

ULTRAESTRUTURA DO PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS I — NA FASE FILAMENTOSA (*)

Guilberto MINGUETTI (1), Robin Mario HOFMEISTER (2), Marilene FAVARO (3) e Orlando Teodorico de FREITAS (4)

R E S U M O

São estudados alguns aspectos ultraestruturais do *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura na fase filamentosa, dando-se ênfase às células que constituem as hifas. Além dos constituintes citoplasmáticos, são descