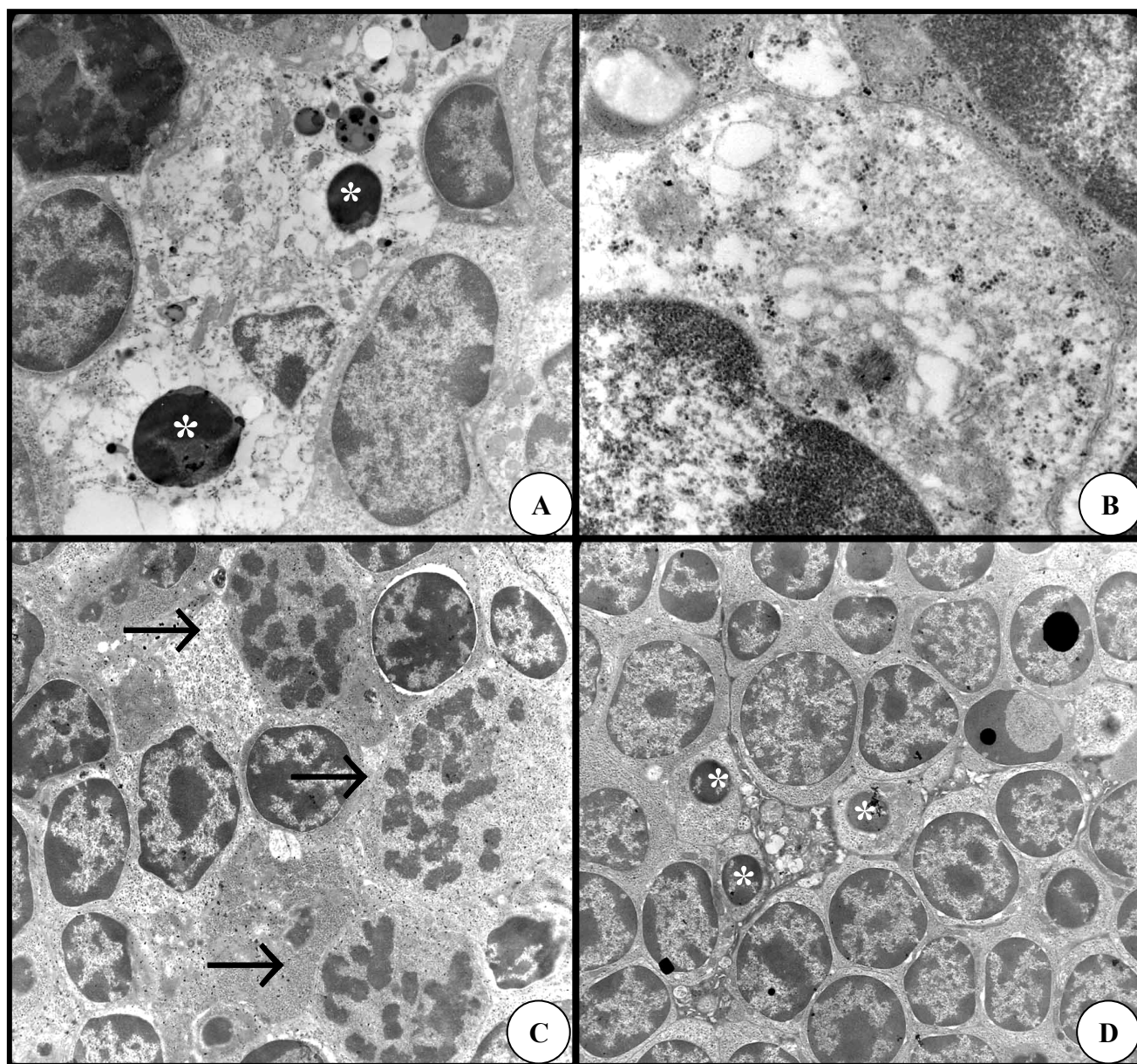


Figura 19: Ultra-estrutura do timo de camundongos B10.A inoculados com *P. brasiliensis*.

A. Córtex tímico mostrando células em apoptose (*). 5 dias pi. Aumento original: 4.646x.

B. Timócito apresentando organelas degeneradas. 5 dias pi. Aumento original: 21.560x.

C. Córtex tímico com timócitos em divisão (→). 5 dias pi. Aumento original: 3.597x.

D. Córtex tímico contendo timócitos com citoplasma eletroluminescente e núcleo altamente condensado. 14 dias pi. Aumento original: 2.784x.

4.2.3. Quantificação das Subpopulações de Timócitos

A quantificação das subpopulações de timócitos foi feita por citometria de fluxo. Os camundongos da linhagem A/J não apresentaram alterações significativas nestas subpopulações ao longo de toda a infecção experimental com a cepa Pb18 (Figura 20).

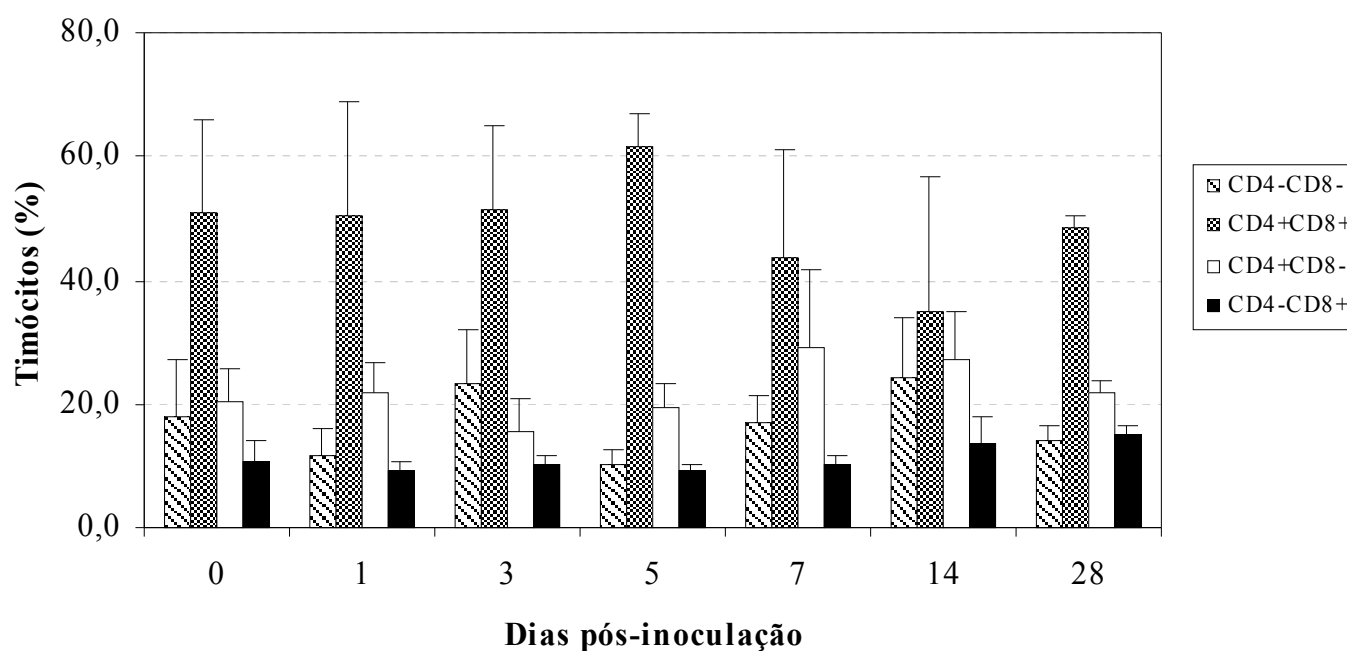


Figura 20: Avaliação das subpopulações de timócitos em camundongos A/J infectados com *P. brasiliensis* por citometria de fluxo. Os valores expressam a porcentagem média encontrada em 4 animais $\pm$ o desvio padrão e são representativos de dois experimentos independentes.

Os camundongos da linhagem B10.A quando infectados com Pb18, por outro lado, apresentaram no 5º dia pi uma tendência de redução nas populações examinadas exceto que houve um aumento significativo na porcentagem de timócitos CD4+CD8- como apresentado na Figura 21.

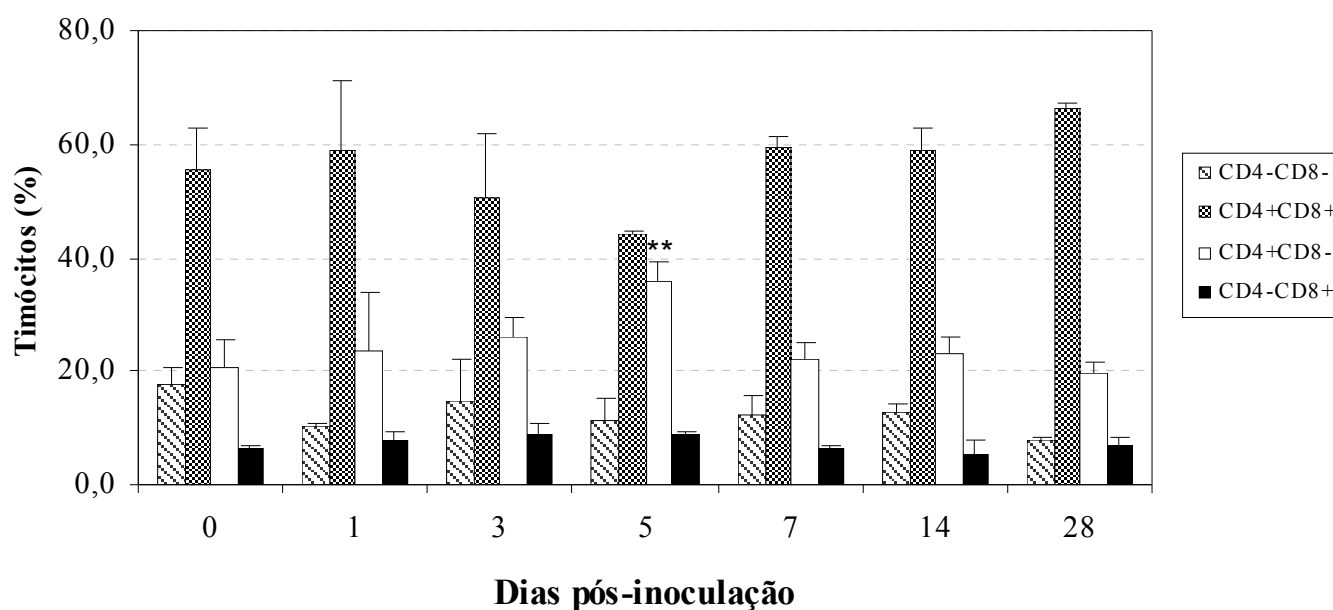


Figura 21: Avaliação das subpopulações de timócitos em camundongos B10.A infectados com *P. brasiliensis* por citometria de fluxo. Os valores expressam a porcentagem média encontrada em 4 animais $\pm$ o desvio padrão e são representativos de dois experimentos independentes. ** $p < 0,01$: Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados (dia 0).

4.3. Participação de Citocinas Pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) na Atrofia Tímica.

4.3.1. Dosagem Sérica

A dosagem sérica de TNF e IFN- γ por ELISA foi negativa tanto nos animais controle quanto nos infectados com a cepa Pb18, independente da linhagem empregada e do período experimental avaliado.

4.3.2. Dosagem no Sobrenadante do Macerado de Timo e Baço

Tendo em vista que a dosagem sérica de TNF e IFN- γ mostrou-se sempre negativa, provavelmente por estas citocinas estarem presentes em níveis abaixo do limite mínimo de detecção do “kit” utilizado, optou-se pela pesquisa direta no timo e no baço, utilizando o sobrenadante do macerado destes órgãos. Entretanto, esta pesquisa também resultou negativa.

4.3.3. Detecção *In Situ* de TNF e IFN- γ no Timo

Considerando os vários relatos na literatura sobre a participação do IFN- γ e, principalmente, do TNF na atrofia tímica, a presença destas citocinas *in situ* foi verificada através da técnica imuno-histoquímica, a despeito dos resultados negativos obtidos na dosagem no soro e macerado de timo e baço.

4.3.3.1. Detecção de IFN- γ no Timo

O padrão de positividade para IFN- γ no timo foi semelhante em camundongos A/J e B10.A, assim, a descrição das alterações será feita em conjunto.

Nos camundongos não infectados, foram observadas células positivas para IFN- γ em todo o timo. Estas se caracterizavam por serem grandes, apresentarem núcleo frouxo e citoplasma abundante, e estavam localizadas principalmente na região cortical e na junção cortico-medular. Nos animais infectados com *P. brasiliensis*, o aspecto das células positivas foi semelhante ao observado nos controles (Figura 22A), entretanto, estas se encontravam em menor quantidade e mais concentradas na região medular, especialmente no 5º dia de infecção.

4.3.3.2. Detecção de TNF no Timo

Na medula tímica dos camundongos controles, foram observadas várias células dispersas intensamente marcadas para TNF, estas células eram grandes e possuíam abundante citoplasma (Figura 22B).

Após a infecção com *P. brasiliensis* houve redução na quantidade e na intensidade de marcação destas células (Figura 22C). Por outro lado, algumas células pequenas mostraram-se positivas no córtex. A partir do 7º dia de infecção, o padrão de marcação foi restituído nos animais infectados.

Camundongos B10.A controle apresentaram poucas células marcadas na medula e com menor intensidade. Embora as alterações observadas nesta linhagem tenham sido semelhantes às encontradas na linhagem A/J, o padrão normal foi restabelecido logo aos 5 dias de inoculação (dados não demonstrados).

Tendo em vista as alterações observadas no padrão de expressão destas citocinas durante o processo de atrofia tímica induzida pelo *P. brasiliensis*, optou-se

pela utilização de camundongos nocautes para o IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) e camundongos nocautes para o receptor p55 de TNF (TNFRp55 $^{-/-}$) para um melhor entendimento do papel destas citocinas na atrofia tímica induzida pela paracoccidiodomicose experimental. Os resultados encontrados nestes camundongos inoculados com a cepa Pb18 são descritos a seguir.

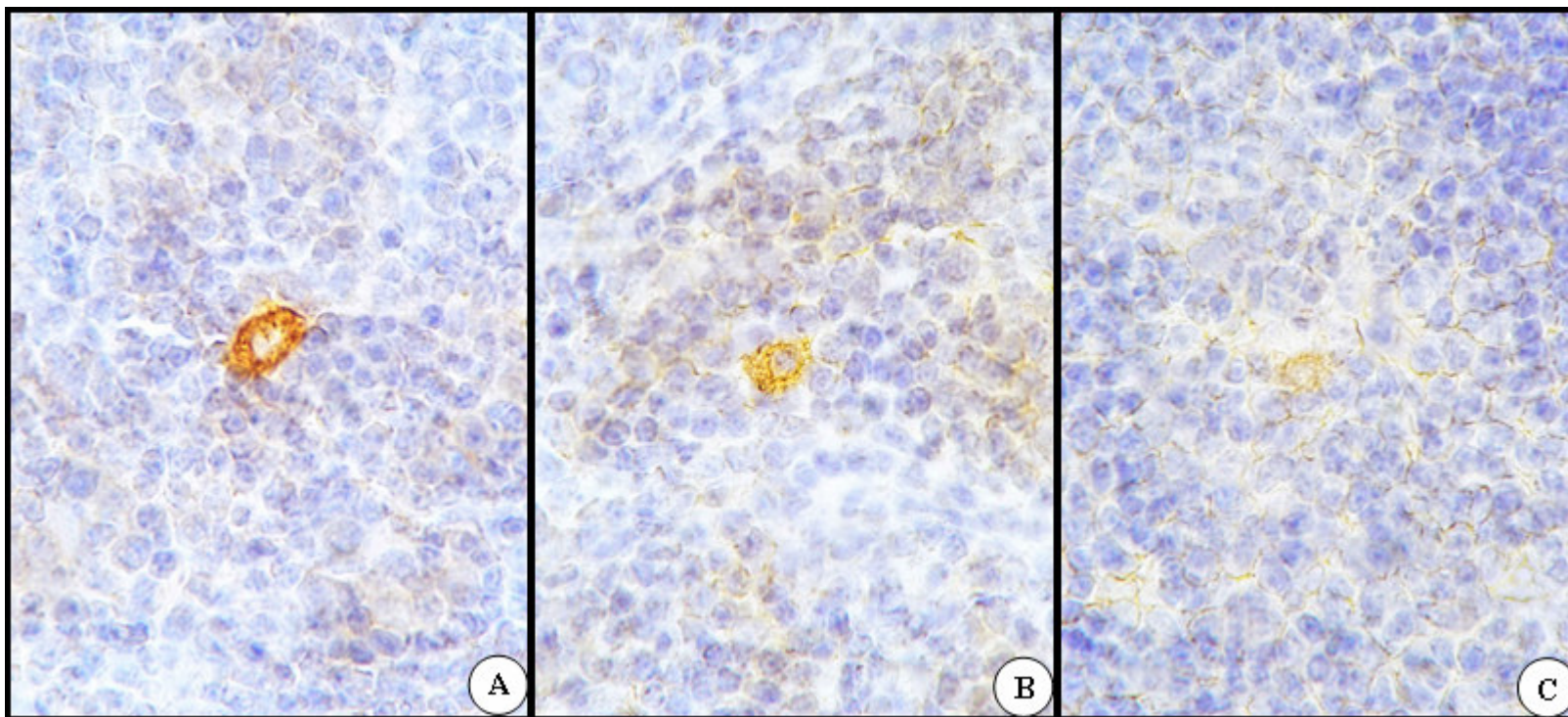


Figura 22: Imuno-histoquímica para detecção *in situ* de IFN- γ e TNF em camundongos controles ou infectados com *P. brasiliensis*. Contracoloração com Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1.000x.

A. Medula tímica de camundongo A/J, mostrando célula intensamente marcada. 7 dias após a infecção com *P. brasiliensis*. Imuno-histoquímica para IFN- γ .

B. Medula tímica de camundongo A/J controle, mostrando célula intensamente marcada. Imuno-histoquímica para TNF.

C. Medula tímica de camundongo A/J 24 horas após a infecção com Pb18, mostrando célula fracamente marcada. Imuno-histoquímica para TNF.

4.3.4. Infecção Experimental em Camundongos TNFRp55^{-/-} e IFN- γ ^{-/-}

4.3.4.1. Peso Tímico

Os camundongos C57Bl/6 wt e C57Bl/6 TNFRp55^{-/-} apresentaram atrofia tímica significativa aos 3 e 7 dias pi, entretanto, cabe ressaltar que os selvagens sofreram uma redução brusca com tendência à recuperação, enquanto os TNFRp55^{-/-} apresentaram uma redução mais lenta e gradativa, como pode ser verificado na Figura 23. Os camundongos C57Bl/6 IFN- γ ^{-/-} não sofreram atrofia tímica significativa.

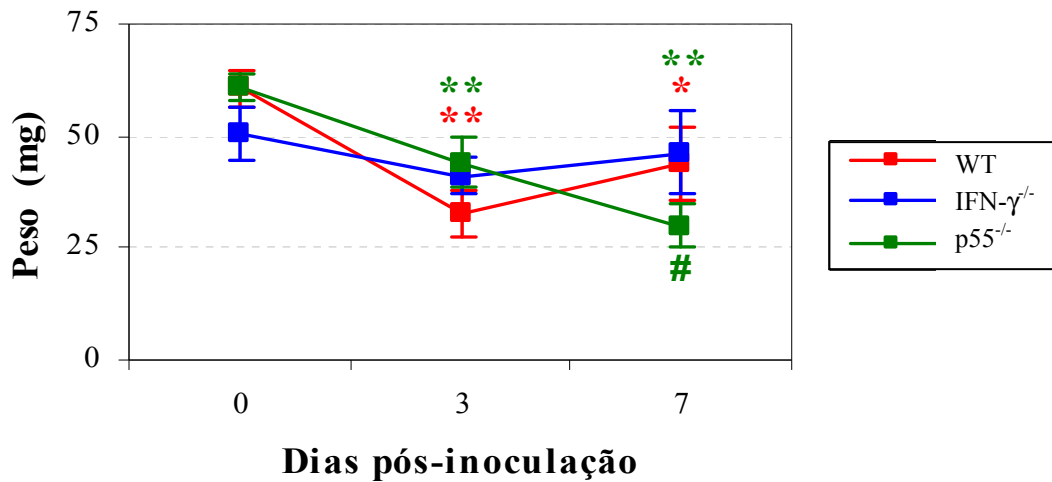


Figura 23: Avaliação do peso do timo em camundongos C57Bl/6 wt, IFN- γ ^{-/-} e TNFRp55^{-/-} infectados com *P. brasiliensis*. Os valores representam o peso médio encontrado em 3 animais $\pm$ o desvio padrão. (Teste de comparações múltiplas de Dunnett: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ animais infectados comparados com controles (dia 0); # $p < 0.05$ animais nocautes (-/-) comparados com os selvagens (wt).

4.3.4.2. Análise Histopatológica do Timo

Os camundongos C57Bl/6 wt quando infectados pelo *P. brasiliensis* apresentaram alterações histológicas semelhantes às observadas nas linhagens A/J e B10.A. A principal delas foi a perda da delimitação corticomedular aos 3 dias de inoculação (Figura 24).

Nos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ não verificamos alterações na arquitetura tímica e as regiões cortical e medular puderam ser claramente distintas durante toda a fase aguda da infecção (Figura 24).

Os camundongos TNFRp55 $^{-/-}$, como previamente descrito na literatura, apresentaram desenvolvimento normal do timo, com peso e arquitetura preservados (Figura 25A). A infecção pelo *P. brasiliensis*, contudo, levou à atenuação da delimitação corticomedular semelhante àquela ocorrida nos camundongos selvagens, como pode ser observado na Figura 25B.

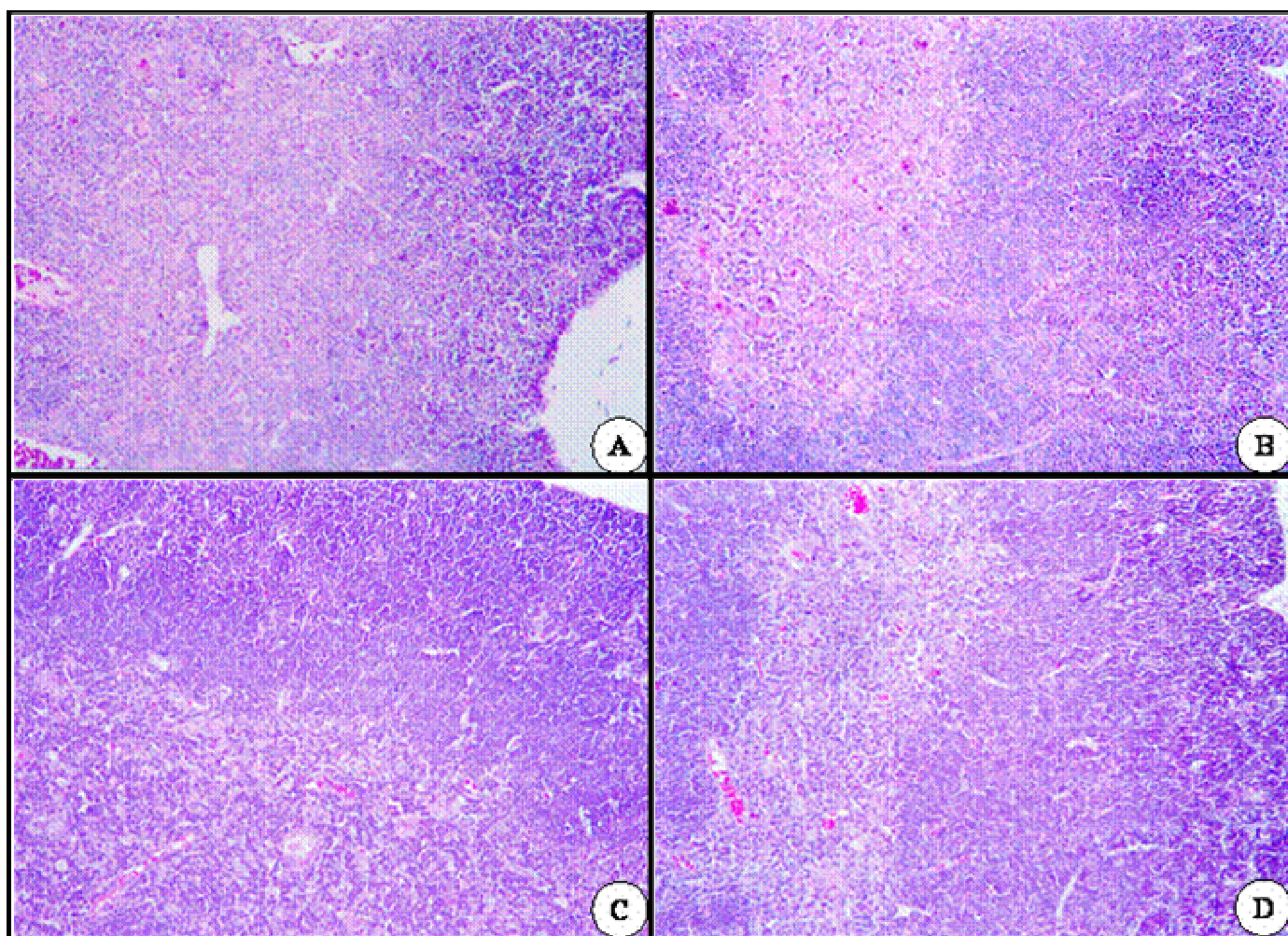


Figura 24: Timo de camundongos C57Bl/6 wt ou IFN- $\gamma^{-/-}$ controles ou infectados com *P. brasiliensis*. Notar clara delimitação corticomedular em camundongos wt (A) e nocautes (B) antes da infecção e a perda desta delimitação 3 dias pi em camundongos wt (C), mas não em IFN- $\gamma^{-/-}$ (D). Coloração HE. Aumento original: 100x.

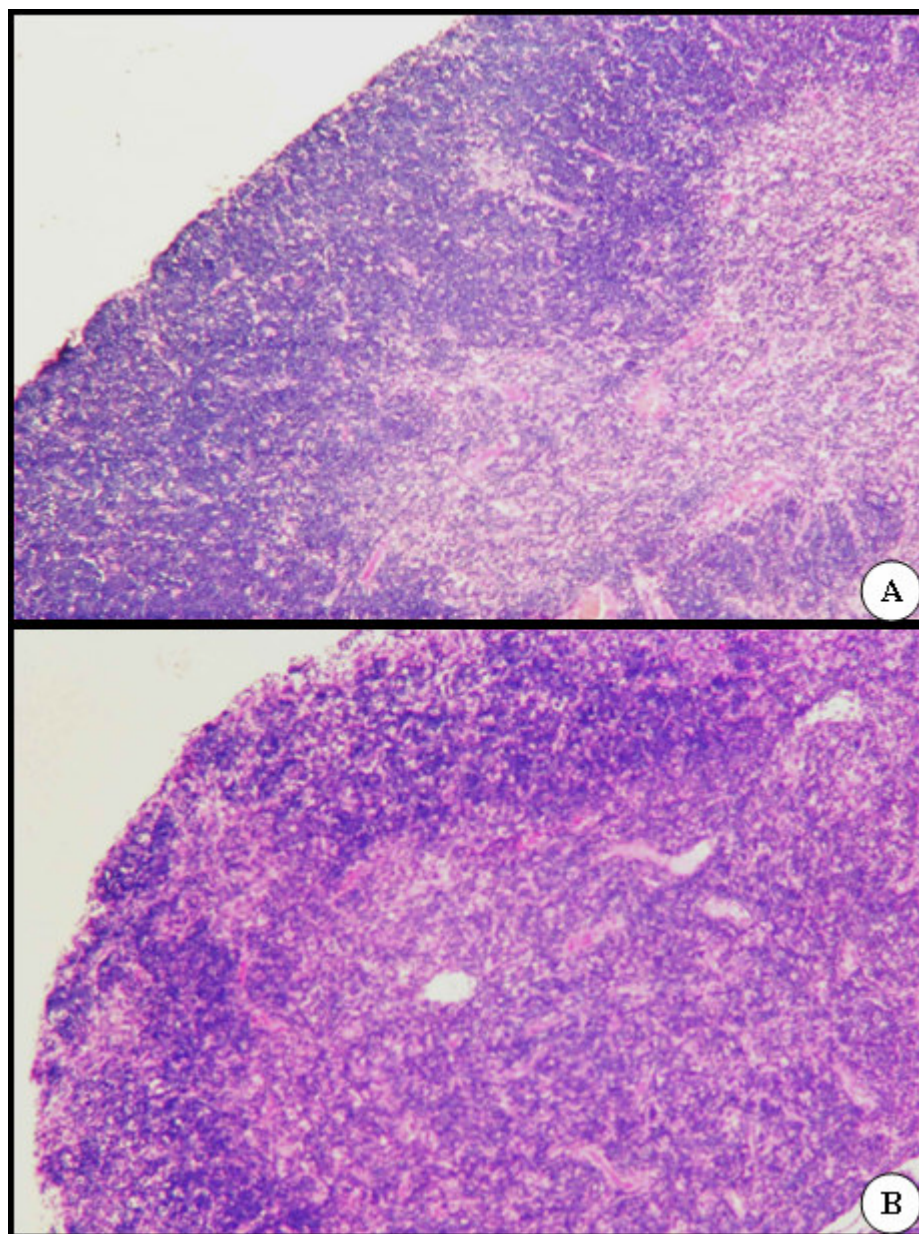


Figura 25: Timo de camundongo C57Bl/6 TNFRp55^{-/-} controle ou infectado com *P. brasiliensis*. Notar clara delimitação corticomedular em camundongo não infectado (A) e a atenuação desta 3 dias após a infecção (B). Coloração HE. Aumento original: 100x.

4.3.4.3. Detecção de Apoptose

Assim como observado nas linhagens A/J e B10.A, os camundongos C57Bl/6 wt apresentaram aumento nos níveis de apoptose tímica após a infecção com o *P. brasiliensis*, como demonstra a Figura 26. Os níveis apoptóticos mostraram-se bastante elevados aos 3 dias pi e menos elevados aos 7 dias pi, embora ainda maiores do que no timo de animais não infectados.

Os camundongos TNFRp55^{-/-} mostraram altos níveis de apoptose antes da infecção (Figura 27A). Após a infecção, os níveis de apoptose diminuíram (Figura 27B) e permaneceram baixos mesmo após 7 dias de inoculação (Figura 27C).

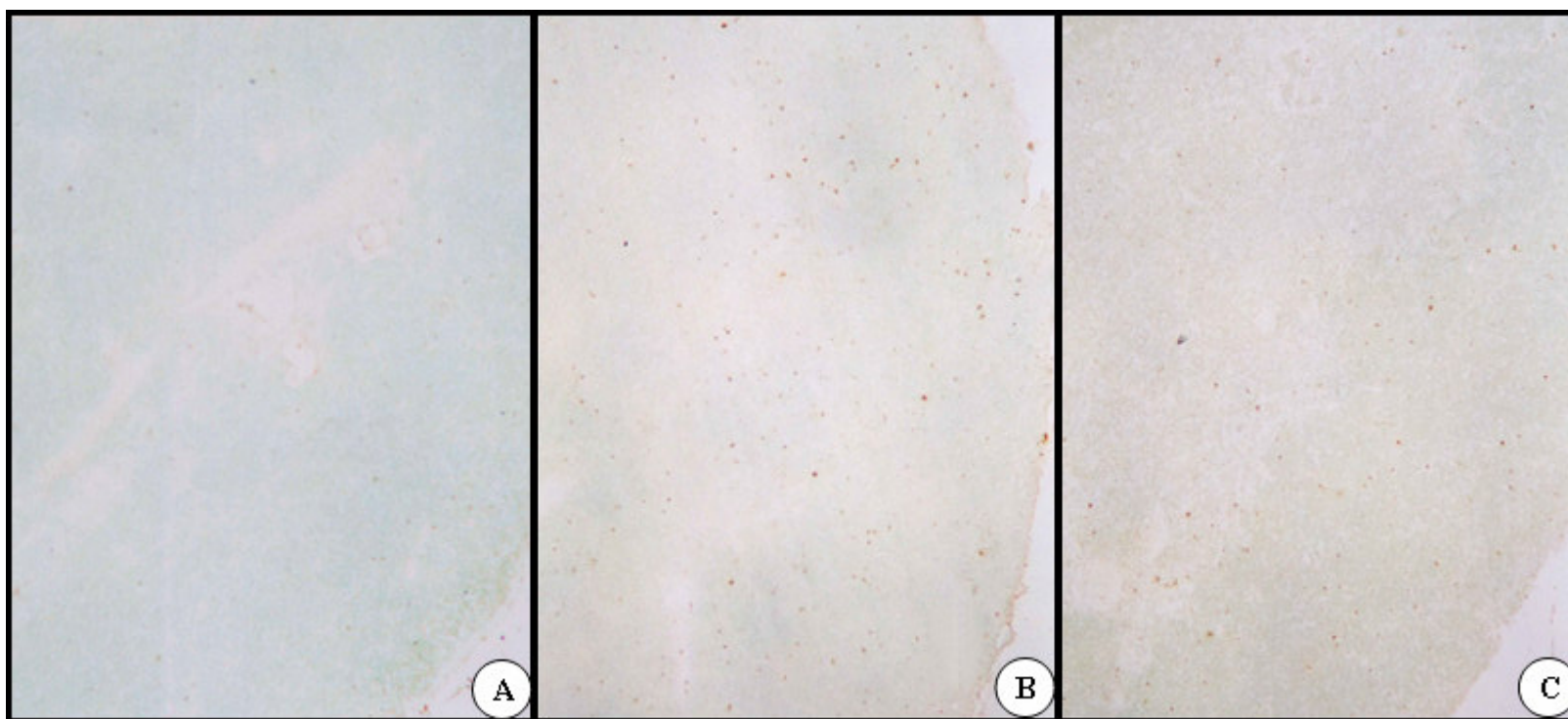


Figura 26: Apoptose no timo de camundongos C57Bl/6 wt infectados com *P. brasiliensis*. Controle (A) e 3 ou 7 dias após a infecção (B e C, respectivamente). Método TUNEL contracorado com Verde de Metila. Aumento original: 100x.

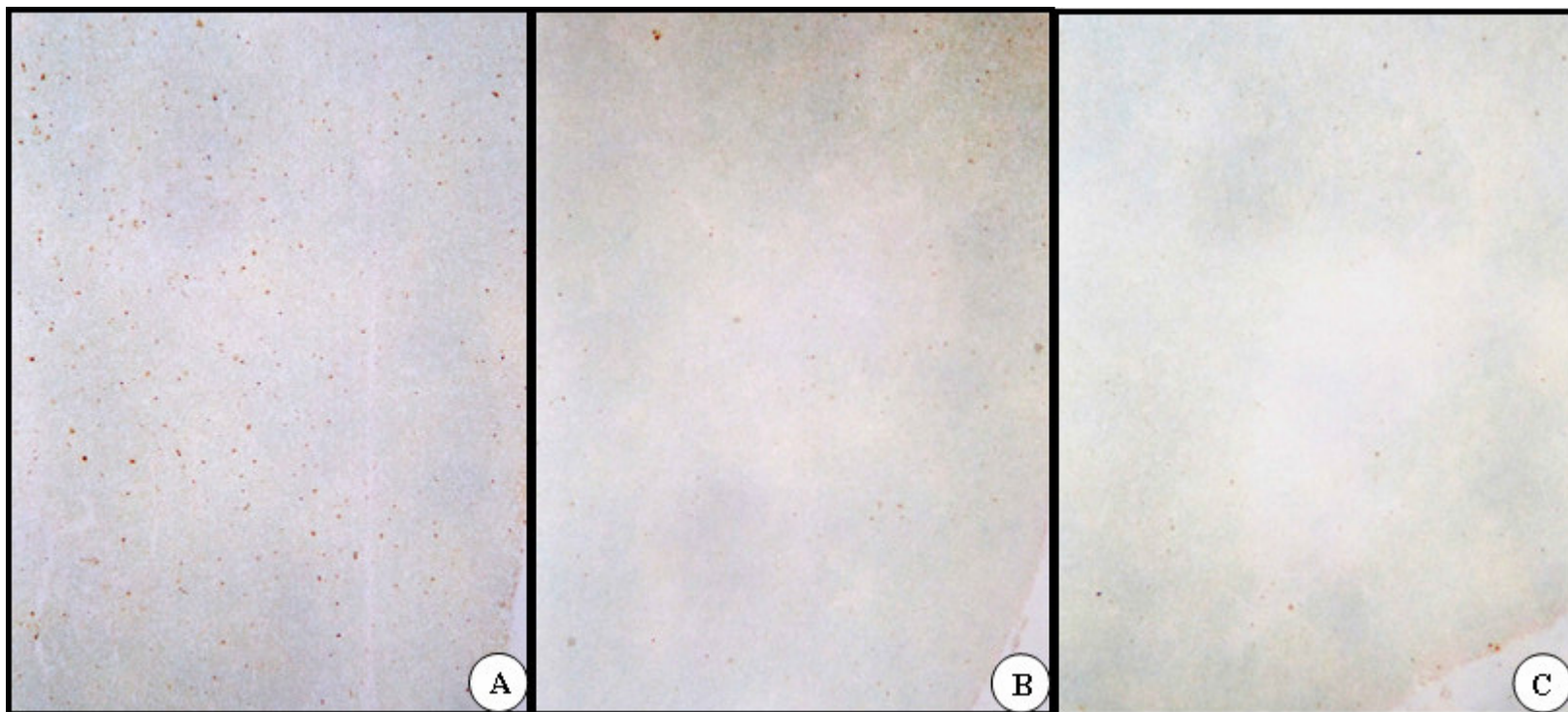


Figura 27: Apoptose no timo de camundongos C57Bl/6 TNFRp55^{-/-} infectados com *P. brasiliensis*. Controle (A) e 3 ou 7 dias após a infecção (B e C, respectivamente). Método TUNEL contracorado com Verde de Metila. Aumento original: 100x.

4.4. Análise de Parâmetros da Resposta Imunológica em Camundongos A/J e B10.A Infectados com *P. brasiliensis*.

4.4.1. Análise Histopatológica das Lesões Induzidas pelo *P. brasiliensis* em Fígado e Baço.

A análise histopatológica das lesões induzidas pelo *P. brasiliensis* foi feita para a avaliação do padrão de resposta imune de cada linhagem frente à infecção pelo *P. brasiliensis*.

Inicialmente, as lesões foram similares nas duas linhagens e caracterizaram-se pela ocorrência de infiltrados inflamatórios ricos em neutrófilos, com poucos macrófagos e linfócitos, envolvendo leveduras de *P. brasiliensis* com aspecto bem preservado tanto no baço quanto no fígado (Figura 28A). Com a evolução da infecção, o perfil histológico alterou-se, havendo um predomínio de células mononucleares (Figura 28B). Apesar disso, em camundongos A/J, um grande número de neutrófilos persistia em meio às lesões (Figura 28C).

Estas lesões assumiram aspecto granulomatoso, com predominância de células mononucleares e aparecimento de macrófagos com aspecto epitelióide. A partir daí, os granulomas tornaram-se mais organizados, e caracterizaram-se, em sua maioria, pela presença de centros necróticos com fungos e restos celulares, cercados por uma camada de macrófagos, linfócitos e células epitelióides e, mais externamente, por uma capa de tecido conjuntivo (Figura 29A e 29B). Em camundongos resistentes, estes granulomas eram mais organizados, compactos e melhor delimitados (Figura 29B).

Camundongos resistentes mostraram lesões com tendência à resolução, caracterizadas por granulomas compactos (Figura 29C) compostos por macrófagos, grande número de células epitelióides, linfócitos e poucos fungos (Figura 29D).

Até o período de 14 dias pi, os camundongos susceptíveis não mostraram tendência à resolução da infecção. Os granulomas encontrados eram frouxos, com poucas células epitelióides, sem a presença de halos linfocitários (Figuras 30A e 30B) e com um grande número de leveduras de *P. brasiliensis* em multiplicação (Figura 30C).

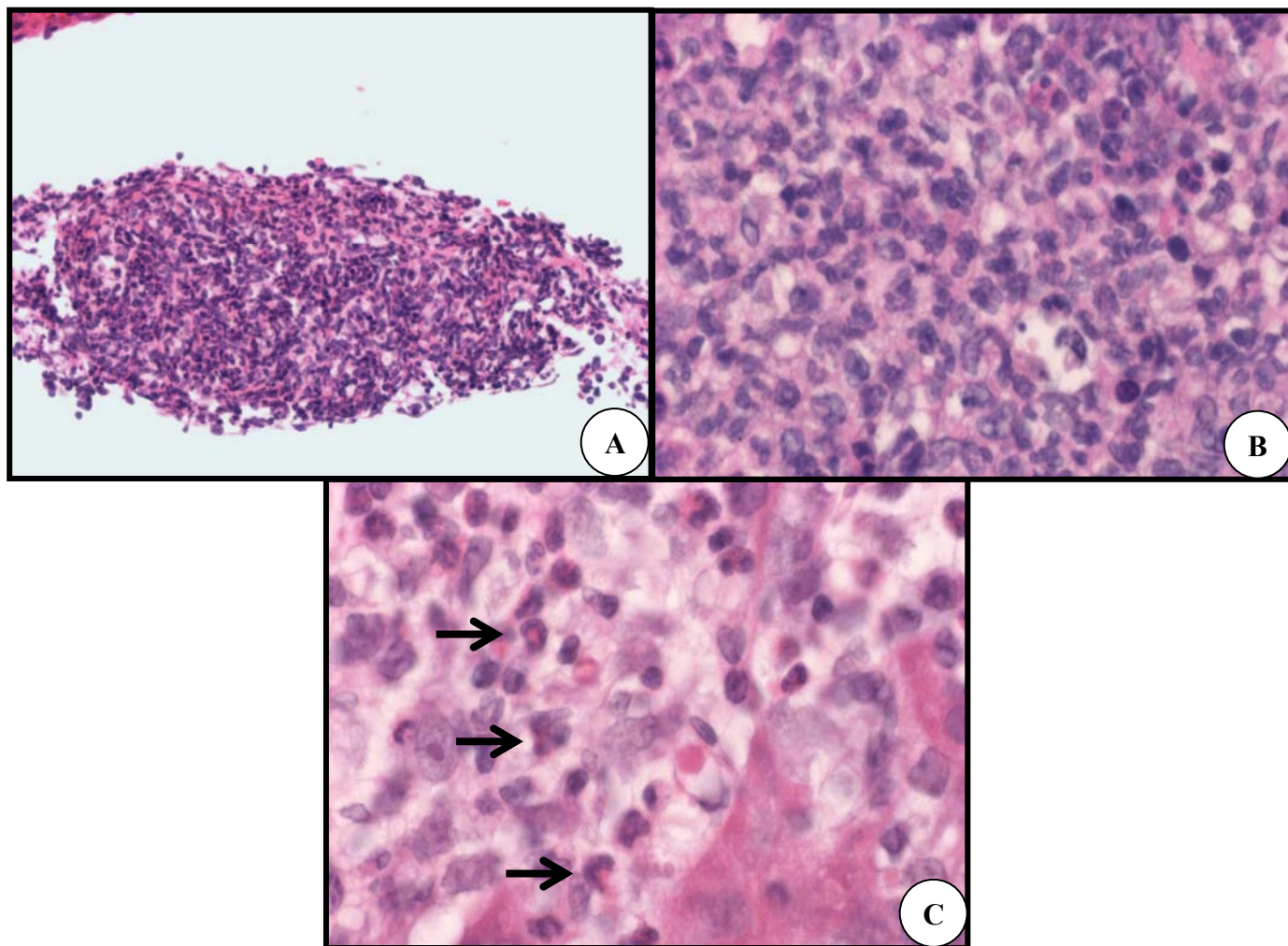


Figura 28: Infiltrados inflamatórios induzidos por *P. brasiliensis* (cepa Pb18) em baço e fígado de camundongos A/J e B10.A. Coloração HE.

A. Infiltrado neutrofílico em baço de camundongo A/J. 24 horas pi. 100x.

B. Infiltrado predominantemente mononuclear em fígado de camundongo B10.A. 3 dias pi. 600x.

C. Infiltrado contendo células mononucleares e vários neutrófilos (→) em fígado de camundongo A/J. 3 dias pi. 600x.

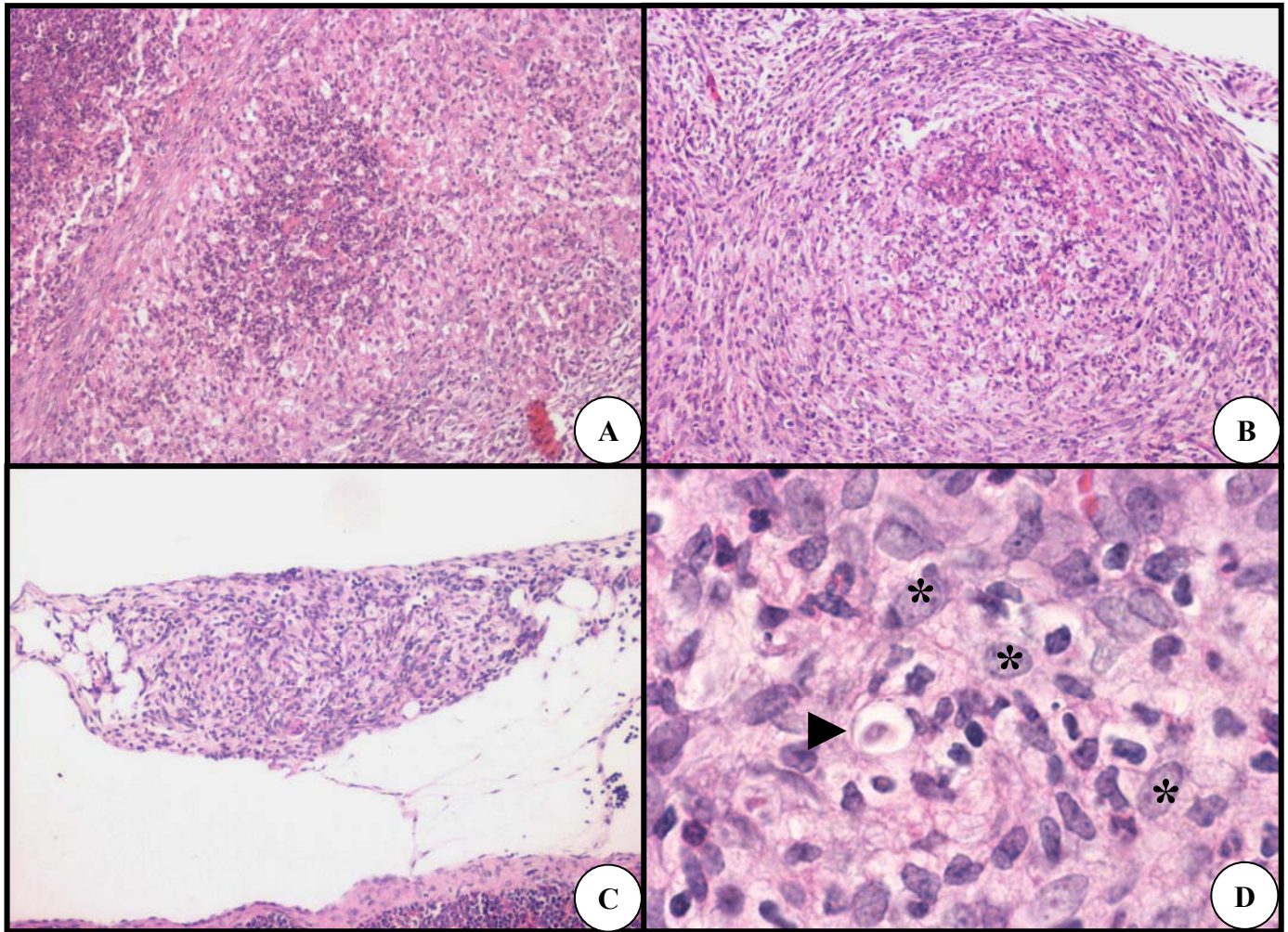


Figura 29: Granulomas induzidos por *P. brasiliensis* (cepa Pb18) em camundongos A/J e B10.A. Coloração HE.

- A. Granuloma frouxo em fígado de camundongo B10. 7 dias pi. Aumento original: 100x.
- B. Granuloma compacto em baço de camundongo A/J. 7 dias pi. Aumento original: 100x.
- C. Granuloma epitelióide em fígado de camundongo A/J. 14dias pi. Aumento original: 100x.
- D. Granuloma epitelióide compacto em fígado de camundongo A/J, mostrando células epitelióides (*) e poucas leveduras de *P. brasiliensis* (►). 14 dias pi. Aumento original: 600x

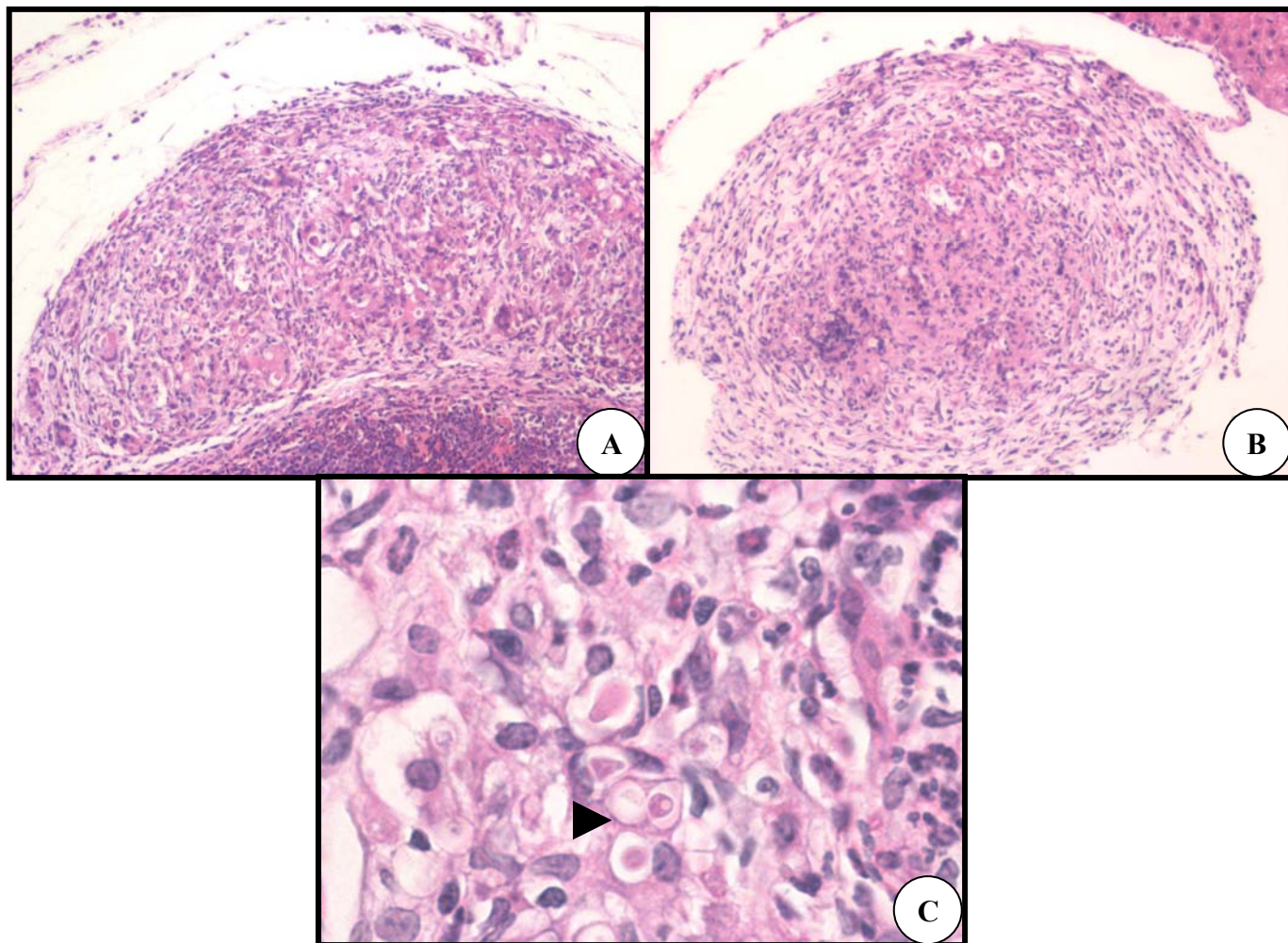


Figura 30: Granulomas induzidos por *P. brasiliensis* (cepa Pb18) em camundongos B10.A. Coloração HE.

A. Granuloma frouxo em baço. 14 dias pi. Aumento original: 100x.

B. Granuloma frouxo em fígado. 14 dias pi. Aumento original: 100x.

C. Granuloma frouxo em baço, mostrando poucas células epitelióides e várias leveduras de *P. brasiliensis* em brotamento (►). 14 dias pi. Aumento original: 600x.

4.4.2. Quantificação das Populações Linfocitárias no Baço

Para a avaliação de alterações nas subpopulações de linfócitos T periféricos foi feita a análise por citometria de fluxo no baço. Os camundongos da linhagem A/J infectados com *P. brasiliensis* tiveram, aos 5 dias de infecção, um aumento na porcentagem de linfócitos T duplo positivos ($CD4^+CD8^+$), como pode ser observado na Figura 31. As populações $CD4^+$ e $CD8^+$ não sofreram alterações estatisticamente significantes ao longo da infecção.

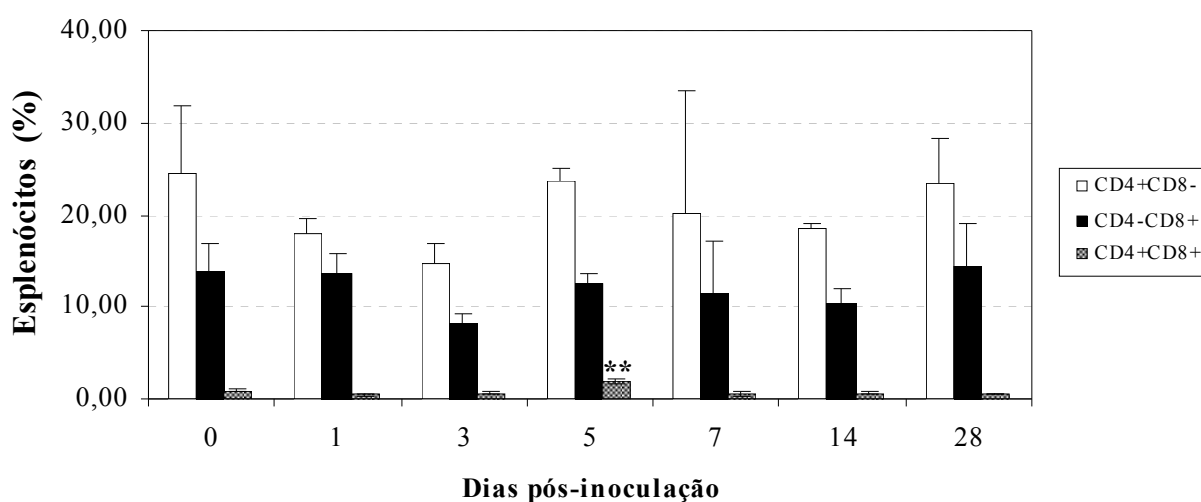


Figura 31: Avaliação das subpopulações linfocitárias no baço de camundongos A/J infectados com *P. brasiliensis* por citometria de fluxo. Os valores expressam a porcentagem média encontrada em 4 animais $\pm$ o desvio padrão e são representativos de dois experimentos independentes. ** $p < 0,01$: Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados (dia 0).

A linhagem B10.A, assim como a A/J, apresentou aumento na porcentagem de linfócitos duplo-positivos ($CD4^+CD8^+$) esplênicos no 5º dia pi. Além disso, estes camundongos apresentaram redução acentuada na porcentagem de linfócitos $CD4^+$ aos 3 e 7 dias pi e na porcentagem de linfócitos $CD8^+$ aos 3, 5 e 7 dias de infecção (Figura 32).

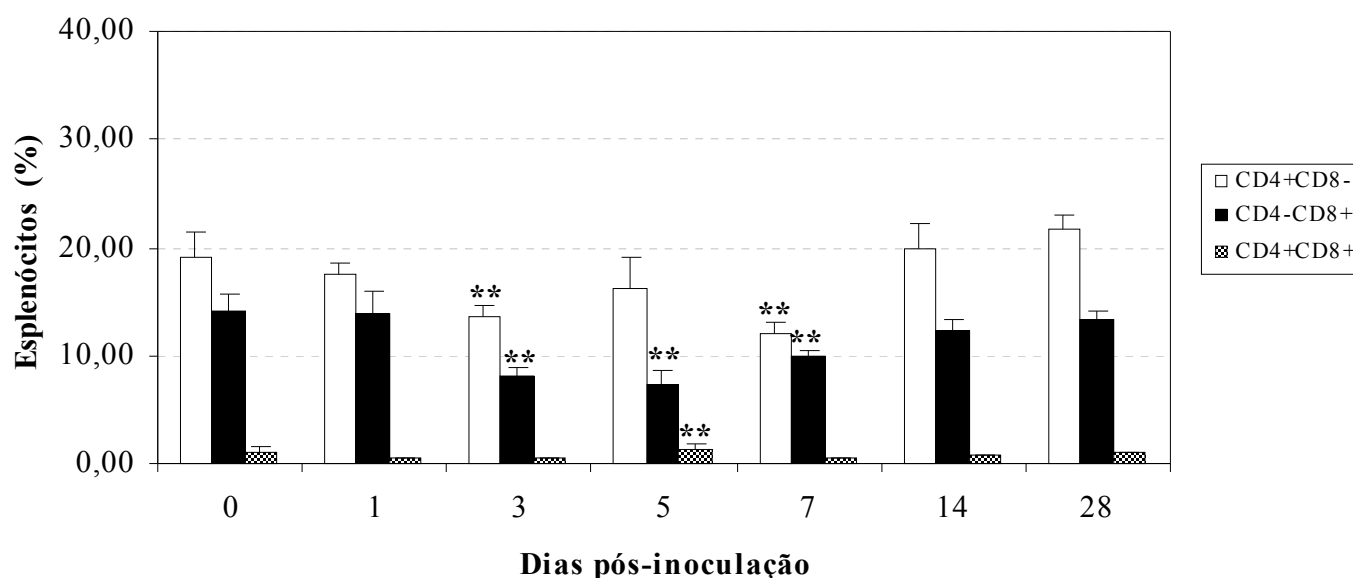


Figura 32: Avaliação das subpopulações linfocitárias no baço de camundongos B10.A infectados com *P. brasiliensis* por citometria de fluxo. Os valores expressam a porcentagem média encontrada em 4 animais $\pm$ o desvio padrão e são representativos de 2 experimentos independentes. ** $p < 0,01$: Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados (dia 0).

4.4.3. Resposta Proliferativa frente à ConA

4.4.3.1. Resposta Proliferativa de Timócitos

A infecção pelo *P. brasiliensis* promoveu um aumento na resposta proliferativa de timócitos de camundongos A/J, especialmente aos 7 e 14 dias de inoculação. Na linhagem B10.A, por outro lado, verificou-se diminuição desta resposta a partir de 5 dias de infecção, como pode ser conferido na Figura 33.

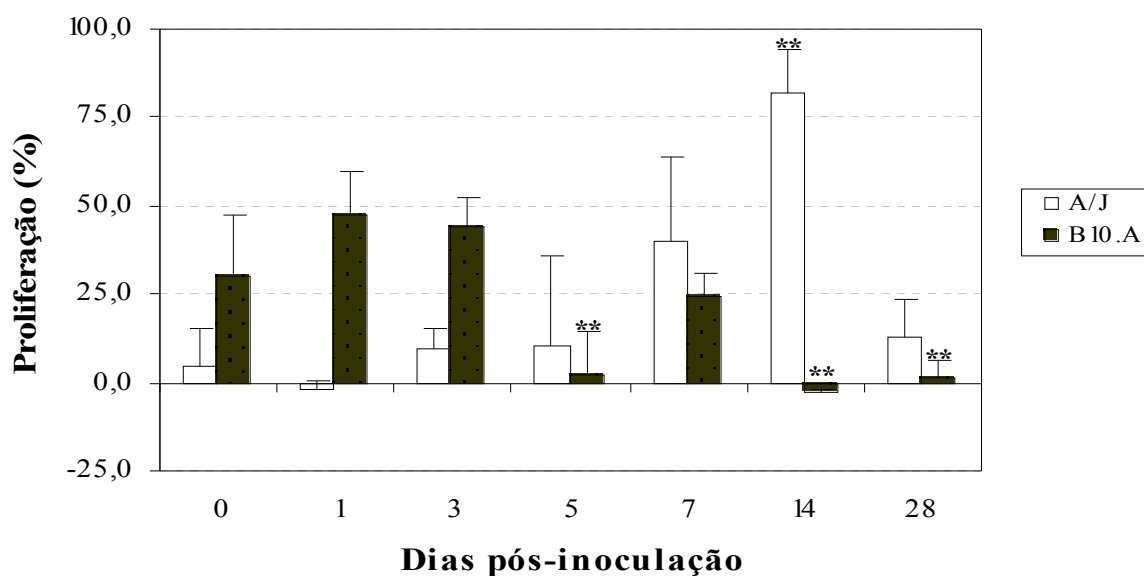


Figura 33: Avaliação da resposta proliferativa frente à ConA de timócitos de camundongos A/J e B10.A infectados com *P. brasiliensis*. Os valores expressam a porcentagem média de proliferação em linfócitos de 4 animais $\pm$ o desvio padrão e são representativos de 2 experimentos independentes. ** $p < 0,01$: Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados (dia 0).

4.4.3.2. Resposta Proliferativa de Esplenócitos

Em ambas as linhagem estudadas houve redução na taxa de proliferação em resposta à ConA. Nos camundongos A/J esta redução foi verificada do 1º ao 7º dia pi enquanto nos B10.A ocorreu entre o 5º e o 14º dia de inoculação, como demonstrado na Figura 34.

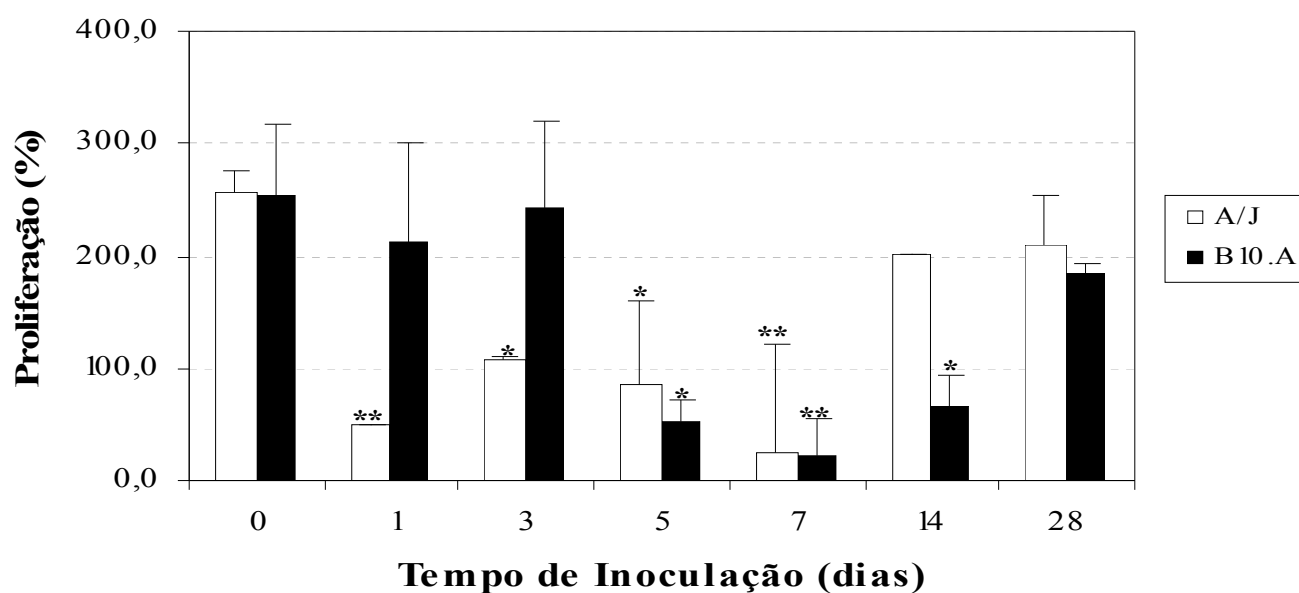


Figura 34: Avaliação da resposta proliferativa de esplenócitos de camundongos A/J e B10.A infectados com *P. brasiliensis* frente à ConA. Os valores representam a porcentagem média de proliferação em linfócitos de 4 animais $\pm$ o desvio padrão. * $p<0,05$, ** $p<0,01$: Teste de comparações múltiplas de Dunnett, animais infectados comparados com não infectados (dia 0).

Discussão

A paracoccidioidomicose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde a infecção assintomática até formas graves com intensa disseminação do fungo pelo organismo e acometimento de vários órgãos. Embora a resposta imunológica do hospedeiro seja um fator deveras importante para o controle do curso da doença, variações na patogenicidade de diferentes isolados de *P. brasiliensis* podem explicar, pelo menos em parte, as diferentes formas clínicas encontradas. Nesse sentido, Singer-Vermes et al. (1994) observaram que cepas de *P. brasiliensis* isoladas de pacientes com formas graves da doença quando inoculadas em camundongos B10.A eram mais patogênicas do que aquelas isoladas de pacientes com formas benignas.

Assim, tendo em vista que, tanto fatores relacionados com o hospedeiro quanto aqueles relacionados com a virulência fúngica, além de fatores ambientais, podem influenciar o curso da infecção pelo *P. brasiliensis*, investigamos, neste estudo, se que características próprias ao fungo e ao hospedeiro poderiam influenciar a ocorrência da atrofia tímica observada durante a fase aguda da infecção paracoccidioidomycótica experimental.

De modo geral, as alterações histológicas aqui relatadas assemelham-se àquelas previamente observadas em camundongos BALB/c infectados com a cepa Pb18 (Brito et al., 2003; Souto et al, 2003). Entretanto, foram notadas alterações morfológicas distintas relacionadas à virulência da cepa infectante e, alterações na fisiologia tímica foram mais pronunciadas em camundongos da linhagem susceptível.

5.1. Virulência do *P. brasiliensis* e Atrofia Tímica em Camundongos Susceptíveis e Resistentes.

Nesse estudo, independente da cepa empregada foi observada uma clara diminuição no índice e na celularidade do timo em ambas as linhagens estudadas, o que pode decorrer de um aumento na taxa de apoptose. Entretanto, camundongos p55 KO nos quais não houve aumento na apoptose também apresentaram redução destes parâmetros, indicando que outros mecanismos devem estar envolvidos no processo de atrofia do timo.

Embora as medidas de peso, índice e celularidade tímica tenham sugerido a ocorrência de uma atrofia mais intensa nos camundongos inoculados com a cepa de baixa virulência Pb265, a análise histopatológica revelou alterações mais significativas nos camundongos infectados com a cepa virulenta Pb18, que colonizou o microambiente tímico de forma mais intensa. Estes achados sugerem que as modificações estruturais não estão diretamente ligadas às alterações quantitativas, mas parecem estar relacionadas com a presença do fungo no microambiente tímico. Essa observação assemelha-se ao relato de Alvarez et al. (1994), que estudando o timo de trutas infectadas com fungos do gênero *Saprolegnia* verificaram alterações morfológicas mais intensas quando o timo era colonizado diretamente por hifas fúngicas.

Em nenhum dos períodos experimentais avaliados houve recuperação de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* no timo. Isto pode estar relacionado a um número reduzido de fungos presente neste órgão, insuficiente para ser detectado na amostra de timo semeada. De fato, a marcação imuno-histoquímica do *P. brasiliensis* neste tecido revelou poucas leveduras. Alternativamente, estas

leveduras podem ter sido rapidamente mortas após sua entrada no microambiente tímico. Neste caso, as figuras leveduriformes observadas por imuno-histoquímica representariam células mortas nas quais a parede celular permanece íntegra devido a sua composição de difícil digestão. Neste sentido, a Figura 6C mostra uma levedura marcada somente na superfície externa.

O fato de leveduras da cepa Pb18 terem penetrado em maior número, e persistirem por um período mais longo no timo, sugere que a capacidade de invasão e permanência neste órgão está ligada à virulência da cepa fúngica empregada. Por outro lado, a maior habilidade da cepa Pb18 em colonizar o microambiente tímico, causando-lhe severos danos, pode, em verdade, constituir um mecanismo de virulência. Uma correlação entre patogenicidade e indução de danos tímicos também foi observada por Lamontagne & Jolicouer (1991), em um modelo de infecção experimental pelo Vírus Murino da Hepatite tipo 3 (MHV3).

Vários fatores têm sido relacionados com a virulência do *P. brasiliensis*. Considerando que a parede celular realiza o primeiro, e também mais extenso contato com o hospedeiro, esta estrutura tem sido incluída entre seus fatores de virulência (San Blas & Vernet, 1977). Dentre os componentes da parede, a α -glucana, presente em grande quantidade na fase leveduriforme, é apontada como um dos responsáveis pela virulência (San Blas, 1982). Entretanto, Zacharias et al. (1986) verificaram que as cepas Pb18 e Pb265 possuem níveis semelhantes de α -glucana, embora apresentem diferentes graus de virulência, o que pressupõe a existência de outros fatores de virulência.

O acometimento diferencial do timo pelas cepas empregadas em nosso estudo pode também estar ligado a diferenças no seu tropismo anatômico. Singer-Vermes et al. (1989), comparando diferentes cepas de *P. brasiliensis*, perceberam

que a cepa Pb18 possuía tropismo para o fígado, a cepa Pb2052, por outro lado, acometia principalmente os pulmões. Nesse mesmo estudo, foi observado que cerca de 50% dos animais infectados com Pb18, mas nenhum dos infectados com Pb265, apresentavam lesões esplênicas, o que pode indicar um tropismo preferencial da cepa Pb18 por tecidos linfóides.

A invasão do timo pelo *P. brasiliensis* suscita ainda questões acerca da via de disseminação e da forma de penetração no microambiente tímico. A via hematogênica tem sido amplamente aceita como meio de disseminação do *P. brasiliensis*, entretanto, a existência de uma barreira hemato-tímica que protege o órgão contra a entrada de antígenos estranhos (Raviola & Karnovsky, 1972) constitui um obstáculo a ser transposto pelo fungo.

Antígenos inoculados por via intravenosa podem ser encontrados em pequena quantidade na medula tímica, ainda que não o sejam na região cortical, sugerindo uma permissividade maior do tecido medular. Antígenos inoculados por via ip, por outro lado, podem ser encontrados intratimicamente, até mesmo na região cortical (Hill, 1976).

Mueller et al. em 1987, relataram que a inoculação ip de toxóide tetânico induzia resposta proliferativa de timócitos corticais em áreas próximas aos linfonodos paratímicos, que drenam a cavidade peritoneal (Kamperdijk et al., 1984), sugerindo a participação destes na entrada dos antígenos no córtex. A migração de antígenos da cavidade peritoneal para os linfonodos paratímicos foi demonstrada em outros estudos, entre eles o de Lopes-Cardozo et al. (2001), que verificaram que células de carcinoma de cólon inoculadas pela via ip são encontradas nos linfonodos paratímicos.

Seguindo esta idéia, Nieuwenhuis et al. (1988), descreveram uma rota transcapsular para a entrada de antígenos inoculados intraperitonealmente e propuseram que esta via conduziria também antígenos próprios para o córtex tímico.

A rota transcapsular poderia ser a via de penetração utilizada pelo *P. brasiliensis* em nosso modelo, uma vez que ele foi inoculado por via ip e localizado nos linfonodos paratímicos. Entretanto, a identificação do fungo somente na medula tímica fala a favor de sua entrada por via hematogênica e por isso sua capacidade em quebrar a barreira hemato-tímica está, atualmente, sob investigação em nosso laboratório.

Alguns fungos são capazes de causar atrofia tímica pela liberação de produtos tóxicos ou pró-apoptóticos como a gliotoxina de *Aspergillus* (Sutton et al., 1994) e a toxina T-2 de *Fusarium* (Islam et al., 1998). Este não parece ser o caso do *P. brasiliensis*, uma vez que a inoculação intraperitoneal de antígenos isolados não causou atrofia tímica significativa, embora a presença destes antígenos não tenha sido pesquisada no microambiente tímico (Gameiro et al., 2003). Ademais, em nosso estudo, o aumento na taxa de apoptose e a perda de arquitetura que caracterizaram a atrofia tímica mostraram-se dependentes de TNF e IFN- γ , respectivamente.

Além de alterações na arquitetura tímica, a infecção paracoccidiodomicótica pode ocasionar distúrbios na maturação dos timócitos. Um aumento robusto na taxa de apoptose foi verificado em todos os grupos experimentais. Ademais, a presença de leveduras do *P. brasiliensis* entre os timócitos em maturação poderia induzir a diferenciação de linfócitos T regulatórios (Treg), tolerantes ao fungo.

Os linfócitos Treg foram descritos por Sakaguchi et al., em 1995, como células CD4⁺CD25⁺ que entram em contato com o antígeno no microambiente tímico, mas ao invés de sofrerem deleção tornam-se antígeno-tolerantes. O papel destas células prevenindo o desenvolvimento de respostas imunológicas contra antígenos próprios e controlando a magnitude de respostas contra patógenos está bem documentado. Entretanto, a possibilidade de alguns patógenos induzirem a geração destas células e utilizarem seu potencial supressor como mecanismo de escape do sistema imunológico, especialmente em doenças crônicas, não pode ser descartada (revisto por Mills, 2004).

A indução de células T supressoras capazes de inibir o desenvolvimento de resposta imune antígeno específica foi documentada na paracoccidiodomicose experimental por Jimenez-Finkel & Murphy (1988). Entretanto, cabe considerar que neste estudo os autores utilizaram apenas antígenos solúveis de *P. brasiliensis* e a origem destas células não foi relatada.

Um fato marcante no presente estudo, foi a ocorrência de grande número de neutrófilos na cápsula e medula tímica dos camundongos infectados com o *P. brasiliensis*. Considerando a maciça ocorrência de apoptose no timo, é possível supor que os macrófagos que fagocitaram os corpos apoptóticos poderiam liberar fatores quimiotáticos para neutrófilos, como foi demonstrado por Uchimura et al. (2000). Alternativamente, o TNF pode estar diretamente envolvido na atração de neutrófilos (Cecílio et al, 1997) ou indiretamente, por estimular a produção de interleucina 8 (IL-8) pelo endotélio e a transmigração de neutrófilos (Barbara et al., 1996). A possibilidade de um processo anômalo de hematopoiese, remanescente ou derivado da fase hematopoiética do timo no período embrionário (Bodey et al., 1998) é, s.m.j., muito remota já que o aparecimento destas células no timo ocorreu

de forma muito rápida e sempre com morfologia de células maduras. Além disso, a adesão e transmigração de neutrófilos foram observadas em vasos tímicos por microscopia eletrônica, corroborando para a hipótese de migração destas células para o timo (dados não mostrados).

Assim, as principais diferenças observadas no timo estiveram relacionadas com a virulência da cepa empregada, ao passo que divergências entre as linhagens susceptível e resistente foram pouco freqüentes.

5.2. Alterações Morfofisiológicas no Timo de Camundongos Susceptíveis e Resistentes Infectados com a Cepa Pb18.

Um padrão semelhante foi observado em ambas as linhagens murinas no tocante às alterações morfológicas definidas por análise morfométrica e ultra-estrutural. Quanto as subpopulações de timócitos, foram notadas algumas diferenças que, embora discretas, revelaram nuances da maior sensibilidade da cepa B10.A à infecção paracocidioidomicótica.

Inicialmente, verificamos uma diminuição na área total do timo de camundongos A/J e B10.A, fato este, condizente com a redução de peso também observada em ambas as linhagens na fase aguda da infecção. Ao final do período experimental houve um aumento na razão córtex/medula, especialmente em camundongos A/J. Um possível re-povoamento da camada cortical e re-estabelecimento da função tímica pode explicar este fenômeno. Nos camundongos B10.A este aumento foi menos expressivo. Embora tenha sido observada uma intensa atividade mitótica em sua camada cortical, estes animais ainda

apresentavam aos 14 dias de infecção um número aumentado de células em apoptose, o que poderia estar contrabalançando a proliferação dos timócitos e impedindo a expansão da camada cortical. Estes achados são condizentes com a literatura que já tem documentada a hipertrofia do timo após processos atróficos em situações de estresse e infecções (revisto por Dominguez-Gerpe & Rey-Mendez, 2003).

As alterações ultra-estruturais revelaram, inicialmente, danos no tecido tímico, especialmente relacionados ao aumento na ocorrência de morte celular programada, como vacuolização, degeneração de mitocôndrias, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático e presença de corpos apoptóticos. Estes achados foram similares àqueles anteriormente observados por nosso grupo de pesquisa utilizando o modelo de atrofia tímica com infecção de camundongos BALB/c pela cepa Pb18 (Souto et al., 2002). Após o 3º dia de infecção, o timo mostrou indícios de reorganização que incluíram presença de macrófagos com abundante conteúdo fagocítico e muitas células em mitose. Tal reorganização coincide com a recuperação do peso do timo (Figura 1).

Buscamos, numa segunda etapa, caracterizar as subpopulações de timócitos durante a infecção pelo *P. brasiliensis* através de citometria de fluxo, utilizando os marcadores clássicos CD4 e CD8. A única alteração significativa observada foi o aumento na porcentagem de timócitos CD4⁺ em camundongos B10.A, o qual parece simplesmente refletir um maior acometimento das outras subpopulações de timócitos desta linhagem, especialmente a de timócitos duplo-positivos (Figura 22).

A linhagem susceptível B10.A, também mostrou persistência dos sinais de apoptose até os 14 dias pi, fato não observado na linhagem resistente A/J. Isto indica que, muito provavelmente, embora ambas as linhagens tenham apresentado

um padrão histopatológico semelhante, o timo de camundongos B10.A sofreu alterações fisiológicas mais intensa que o timo de camundongo A/J o que pode estar relacionado com a maior susceptibilidade desta linhagem frente à infecção paracoccidioidomicótica. Esta idéia é reforçada pelo achado de diminuição da resposta proliferativa de timócitos de camundongos B10.A frente à ConA que será discutido a seguir.

5.3. Participação de Citocinas Pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) na Atrofia Tímica.

Embora não tenha sido observada elevação nos níveis plasmáticos de TNF e IFN- γ durante o período experimental, o papel destas citocinas na atrofia tímica foi investigado *in situ* uma vez que o TNF apresenta ação pró-apoptótica sobre timócitos e o IFN- γ interfere com a síntese de matriz extracelular podendo, conseqüentemente, interferir no trânsito celular dentro do timo.

O TNF é constitutivamente expresso no timo (Giroir et al., 1992), sendo produzido por células epiteliais medulares, células mióides, timócitos CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁺CD8⁺ e mastócitos. Receptores para esta citocina também estão presentes em timócitos CD4⁺CD8⁻ e CD4⁺CD8⁺ (TNFRp55) e em timócitos medulares, células epiteliais tímicas e células dendríticas (TNFRp75) (revisado por Yalirin & Belyakov, 2004).

Em nosso estudo, camundongos controle apresentaram células positivas para TNF predominantemente na região medular. Embora não tenha sido realizada uma imunotipagem, por sua localização e morfologia, é provável que se tratem de células epiteliais medulares. Nos camundongos infectados pelo

P. brasiliensis, houve diminuição no número e na intensidade de marcação destas células, o que pode significar a liberação desta citocina para o microambiente tímico. Paralelamente, observou-se a ocorrência de células pequenas marcadas para TNF no córtex. Estes dados indicam que, embora não tenha sido notada elevação na concentração de TNF no soro, ou mesmo em macerado do timo, o padrão de expressão desta citocina foi modificado pela infecção, um dado sugestivo de seu envolvimento na atrofia tímica.

O papel do TNF na atrofia tímica foi então estudado utilizando-se camundongos nocautes para o receptor TNFRp55. Embora estes camundongos TNFRp55^{-/-} tenham apresentado peso e arquitetura tímica normais, foi observada, na ausência de infecção, uma elevada taxa de apoptose em comparação com os controles selvagens (C57Bl/6 wt).

O estudo do timo em camundongos com bloqueio ou deficiência na produção de TNF e seus receptores tem gerado resultados controversos. de Kossodo et al (1992), relataram que a administração de anticorpos monoclonais dirigidos contra esta citocina, durante a gestação ou período neonatal, leva a atrofia do timo, baço e linfonodos. Já Pfeffer et al. (1993), que desenvolveram os camundongos TNFRp55^{-/-}, relatam não terem observado alterações no processo de seleção negativa e no número total, e de subpopulações de timócitos, embora não façam menção aos níveis de apoptose. Baseta & Stutman (2000), por outro lado, observaram um aumento de 60% no número de timócitos em camundongos TNFRp55^{-/-}p75^{-/-} e verificaram que camundongos tanto TNFRp55^{-/-} quanto TNFRp75^{-/-} e, em maior grau, TNFRp55^{-/-}p75^{-/-} são menos susceptíveis a apoptose mediada por TNF *in vitro* do que os selvagens. Nesse estudo, entretanto, também não são relatados dados sobre a ocorrência de apoptose *in situ*. A aparente

discrepância com os resultados encontrados em nosso trabalho pode, no entanto, ser devida à ação de outros mediadores presentes *in situ* no complexo microambiente tímico.

Quando infectados por *P. brasiliensis*, ao invés de aumento na taxa de apoptose similar ao notado nos camundongos selvagens, os animais TNFRp55^{-/-} apresentaram redução na apoptose, acompanhada por perda da arquitetura tímica e redução progressiva de peso até os 7 dias pi. Isto indica que a apoptose no timo mediada por TNF, mais especificamente através do receptor TNFRp55.

Os camundongos TNFRp55^{-/-} apresentam níveis maiores de apoptose fisiológica e não recuperam o peso do timo até o 7º dia pi com o *P. brasiliensis*. Estes eventos suscitam a idéia de que *in vivo* o TNF possa participar da maturação de timócitos, promovendo sobrevivência e proliferação, também por meio do receptor TNFRp55 e não somente o receptor TNFRp75 como tem sido sugerido por estudos *in vitro* (Tartaglia et al., 1991; Baseta & Stutman, 2000). A atividade proliferativa do TNF via receptor TNFRp55 já foi documentada em linhagem de mieloma humano (Borset et al., 1996) e miócitos (Amrani et al., 1996). As respostas desencadeadas pelo receptor TNFRp55 poderiam ainda estar relacionadas com a concentração desta citocina. Neste sentido, Hernandez-Caselles & Stutman (1993) afirmam que o TNF é um dos reguladores chave da proliferação de timócitos aumentando respostas subótimas e diminuindo respostas excessivas mediadas por outras citocinas como IL-1 e IL-6. Entretanto, não se pode deixar de imaginar que, alternativamente, a participação do TNF via TNFRp55 poderia ser indireta estimulando ou inibindo citocinas que atuam no complexo microambiente tímico.

A atuação do TNF como indutor de apoptose de timócitos, por outro lado, é bem conhecida (Hernandez-Caselles & Stutman, 1993) e foi documentada em

outros modelos experimentais. Norimatsu et al. (1995) relataram a participação do TNF na apoptose de timócitos induzida por LPS. Esses autores verificaram aumento na concentração plasmática desta citocina e demonstraram que a administração de anticorpos monoclonais anti-TNF impedia o aumento da apoptose. Em camundongos inoculados com fator corda micobacteriano, por outro lado, Ozeki et al. (1997), observaram que, embora não ocorresse aumento nos níveis séricos desta citocina, a atrofia, representada por aumento na taxa de apoptose e perda da camada cortical, era abolida pela administração de anticorpos anti-TNF. Isogai et al. (1996), confirmaram também a participação do TNF na apoptose induzida por LPS de *Porphyromonas gingivalis* pela elevação dos níveis plasmáticos de TNF e aumento na taxa de apoptose, o que também ocorreu quando da administração de TNF recombinante isoladamente.

Interessantemente, anatomia anormal e depleção de timócitos também são observados no timo de indivíduos com síndrome de Down, onde nota-se um grande número de mastócitos produzindo TNF (Murphy et al, 1992).

Embora o TNF atue em diversas situações de atrofia tímica, outros mediadores devem estar envolvidos neste fenômeno. Roggero et al. (2004), por exemplo, estudando a atrofia tímica na infecção chagásica, descartaram a participação desta citocina após verificarem que este fenômeno era mantido mesmo após administração de anticorpos monoclonais anti-TNF.

No presente estudo é comprovado o envolvimento do receptor TNFRp55 na apoptose, entretanto, a redução no peso e a perda da delimitação corticomedular não foram dependentes desta via e ocorreram tanto em camundongos selvagens quanto nocautes para este receptor. A falta de uma correlação direta entre as alterações da arquitetura tímica e os níveis de apoptose também foi notada em

camundongos A/J e B10.A, isto porque embora os animais infectados com a cepa Pb265 tenham revelado uma taxa maior de apoptose, as maiores mudanças arquitetônicas foram vistas em camundongos infectados com a cepa Pb18. Em conjunto, esses resultados os sugerem que a atrofia tímica observada na paracoccidiodomicose envolva dois fenômenos distintos: (i) o aumento na taxa de apoptose mediado por TNF através do receptor TNFRp55, e (ii) uma desorganização na arquitetura tímica com conseqüente perda de peso, independente desta via.

Este fenômeno de desorganização da anatomia tímica é, aparentemente, mediado por IFN- γ já que não foi compartilhado pelos camundongos deficientes nesta citocina. O IFN- γ é encontrado fisiologicamente no timo, sendo derivado de timócitos em maturação, especialmente aqueles de fenótipo CD4⁺CD8⁻, e encontra receptores específicos em células do epitélio tímico e timócitos maduros (Yalirin & Belyakov, 2004). A síntese do IFN- γ é aumentada por infecções virais e super-antígenos (Yalirin & Belyakov, 2004) e também durante a infecção experimental com *T. cruzi* (Leite-de-Moraes et al., 1994).

Neste estudo notou-se que as células positivas para IFN- γ estavam dispersas por todo o timo mas, especialmente localizadas região cortical e na junção corticomedular. Após a infecção com o *P. brasiliensis* estas células diminuíram em número e mostraram-se mais abundantes na região medular, sugerindo alterações no padrão de expressão desta citocina.

O IFN- γ é um clássico estimulador da expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe I e classe II (Wong et al., 1984), inclusive no timo (Defresne et al., 1990). Além disso, esta citocina pode interferir na síntese de componentes da matriz extracelular.

Lannes-Vieira et al. (1991) demonstraram que o IFN- γ tem um efeito bifásico sobre a expressão de proteínas de matriz extracelular, aumentando sua síntese quando em baixas concentrações e diminuindo quando em altos níveis. Além disso, esta citocina aumenta a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM) nas células epiteliais tímicas (Singer et al., 1990). Dando continuidade a estes estudos, Lagrota-Candido et al. (1996), verificaram que, *in vitro*, baixas concentrações de IFN- γ induziam aumento na síntese de lamina, fibronectina, colágeno IV e seus receptores em linhagem de células epiteliais tímicas e culturas primárias de TNCs. O tratamento das células epiteliais com baixas doses de IFN- γ também aumentou a adesão de timócitos a estas células, efeito este inibido pela adição de anticorpos anti-IFN- γ ou anti-laminina e fibronectina. No complexo timócitos-células “nurse” do timo (TNCs), o aumento na expressão de proteínas da matriz extracelular e seus receptores promoveu a liberação espontânea de timócitos (Villa-Verde et al. (1995) e Lagrota-Candido et al. (1996)). Durante a infecção chagásica experimental Savino et al. (1989) verificaram aumento na síntese de matriz extracelular e este aumento coincidiu com a depleção de timócitos (Savino et al., 1991).

Cotta-de-Almeida et al. (1997), verificaram que TNC isoladas de camundongos inoculados com *T. cruzi* ou infectadas *in vitro* com o parasita apresentaram elevação na expressão de colágeno tipo IV, laminina e fibronectina, além de aumento na liberação de timócitos do complexo TNC, sugerindo uma aceleração em seu trânsito. Aumento na síntese de fibronectina e laminina, bem como de seus receptores em timócitos, foi observado posteriormente observado no timo de camundongos infectados com *T. cruzi* no pico de atrofia deste órgão, em paralelo com um aumento na migração de timócitos, especialmente os duplo-

positivos, os quais foram encontrados em órgãos linfóides (Cotta-de-Almeida et al, 2003).

Em conjunto, esses resultados apontam para o IFN- γ produzido no timo durante a infecção chagásica como um promotor da síntese de matriz extracelular tímica e seus receptores e consequentemente um acelerador da migração de timócitos. Pode-se supor que um fenômeno semelhante ocorra em nosso estudo já que houve perda de peso e desorganização no timo de camundongos selvagens, mas não em IFN- $\gamma^{-/-}$, e linfócitos duplo-positivos foram encontrados no baço de camundongos após a infecção com *P. brasiliensis*. Uma elevação discreta nas quantidades de IFN- γ , imperceptível pelos métodos aqui empregados poderia mediar estes episódios, já que elevados níveis de IFN- γ tem um efeito contrário.

O IFN requerido para as alterações tímicas pode também ser de origem extratímica. As células NK são clássicas produtoras de IFN na fase inicial da resposta imunológica frente a diversos patógenos e sua importância tem sido reconhecida na resposta ao *P. brasiliensis* (Jimenez & Murphy, 1984). A produção de IFN por células NK na fase inicial da infecção pode ocorrer na paracoccidioidomicose assim como acontece na Doença de Chagas (Cardillo, 1996). De fato, Peraçoli et al. (1995), mostraram que as NK de hamsters inoculados por via intra-testicular com *P. brasiliensis* mostram-se ativadas já às 24 horas pi.

Além de causar alterações na arquitetura tímica o IFN- γ também pode estar envolvido também na indução de apoptose mediada por TNF, induzindo proteínas pró-apoptóticas, entre elas PKR (Schroder, 2004).

5.4. Influência da Inoculação de *P. brasiliensis* na Resposta Imunológica Sistêmica

Por tratar-se de uma doença crônica, trabalhos que enfocam a fase precoce da paracoccidiodomicose, mesmo em modelos experimentais, são escassos. Entretanto, é possível que desde o período inicial ocorram alterações na resposta imune sistêmica ou específica que contribuam para o desenvolvimento da doença.

Como não foi possível obter resultados satisfatórios utilizando antígenos específicos do fungo, optamos pela estimulação com a ConA que, apesar de ser um estímulo inespecífico, traduz de forma confiável o “status” funcional das células envolvidas na resposta imune. Assim, foi avaliada a resposta proliferativa de timócitos e esplenócitos de camundongos susceptíveis e resistentes na fase aguda da doença.

Calich et al. (1985), classificaram camundongos das linhagens A/J e B10.A, respectivamente, como pólos de resistência e susceptibilidade à paracoccidiodomicose experimental, por apresentarem padrões diversos de resposta imunológica frente à doença. Assim, a expectativa inicial era de encontrarmos um quadro diferencial de atrofia tímica capaz de justificar, ainda que parcialmente, as respostas distintas encontradas na periferia.

Embora o quadro histopatológico tímico tenha se mostrado semelhante nas duas linhagens, algumas diferenças já descritas na resposta imune e outras ainda não relatadas entre as linhagens A/J e B10.A foram encontradas. Timócitos de camundongos da linhagem A/J apresentaram aumento da resposta proliferativa ao longo da infecção. Camundongos da linhagem B10.A, por outro lado, apresentaram depressão prolongada na resposta proliferativa de timócitos frente a

ConA. Isto sugere que alterações funcionais distintas possam ocorrer no timo desta linhagem levando ao surgimento de linfócitos T hiporresponsivos, os quais estariam relacionados com a maior susceptibilidade desta linhagem à infecção. Diminuição da resposta mitogênica estimulada por ConA em timócitos obtidos de camundongos durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* também foi relatada por Leite-de-Moraes et al. (1994).

A análise da resposta proliferativa de esplenócitos frente à ConA mostrou que camundongos B10.A apresentam resposta diminuída entre 5 e 14 dias de infecção, confirmando que a hiporresponsividade estende-se à resposta imune periférica. Os camundongos A/J, por outro lado, mostraram-se hiporresponsivos por um período menor e mais precoce (entre o 1º e o 7º dia pi). Uma diminuição na resposta de esplenócitos frente à ConA já havia sido reportada por Bocca et al. (1998) e Souto et al. (2000) utilizando também o modelo de infecção experimental por *P. brasiliensis*.

Esta diminuição de resposta a mitógenos pode estar relacionada às propriedades imunomoduladoras do NO uma vez que Bocca et al. (1998) observaram sincronia entre a queda na resposta proliferativa e elevação da produção de NO. O tratamento dos camundongos com inibidores deste mediador abolia por completo este efeito sobre a resposta dos animais. O papel do NO como inibidor da linfoproliferação por foi confirmado por Souto et al. (2000). A diminuição na resposta proliferativa de timócitos frente à ConA, por outro lado, pode ser devido à presença de elevados níveis de IL-10 e IFN- γ como observado por Leite de Moraes et al., (1991) em experimentos envolvendo infecção chagásica experimental.

A resposta humoral contra antígenos não-relacionados também pode estar prejudicada na paracoccidiodomicose experimental. Teixeira et al. (1987), demonstraram fraca produção de anticorpos frente ao antígeno hemácia de carneiro na fase inicial da infecção por *P. brasiliensis*, tanto em animais da linhagem A/J quanto nos da linhagem B10.A. Neste estudo os autores demonstram também que a diminuição deste tipo de resposta foi mais prolongada nos camundongos susceptíveis.

O estudo das populações linfocitárias esplênicas, revelou que, em ambas as linhagens de camundongos, houve aumento na porcentagem de linfócitos CD4⁺CD8⁺ aos 5 dias de infecção, evento este possivelmente relacionado com a liberação de células imaturas do timo. A interferência de fatores extratímicos na liberação de linfócitos pelo timo tem sido descrita já há bastante tempo. Bryant et al. (1975), observaram um aumento no efluxo de timócitos após a injeção intraperitonal de fito-hemaglutinina. Em camundongos infectados com *T. cruzi*, Mendes-da-Cruz et al (2003), verificaram aumento no número de linfócitos duplo-positivos em linfonodos subcutâneos. Esses linfócitos expressavam receptores de antígeno Vβ5 e Vβ12, normalmente deletados no timo dos camundongos BALB/c, o que sugere que estes linfócitos estariam deixando o timo prematuramente, antes que todos os processos de seleção tenham ocorrido. É possível que na fase aguda da paracoccidiodomicose experimental também ocorram alterações tímicas que impliquem numa aceleração no trânsito de timócitos com conseqüente liberação prematura destas células para a periferia.

A linhagem B10.A apresentou uma significativa redução na porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no baço, o que não ocorreu na linhagem resistente A/J. A redução nos níveis de linfócitos tem sido também verificada na

paracoccidiodomicose humana e relacionada com diminuição da resposta imune e susceptibilidade à doença. Neste sentido, Silva et al. (1981) verificaram que o número total de linfócitos T estava diminuído no sangue de pacientes com paracoccidiodomicose, enquanto Mota et al. (1988) observaram diminuição na porcentagem de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico.

Os linfócitos CD8⁺, de acordo com Cano et al. (2000), são de grande valia na resposta imune frente ao *P. brasiliensis* e sua depleção prejudica a resposta tanto de camundongos susceptíveis quanto resistentes. Assim, a diminuição na porcentagem destes linfócitos em camundongos B10.A pode ser um fator adicional contribuindo para a susceptibilidade desta cepa à doença.

O padrão histopatológico das lesões paracoccidiodomicóticas encontradas neste estudo está de acordo com outros trabalhos da literatura que relatam que camundongos resistentes apresentam lesões compactadas e bem delimitadas, com significativa transformação epitelióide e tendência à resolução. Os camundongos susceptíveis, de modo inverso, mostram granulomas frouxos com intensa carga fúngica, sem indicativos de resolução.

Um fato que chama a atenção é a grande quantidade de neutrófilos nas lesões granulomatosas, especialmente em camundongos A/J, o que também foi encontrado por Zacharias et al. (1986). É possível que estes neutrófilos ajudem a restringir a multiplicação do *P. brasiliensis*, uma vez que apresentam atividade fungistática e fungicida contra leveduras do fungo, especialmente quando estimulados com IFN- γ (Kurita et al., 1999).

A redução nas populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos camundongos B10.A pode comprometer a formação de granulomas eficientes na contenção e eliminação do *P. brasiliensis*. A diminuição prolongada na resposta proliferativa de

esplenócitos frente à ConA pode ser indicativo de que, além de reduzidas, estas células encontram-se funcionalmente debilitadas o que também pode contribuir para a manutenção da infecção. O fato de timócitos de camundongos B10.A também mostrarem diminuição da resposta proliferativa sugere que o comprometimento funcional dos linfócitos T pode, pelo menos em parte, originar-se no timo.

5.5. Considerações Finais e Perspectivas

O sistema imune e os patógenos co-evoluíram por milhares de anos, desenvolvendo assim interações complexas. Enquanto os vertebrados têm aprimorado seus mecanismos de imunidade, os microrganismos têm desenvolvido numerosos meios para evadir-se ou manipulá-los em seu favor (Marrack & Kappler, 1994).

A atrofia tímica observada em quadros infecciosos agudos virais, bacterianos, parasitários e fúngicos tem seu significado ainda incompreendido. A sistemática depleção de timócitos frequentemente observada neste processo pode evitar que clones irrelevantes, ou até mesmo auto-reativos, sejam ativados em resposta ao patógeno, o que protegeria o hospedeiro de danos. Entretanto, esse processo também pode ter consequências negativas para o hospedeiro, uma vez que existe uma contínua necessidade de reposição dos linfócitos T maduros que sofrem renovação naturalmente (Roggero et al., 2002).

A aceleração na liberação dos timócitos também observada durante a atrofia pode ser uma forma do timo prover os órgãos linfóides primários com uma gama

maior de linfócitos, o que favoreceria a resposta imune. Contudo, o fato de agentes infecciosos invadirem o timo pode constituir um mecanismo de manipulação do sistema imune, pelo qual linfócitos tolerantes seriam produzidos e alcançariam à periferia, onde diminuiriam a magnitude das respostas imunes, favorecendo a persistência do parasita e proporcionando a ocorrência de infecções crônicas.

Nosso grupo de pesquisas busca entender os mecanismos desencadeadores e efetores da atrofia tímica na fase aguda da infecção experimental pelo *P. brasiliensis*, bem como, suas conseqüências na evolução da infecção. Neste trabalho verificamos que a virulência fúngica é importante para o desencadeamento da atrofia, possivelmente por facilitar a invasão e persistência do fungo no timo. Para um melhor entendimento dos mecanismos de invasão do timo, é pretensão de nosso grupo de pesquisas avaliar a integridade da barreira hemato-tímica após a infecção, possível porta de entrada do *P. brasiliensis*.

Embora as alterações morfológicas tenham sido semelhantes nas linhagens susceptível e resistente, alterações fisiológicas mais pronunciadas na linhagem B10.A foram evidentes, sugerindo que danos tímicos podem contribuir para a susceptibilidade à infecção, antes mesmo que uma resposta imune Th1 ou Th2 se estabeleça. Neste sentido, cabe agora um estudo da resposta de timócitos e esplenócitos frente a antígenos do *P. brasiliensis* na fase precoce da infecção.

Outra questão importante sugerida pelos resultados aqui descritos é uma possível aceleração na migração e liberação de timócitos. Estas premissas estão sob investigação em nosso laboratório através da análise da expressão de componentes da matriz extracelular e seus receptores, bem como quimiocinas e seus receptores. Além disso, pretendemos investigar a capacidade migratória dos timócitos frente a diferentes estímulos e cinética de produção e liberação de linfócitos T pelo timo

após a infecção, pela identificação dos linfócitos recém maturados no timo e na periferia, caracterizados pela presença de TREC (T cell receptor excision circles).

Conclusões

Como base nos resultados obtidos neste trabalho e sua confrontação com a literatura existente é possível afirmar que:

- A virulência fúngica é um fator importante na colonização do microambiente tímico pelo *P. brasiliensis* e no desencadeamento da atrofia tímica observada na paracoccidiodomicose experimental.

- A susceptibilidade da linhagem murina à paracoccidiodomicose não parece interferir na ocorrência de atrofia tímica e no padrão histológico desta. Entretanto, durante a fase atrófica ocorrem alterações na fisiologia tímica mais intensas em animais susceptíveis.

- Alterações na distribuição das subpopulações de linfócitos T e na resposta proliferativa também são observadas nas populações esplênicas, especialmente em camundongos susceptíveis.

- A atrofia tímica caracteriza-se por dois eventos distintos: aumento na taxa de apoptose mediado por TNF via receptor p55 e a desestruturação arquitetônica do microambiente tímico, possivelmente relacionada com alterações no padrão migratório dos timócitos, mediada por IFN- γ .

Assim, a atrofia tímica, que tem lugar na fase precoce da infecção, resulta da interação de fatores inerentes ao patógeno e ao hospedeiro e pode influenciar a resposta imune sistêmica e possivelmente a evolução da doença.

Referências

ADAMS, L.B.; HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R. et al. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **J. Immunol.**, v. 144, p. 2725-2729. 1990.

ALVAREZ, F.; VELLENA, A.; ZAPATA, A. et al. Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 47, p. 163-172. 1995.

AMRANI, Y.; PANETTIERI JR R.A., FROSSARD, N. et al. Activation of the TNF alpha-p55 receptor induces myocyte proliferation and modulates agonist-evoked calcium transients in cultured human tracheal smooth muscle cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 15, p. 55-63. 1996.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305-1308. 1998.

BAARLEN, J.; SCHUURMAN, H.J.; HUBER, J. Acute thymus involution in infancy and childhood: a reliable marker for duration of acute illness. **Hum. Pathol.**, v. 19, n. 10, p. 1155-1160. 1988.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-512. 1998.

BARBARA, J.A.; van OSTADE, X.; LOPEZ, A. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 74, n. 5, p. 434-443. 1996.

BARKE, R.A.; ROY, S.; CHAPIN, R.B. et al. The role of programmed cell death (apoptosis) in thymic involution following sepsis. **Arch. Surg.**, v. 129, p. 1256-1261. 1994.

BASETA, J.G.; STUTMAN, O. TNF Regulates thymocyte production by apoptosis and proliferation of the triple negative (CD3-CD4-CD8-) subset. **J. Immunol.**, v. 165, p. 5621-5630. 2000.

BASHAM, T.Y.; MERIGAN, T.C. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. **J. Immunol.**, v. 130, p. 1492-1494. 1983.

BERRIH, S.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; COHEN, S. et al. Interferon-gamma modulates HLA class II antigen expression on cultured human thymic epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 135, p. 1165-1171. 1985.

BEUTLER, B.A.; MILSARK, I.W.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. **J. Immunol.**, v. 135, p. 3972-3977. 1985.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin - Tumour necrosis factor: A cytokine that mediates injury initiated by invasive parasites. **Parasitol. Today**, v. 3, n. 11, p. 345-346. 1987.

BEUTLER, B.; GRAU, G.E. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. **Crit. Care Med.**, v. 21, Suppl. 10, p. S423-435. 1993.

BOCCA, A.L.; HAYASHI, E.E.; PINHEIRO, A.G. et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3056-3063. 1998.

BODEY, B.; BODEY JR, B.; SIEGEL, S.E. et al. Intrathymic non-lymphatic hematopoiesis during mammalian ontogenesis. **In Vivo**, v. 12, n. 6, p. 599-618. 1998.

BORSET, M.; MEDVEDEV, A.E.; SUNDAN, A. et al. The role of the two TNF receptors in proliferation, NF-kappa B activation and discrimination between TNF and LT alpha signalling in the human myeloma cell line OH-2. **Cytokine**, v. 8, n. 6, p. 430-438. 1996.

BOYD, R.L.; HUGO, P. Towards an integrated view of thymopoiesis. **Immunol Today**, v. 12, n. 2, p. 71-79, 1991.

BRITO, V.N.; SOUTO, P.C.S.; CRUZ-HOFLING, M.A. et al. Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. **Med. Mycol.**, v. 41, n.2, p. 83-87. 2003.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 89-117. 1993.

BRYANT, B.J.; HESS, M.W.; COTTIER, H. Thymus lymphocytes. Efflux and restoration phases after peripheral exposure of mice to phytohaemagglutinin. **Immunology**, v. 29, n. 1, p. 115-20. 1975.

CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, M.; SIQUEIRA, A. M. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Path.**, v. 66, p. 585-594. 1985.

CALICH, V.L.G.; RUSSO, M.; VAZ, C.A.C. et al. Resistance mechanisms to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Ciência e Cultura**, v. 46, n. 5/6, p. 455-461. 1994.

CALICH, V.L.G.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 5, p. 615-623. 1998.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; COSTA, T.A. et al. Depletion of CD8⁺ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 352-359. 2000.

CECÍLIO, C.A.; COSTA, E.H.; UCELLI, P. et al. The neutrophil migration induced by tumor necrosis factor alpha in mice is unaffected by glucocorticoids. **Mediat. Inflamm.**, v. 6, p. 46-52. 1997.

COTTA-DE-ALMEIDA, V.; BERTHO, A.L.; VILLA-VERDE, D.M. et al. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 82, n. 2, p. 125-132. 1997.

COTTA-DE-ALMEIDA, V.; BONOMO, A.; MENDES-DA-CRUZ, D.A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 9, p. 2439-2448. 2003.

DE KOSSODO, S.; GRAU, G.E.; DANEVA, T. et al. Tumor necrosis factor alpha is involved in mouse growth and lymphoid tissue development **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1259-1264. 1992.

DEFRESNE, M.P.; HUMBLET, C.; RONGY, A.M. et al. Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on lymphoepithelial interactions within thymic nurse cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, n. 2, p. 429-32. 1990.

DOMINGUEZ-GERPE, L.; REY-MENDEZ, M. Evolution of the thymus size in response to physiological and random events throughout life. **Microsc. Res. Tech.**, v. 62, n. 6, p. 464-476. 2003.

DOUEK, D.C.; McFARLAND, R.D.; KEISER, P.H. et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 690-695. 1998.

FEHSEL, K.; KRONCKE, K.D.; MEYER, K.L. et al. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. **J. Immunol.** v. 155, p. 2858-2865. 1995.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18. 1986.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p. 129-132. 1987.

FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCADI-BACCHI, M. et al. Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clin. Trop. Med. Comm. Dis.**, v. 4, n. 1, p. 185-220. 1989.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S. et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, n. 3, p. 185-191. 2000.

GAJEWSKI T.F.; FITCH, F.W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN- gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol.**, v. 140, p. 4245-4252. 1988.

GAMEIRO, J.; BRITO, V.N.; SOUTO, P.C.S. et al. Effects of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens on thymus of BALB/c mice. **In:** XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Microbiologia, Florianópolis. 2003.

GAUDECKER, B. Functional histology of the human thymus. **Anat. Embryol. (Berl)**, v. 183, n. 1, p. 1-15. 1991.

GIROIR, B.P.; BROWN, T.; BEUTLER, B. Constitutive synthesis of tumor necrosis factor in the thymus. **PNAS**, v. 89, p. 4864-4868. 1992.

GREGORY, S.; KERN, M. Adenosine and adenine nucleotides are mitogenic for mouse thymocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 83, p. 1111-1116. 1978.

HERNANDEZ-CASELLES, T.; STUTMAN, O. 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.**, v. 151, p. 3999-4012. 1993.

HILL, S.W. Distribution of plaque-forming cells in the mouse for a protein antigen. Evidence for highly active parathymic lymph nodes following intraperitoneal injection of hen lysozyme. **Immunology**, v. 30, n. 6, p. 895-906. 1976.

ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; KIMURA, K. et al. *In vivo* induction of apoptosis and immune response in mice by administration of lypopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. **Inf. Immun.**, v. 64, n. 4, p. 1461-1466. 1996.

JAMIESON, B.D.; DOUEK, D.C.; KILLIAN, S. et al. Generation of functional thymocytes in the human adult. **Immunity**, v. 10, n. 5, p. 569-575. 1999.

JIMENEZ, B.E.; MURPHY, J.W. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. **Infect. Immun.**, v. 46, n. 2, p. 552-558. 1984.

JIMENEZ-FINKEL, B.E.; MURPHY J.W. Induction of antigen-specific T suppressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 4, p. 734-743. 1988.

KAMPERDIJK, E.W.; van den BERG, M.; HOEFSEMIT, E.C. Lymph node accessory cells in the immune response. The primary response to paratyphoid vaccine in rat parathymic lymph nodes. **Cell Tissue Res.**, v. 237, n. 1, p. 39-42. 1984.

KARHAWI, A.S.; COLOMBO, A.L.; SALOMÃO, R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.**, v. 38, n. 3, p. 225-229. 2000.

KASAHARA, T.; DJEU, J.Y.; DOUGHERTY, S.F. et al. Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokines: interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor. **J. Immunol.**, v. 131, p. 2379-2385. 1983.

KATO, Y.; MORIKAWA, A.; SUGIYAMA, T. et al. Augmentation of lipopolysaccharide-induced thymocyte apoptosis by interferon-gamma. **Cell. Immunol.**, v. 177, n. 2, p. 103-108. 1997.

KENDALL, M.D. Functional anatomy of the thymic microenvironment. **J. Anat.**, v. 177, p. 1-29. 1991.

KINDLER, V; SAPPINO, A.P.; GRAU, G.E. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 731-740. 1989.

KING, C.C.; JAMIESON, B.D.; REDDY, K. et al. Viral infection of the thymus. **J. Virol.**, v. 66, p. 3155-3160. 1992.

KOJ, A. Terminal of acute-phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs. **Gen. Pharmacol.**, v. 31, n. 1, p. 9-18. 1998.

KURITA, N.; BISWAS, S.K.; OARADA, M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 37, n.1, p. 19-24. 1999.

KUSUMI, A.; ABO, T.; MASUDA, T. et al. Lymphotoxin activates hepatic T cells and simultaneously induces profound thymic atrophy. **Immunol.**, v. 77, n. 2, p. 177-184. 1992.

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

LAGROTA-CANDIDO, J.M.; VILLA-VERDE, D.M.; VANDERLEI JR, F.H. et al. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. V. Interferon-gamma modulates thymic epithelial cell/thymocyte interactions via extracellular matrix ligands and receptors. **Cell. Immunol.**, v. 170, n. 2, p. 235-44. 1996.

LAMONTAGNE, L.; JOLICOEUR, P. Mouse hepatitis virus 3-thymic cell interactions correlating with viral pathogenicity. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3152-3159. 1991.

LANNES-VIEIRA, J.; van der MEIDE, P.H. & SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. II. In vitro modulation of

basement membrane proteins by interferon-gamma: relationship with thymic epithelial cell proliferation. **Cell. Immunol.**, v. 137, n.2, p. 329-340. 1991.

LECLERC, M.C.; PHILIPPE, H. & GUEHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, n. 5, p. 331-341. 1994.

LEITE DE MORAES, M.D.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; LEBOULENGER, F. Studies on the thymus in Chagas' disease II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: relationship to stress. **Scand. J. Immunol.**, v. 33, n. 3, p. 267-275. 1991.

LEITE DE MORAES, M.D.; MINOPRIO, P.; DY, M. et al. Endogenous IL-10 and IFN-gamma production controls thymic cell proliferation in mice acutely infected by *Trypanosoma cruzi*. **Scand. J. Immunol.**, v. 39, n. 1, p. 51-58. 1994.

LOPES-CARDOZO, A.M.; GUPTA, A.; KOPPE, M.J. et al. Metastatic pattern of CC531 colon carcinoma cells in the abdominal cavity: an experimental model of peritoneal carcinomatosis in rats. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 27, n. 4, p. 359-363. 2001.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brazil. Contribuição do conhecimento da hyphoblastomycoses americanas. **Braz-Med.**, V. 22, p. 121-124. 1908.

MACKINNON, J. E. Pathogenesis of South American blastomycosis in experimental animals. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 487-494. 1959.

MARINO, M.W.; DUNN, A; GRAIL, D. et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **PNAS**, v. 94, p. 8093-8098. 1997.

MARRACK, P. & KAPPLER, J. Subversion of the immune system by pathogens. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 323-332. 1994.

McCUNE, J.M. Animal models of HIV-1 disease. **Science**, v. 278, p. 2141-2142. 1997.

MEDINA, H.; BODZIAK JR, C. Contribuição ao ciclo extraparasitário do *Paracoccidioides brasiliensis* II. Cultura do *P. brasiliensis* em terra e influência exercida pelo pH. **Arg. Biol. Tecnol.**, v. 4, p. 3-8. 1949.

MEISSNER, E.G.; DUUS, K.M.; LOOMIS, R. et al. HIV-1 replication and pathogenesis in the human thymus. **Curr. HIV Res.**, v. 1, n. 3, p. 275-285. 2003.

MENDES-DA-CRUZ, D.A.; MEIS, J.; COTTA-DE-ALMEIDA, V. et al. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 10, p. 825-32. 2003.

METCALF, D. The autonomous behaviour of normal thymus grafts. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 41 (suppl.), p. 437-447. 1963.

MILLER, J.F. Immunological function of the thymus. **Lancet**, v. 2, p. 748-749. 1961.

MILLS, K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 11, p. 841-855. 2004.

MONTENEGRO, J. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. **Brazil-med.**, v. 41, p. 808-812. 1927.

MORENO, A.R. & ESPINOSA, G.G. Paracoccidioidomycosis experimental del raton inducida por via aerogena. **Sabouraudia**, v. 14, p. 299-311. 1976.

MORSE, S.S.; VALINSKY, J.E. Mouse thymic virus (MTLV). A mammalian herpesvirus cytolytic for CD4⁺ (L3T4⁺) T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 591-596. 1989.

MOSMAN, T.R. Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. **Immunol. Res.**, v. 10, n. 3-4, p. 183-188. 1991.

MOTA, I. O timo: um órgão cheio de mistérios. **Ciência e Cultura**. v. 41, n. 9, p. 859-867. 1989.

MOTA, N.G.; PERAÇOLI, M.T.; MENDES, R.P. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, n. 2, p. 105-111. 1988.

MUCCI, J.; HIDALGO, A. MOCETTI, E. et al. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. **PNAS**, v. 99, p. 3896-3901. 2002.

MUELLER, C.; TSCHUMPER, A.; TSCHUMPER, J.C. Parathymic lymph node: oriented proliferative response of the murine thymic cortex to intraperitoneal stimulation. **Thymus**, v. 9, n. 1, p. 3-12. 1987.

MURPHY, M.; FRIEND, D.S.; PIKE-NOBILE, L. et al. Tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma expression in human thymus. Localization and overexpression in Down syndrome (trisomy 21). **J. Immunol.**, v. 149, p. 2506-2512. 1992.

MURPHY, M.; PIKE-NOBILE, L.; SOO, V.W. et al. Characterization of TNF receptors on human thymocytes. **Thymus**. v. 23, n. 3-4, p. 177-194. 1994.

NAGY, P.V.; FEHER, T.; MORGA, S. et al. Apoptosis of murine thymocytes induced by extracellular ATP is dose- and cytosolic pH-dependent. **Immunol. Lett.**, v. 72, n. 1, p. 23-30. 2000.

NIEUWENHUIS, P.; STET, R.J.; WAGENAAR, J.P. et al. The transcapsular route: a new way for (self-) antigens to by-pass the blood-thymus barrier? **Immunol. Today**, v. 9, n. 12, p. 372-375. 1988.

NORIMATSU, M.; ONO, T.; AOKI, A. et al. In-vivo induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolysaccharides. **J. Med. Microbiol.**, v. 43, p. 251-257. 1995.

OZEKI, Y.; KANEDA, K.; FUJIWARA, N. et al. *In vivo* induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6,6'-Dimycolate). **Infect. Immun.**, v. 65, n. 5, p. 1793-1799. 1997.

PERAÇOLI, M.T.S. Paracoccidioidomicose 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]. 1978.

PERAÇOLI, M.T.; FORTES, M.R.; DA SILVA, M.F. et al. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, n. 2, p. 129-136. 1995.

POBER, J.S.; GIMBRONE, M.A.; LAPIERRE, L.A. et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. **J. Immunol.**, v. 137, p. 1893-1896. 1986.

RAVIOLA, E.; KARNOVSKY, M.J. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. **J. Exp. Med.**, v. 136, p. 466-498. 1972.

REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Regulation of Blood Pressure. **PNAS**, v. 86, p. 3375-3378. 1989.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 46, n. 2, p. 346-353. 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unresolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323-334. 1985.

RESTREPO, A; MCEWEN, J.G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, n. 3, p. 233-241. 2001.

ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAIE-KAKAZU, M. et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57Bl/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 128, p. 421-428. 2002.

ROGGERO, E.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I. et al. Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pre-treatment. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 123-131. 2004.

ROSENZWEIG, M.; CONNOLE, M.; FORAND-BARABASZ, A. Mechanisms associated with thymocyte apoptosis induced by simian immunodeficiency virus. **J. Immunol.**, v. 165, p. 3461-3468. 2000.

ROWE, W.P.; WORTH I.C. A new mouse virus causing necrosis of the thymus in newborn mice. **J. Exp. Med.**, v. 113, p. 831-844. 1961.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155, p. 1151-1164. 1995.

SAN-BLAS, G.; VERNET, D. Induction of the synthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. **Infect. Immun.**, v. 15, n. 3, p. 897-902. 1977.

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. **Mycopathologia**, v. 79, n. 3, p. 159-84. 1982.

SANCHEZ-CORDON, P.J.; ROMANINI, S.; SALGUERO, F.J. et al. Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever.. **J. Comp. Pathol.**, v. 127, n. 4, p. 239-248.

SANO, A.; NOBUYUKI, K.; IABUKI, K. et al. A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathol.**, v. 124, p. 157-161. 1993.

SAVINO, W. & VIEIRA, J.L. Is there a role for extracellular matrix in thymus physiology and pathology? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, Suppl 3, p 91-97. 1991.

SAVINO, W; LEITE-DE-MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. et al. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Immunol.**, v. 19, n. 9, p. 1727-33. 1989.

SAVINO, W.; MORAES, M.C.; BARBOSA, S.D. et al. Is the thymus a target organ in infectious diseases? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, Suppl. 5, p. 73-8. 1992.

SCHULTZ, R.M.; KLEINSCHMITH, W. Functional identity between murine interferon and macrophage activating factor. **Nature**, v. 305, n. 5931, p. 239-240. 1983.

SEELENTAG, W.K.; MERMOD, J.J.; MONTESANO, R. et al. Additive effects of interleukin 1 and tumour necrosis factor-alpha on the accumulation of the three granulocyte and macrophage colony- stimulating factor mRNAs in human endothelial cells. **EMBO J.**, v. 6, p. 2261-2265. 1987.

SEMPOWSKI, G.D.; HAYNES, B.F. Immune reconstitution in patients with HIV infection. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 269-284. 2002.

SILVA, M.R.; MARQUES, A.S.; CAMPOS, D.S. et al. Imunologia na paracoccidioidomicose. **An. Bras. Dermatol.**, v. 56, n. 4, p. 227-234. 1981.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, v. 36, n. 1, p. 37-42. 1998.

SINGER, K.H. Interactions between epithelial cells and T lymphocytes: role of adhesion molecules. **J. Leukoc. Biol.**, v. 48, p. 367-374. 1990.

SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; CALICH, V.L. et al. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 97, v. 1, p. 113-119. 1994.

SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.F. et al. Evaluation of the pathogenicity and imunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 27, p. 71-82. 1989.

SINGER-VERMES, L.M.; CIAVAGLIA, M.C.; KASHINO, S.S. et al. The source of the growth-promoting factor(s) affect the plating efficiency of *P. brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 261-264. 1992.

SNAPPER, C.M., PESCHEL, C. & PAUL, W.E. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 140, p. 2121-2127. 1988.

SOTOMAYOR, C.E.; RUBINSTEIN, H.R.; CERVI, L. et al. Immunosuppression in experimental cryptococcosis in rats. Induction of thymic suppressor cells. **Mycopathologia**, v. 108, n. 1, p. 5-10. 1989.

SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A. et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p. 1811-1820. 2000.

SOUTO, P.C.S.; BRITO, V.N.; GAMEIRO, J. et al. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection increases apoptotic rate in thymus. **Ann. Rev. Biom. Scien.**, v. 4, p. 141-145. 2002.

SOUTO, P.C.S.; BRITO, V.N.; GAMEIRO, J. et al. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Microbiol. Immunol. (Berl)**, v. 192, n. 4, p. 225-229. 2003.

STUEHR, D.J.; NATHAN, C.F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 1543-1555. 1989.

SUSTER, S.; ROSAI, J. Thymus. In: **Histology for pathologists** (Sternberg, S.S., ed.) Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, p. 687-706.

TARTAGLIA, L.A.; WEBER, R.F.; FIGARI, I.S. The Two Different Receptors for Tumor Necrosis Factor Mediate Distinct Cellular Responses. **PNAS**, v. 88, p. 9292-9296. 1991.

TEIXEIRA, H.C.; CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M. et al. Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 5, p. 587-589. 1987.

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

TRINCHIERI, G.; KOBAYASHI, M.; ROSEN, M. et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxin induce differentiation of human myeloid cell lines in synergy with immune interaction. **J. Exp. Med.** v. 164, p. 1206-1225. 1986.

UCHIMURA, E.; WATANABE, N.; NIWA, O. et al. Transient infiltration of neutrophils into the thymus in association with apoptosis induced by whole-body X-irradiation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, p. 780-784. 2000.

VERINAUD, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; SAKURADA, J.K. et al. Immunodepression induced by *Trypanosoma cruzi* and mouse hepatitis virus type 3 is associated with thymus apoptosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 186-191. 1998.

VERINAUD, L.; SOUTO, P.C.S.; BRITO, V.N. Thymic atrophy during infectious diseases. **Braz. J. Morphol. Scienc.**, v. 21, n. 2, p. 111-116. 2004.

VILLA-VERDE, D.M.; MELLO-COELHO, V.; LAGROTA-CANDIDO, J.M. et al. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, n. 8, p. 907-12, 1995.

WEKERLE, H. & KETELSEN, U.P. Thymic nurse cells-Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? **Nature**, v. 283, n. 5745, p. 402-404. 1980.

WONG, G.H.; CLARK-LEWIS, I.; HARRIS, A.W. et al. Effect of cloned interferon-gamma on expression of H-2 and Ia antigens on cell lines of hemopoietic, lymphoid, epithelial, fibroblastic and neuronal origin. **Eur. J. Immunol.**, v. 14, n. 1, p. 52-56. 1984.

YARILIN, A.A.; BELYAKOV, I.M. Cytokines in the thymus: production and biological effects. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 4, p. 447-464. 2004.

ZACHARIAS, D.; UEDA, A; MOSCARDI-BACCHI, M. et al. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 24, n. 6, p. 445-454. 1986.

ZHANG, D.F.; REN, H.; JIA, X.P. et al. Serum tumor necrosis factor (TNF) in the pathogenesis of clinical hepatic failure of HCV and/or HBV infection. **Chin. Med. J. (Engl)**, v. 106, n. 5, p. 335-338. 1993.

Anexos

Artigo 1: *“Thymic atrophy and fungal virulence during experimental paracoccidioicomycosis.”* **Braz. J. Microbiol. 34 (suppl. 1):** 14-16, 2003

THYMIC ATROPHY AND FUNGAL VIRULENCE DURING EXPERIMENTAL PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

Vânia Nieto Brito*; Paula Cristina de Souza Souto; Jacy Gameiro; Maria Alice Cruz-Höfling; Liana Verinaud

Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

This paper corresponds to an "extended abstract" selected for oral presentation in the 22nd Brazilian Congress of Microbiology, held in Florianópolis, SC, Brazil, in November 17-20, 2003

ABSTRACT

The immunosuppression observed in systemic mycosis can be related to primary lymphoid organs damage. Thus, our laboratory has studied the effects of the *Paracoccidioides brasiliensis* infection on the thymus of mice. Here, thymuses of susceptible and resistant mice were evaluated after inoculation with highly and slightly virulent isolates of the fungus. All groups presented thymic atrophy, loss of corticomedullary delimitation and increase of apoptotic index. However, mice inoculated with high virulent strain showed earlier and stronger alterations suggesting that thymic atrophy can be directly related to the fungal virulence and to the immunosuppression.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, thymus, fungal virulence.

INTRODUCTION

P. brasiliensis (Pb) infects human beings causing a systemic mycosis called paracoccidioidomycosis with elevated incidence in Brazil (2). Considering the tropism of this fungus by lymphoid tissues (2,3), we have studied its action on the thymus in experimental models. In BALB/c mice, we observed that a virulent isolate of Pb is able to invade the thymic microenvironment inducing severe atrophy, depletion of the cortical layer, loss of the corticomedullary delimitation, and medullary and subcapsular inflammatory infiltrate (1). Also, an increase in programmed cell death (PCD) by apoptosis and autophagy was observed (6). In this work, we evaluated thymic alterations induced by highly and slightly virulent isolates of Pb in susceptible (B10.A) and resistant mice (A/J).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

A/J and B10.A male mice from CEMIB/UNICAMP were intraperitoneally inoculated with 5×10^6 yeasts of Pb (highly Pb18

or slight Pb265 strain) or sterile phosphate buffered saline (control). Lots of 5 mice were weighted and sacrificed at 1, 3, 5, 7 and 14 days post-infection (pi). Thymuses were collected, weighted, fixed in 10% buffered formalin and routinely processed for histopathological analysis. One thymic lobe was homogenized in fetal calf serum-supplemented RPMI 1640 medium for total cell number evaluation.

Immunohistochemistry

Detection of Pb in thymus was performed by conventional immunohistochemistry (1). PCD was detected by TUNEL technique (Boehringer, Germany) according to the manufacture's instructions.

Statistical Analysis

Bonferroni's multiple comparison test was used. The probability level of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

All groups studied presented reduction in thymic index since 1 day pi, peaking at the 3rd day and returning to the usual values

*Corresponding author. Mailing address: Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n. Instituto de Biologia. Departamento de Microbiologia e Imunologia. Cidade Universitária. Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: vanianb@unicamp.br

after this period (Fig. 1). It was also observed a decrease in thymic total cell number at 3 days pi independently of mice lineage or fungal strain used (Fig. 2).

Morphological alterations could also be observed in all experimental groups. The principals were: presence of yeasts of Pb; reduction in cortical thickness and cellularity, constituting a starry-sky pattern (Fig. 3A); loss or attenuation of corticomedullary delimitation (Fig. 3B) and augment in the apoptotic levels (Fig. 3C).

Despite of similarities described, some relevant differences were observed. A capsular inflammatory infiltrate with granulocytes and plasma cells was observed, except in B10. A mice infected with Pb265. This infiltrate was larger and more persistent in Pb18-infected mice (Fig. 3D). Besides, all thymic alterations were earlier and stronger in these mice, which also presented more yeasts for a longer period.

DISCUSSION

In this work we observed thymic alterations similar to previously detected in BALB/c mice that present an intermediate susceptibility to disease (1). Moreover, we noted that the highly virulent isolate Pb18 is more invasive and persistent in thymus causing earlier and stronger alterations than the slightly virulent Pb265 strain.

We assume that thymic atrophy occurs due to a direct action of Pb, since all alterations were related to the fungal virulence and its presence in this organ. Such action could be related to toxic mediators released by the fungus itself as observed in other fungal disease (5,7). So, thymic atrophy is, most probably, an additional mechanism of virulence contributing for immune modulation and persistence of the Pb in the host.

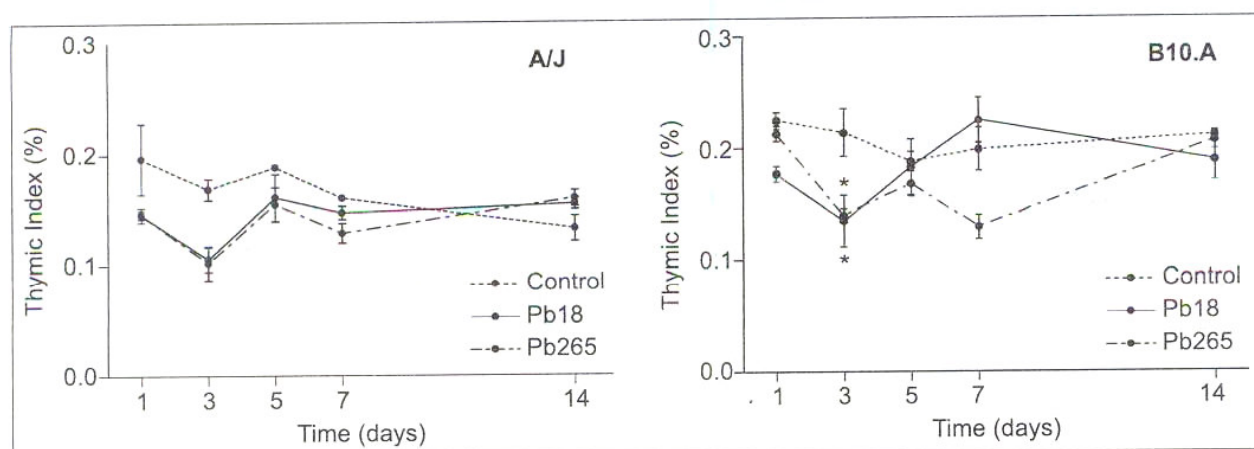


Figure 1. Thymic index. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=5). (* $p < 0.05$).

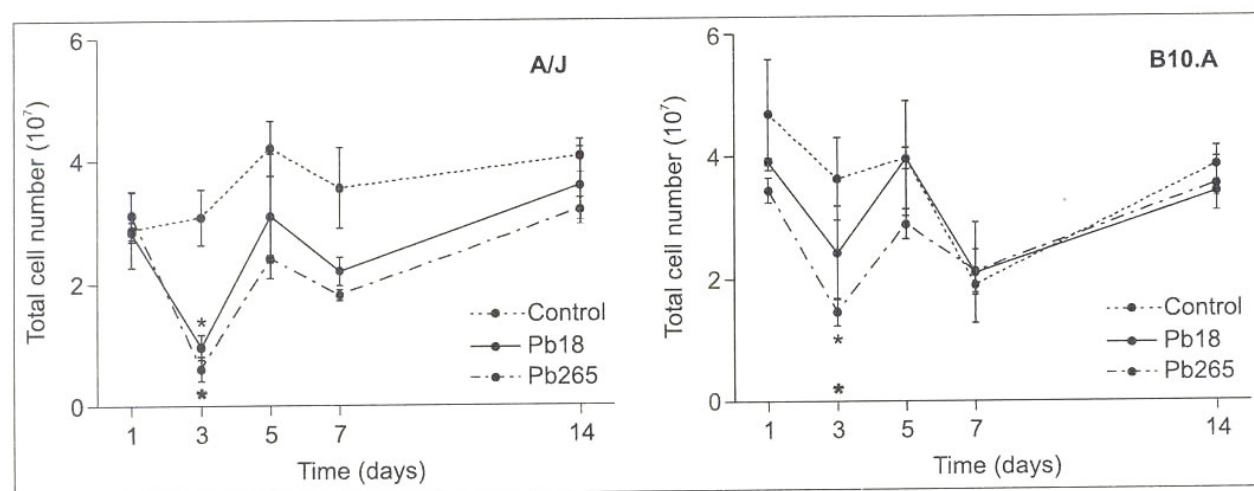


Figure 2. Thymic total cell number. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=5). (* $p < 0.05$).

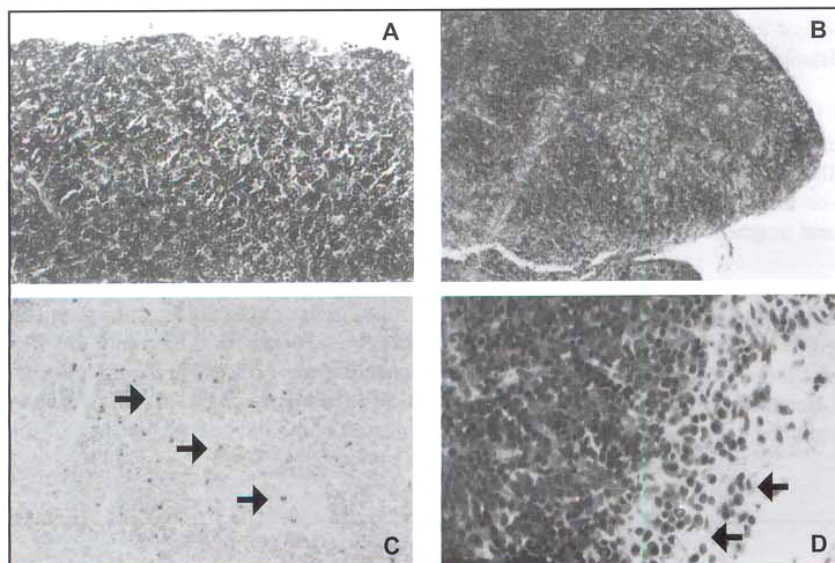


Figure 3. Thymus of mice inoculated with *P. brasiliensis*.

- A.** Thymic cortex of a B10.A mouse inoculated with Pb18 showing a starry-sky pattern. HE. 200x;
- B.** Thymus from an A/J mouse infected with Pb18, there is not corticomedullary delimitation. HE. 100x;
- C.** Thymus from an A/J mouse inoculated with Pb18 showing a large number of apoptotic cells. TUNEL counterstained with methyl green. 200x;
- D.** Thymic capsule of a B10.A mouse inoculated with Pb18 with an inflammatory infiltrate rich in plasma cells (↔). HE. 400x.

ACKNOWLEDGMENTS

FAEP/UNICAMP (#858/01), FAPESP (#03/01891-4) and CAPES supported this work.

RESUMO

Atrofia tímica e virulência fúngica durante a paracoccidioidomicose experimental

A imunossupressão observada em micoses sistêmicas pode estar relacionada a danos nos órgãos linfóides primários. Assim, nosso laboratório tem estudado uma possível ação do *Paracoccidioides brasiliensis* sobre o timo de camundongos. Neste estudo, analisamos o timo de camundongos susceptíveis e resistentes ao fungo utilizando cepas de alta e baixa virulência. Todos os grupos apresentaram atrofia tímica, perda de delimitação corticomedular e aumento da taxa de apoptose. Entretanto, as alterações foram mais precoces e pronunciadas em camundongos inoculados com a cepa virulenta do fungo, sugerindo que a virulência fúngica pode estar diretamente ligada à atrofia tímica e indução de imunossupressão.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, timo, virulência fúngica.

REFERENCES

1. Brito, V.N.; Souto, P.C.S.; Ricci, L.C.; Cruz-Hofling, M.A.; Verinaud, L. Thymic invasion and atrophy induced in *Paracoccidioides brasiliensis* - infected mice. *Med. Mycol.*, 41:1-5, 2003.
2. Brummer, E.; Castaneda, E.; Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6:89-117, 1993.
3. Franco, M.; Mendes, R.P.; Moscardi-Bacchi, M. Paracoccidioidomycosis. *Baillière's Clin. Trop. Med. Comm. Dis.*, 4:185-220, 1989.
4. Haeryfar, S.M.; Berczi, I. The thymus and the acute phase response. *Cell. Mol. Biol.*, 7:145-156, 2001.
5. Islam, Z.; Masahiro, N.; Yoshizawa, T.; Yamauchi, K.; Sakato, N. T-2 toxin induces thymic apoptosis *in vivo* in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 148:205-214, 1998.
6. Souto, P.C.S.; Brito, V.N.; Gameiro, J.; Cruz-Hofling, M.A.; Verinaud, L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. *Med. Microbiol. Immunol.* In press.
7. Sutton, P.; Newcombe, N.R.; Waring, P.; Müllbacher, A. *In vivo* immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect. Immun.*, 62:1192-1198, 1994.

***Artigo 2: "Thymic atrophy in infectious diseases."
Braz. J. morphol. Sci. 21 (2): 111-116, 2004***

THYMIC ATROPHY IN INFECTIOUS DISEASES

Liana Verinaud, Paula Cristina de Souza Souto and Vânia Niêto 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 could make the host environment propitious 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, and presents its greatest relative weight, 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 (Fig. 2; Table 1). The degree of thymic involution correlates with the duration of acute illness [34].

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

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.

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

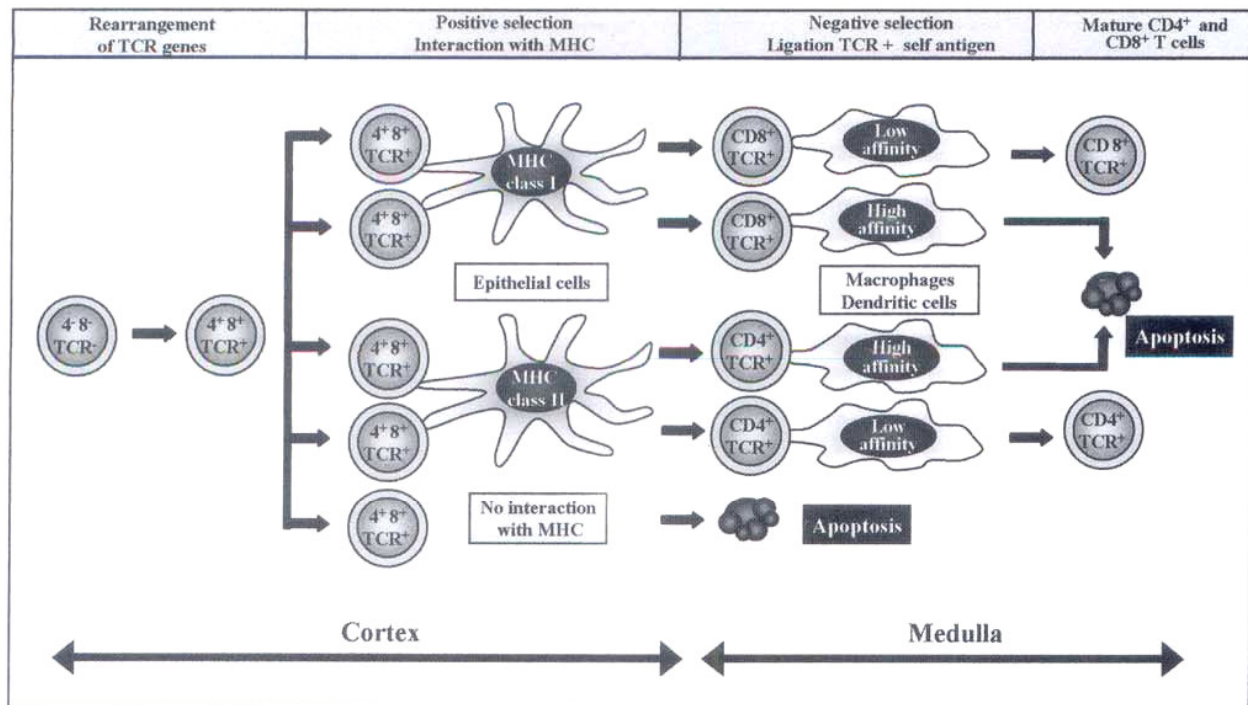


Figure 1. Positive and negative selection processes in the thymus. (Adapted from Roitt *et al.* [24]).

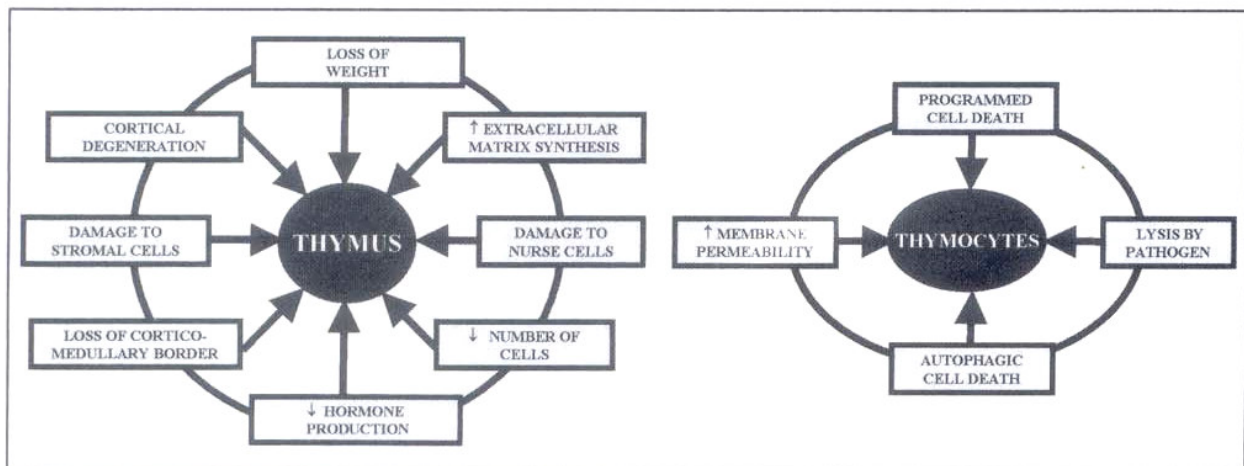


Figure 2. Thymus and thymocyte alterations that can be observed during infections.

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	[37]
	<i>E. coli</i> (LPS)	LIF + corticosteroids	[29]
	<i>S. typhimurium</i> (LPS)	NO	[7]
	<i>M. tuberculosis</i> (CF)	TNF	[22]
Fungi	<i>P. brasiliensis</i>	?	[30]
Protozoa	<i>T. cruzi</i>	ATP _e	[6]
Viruses	CSF Virus	TNF, IL-1	[27]
	SIV	Fas, bcl-2	[25]
	HIV	Fas	[36]
	MHV	?	[35]

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

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 be induced by other cytokines 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 autocrine 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. However, 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. 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 cocultured 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 also 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 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 severely impaired since there was a reduction in the granularity, size and number of TNC complexes, 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. *P. 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 juxtacapsular 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, thymic 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 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 L (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 Ca²⁺ 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, Coultelier 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. Kroncke 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, Jolicouer 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, Feher 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, Connole 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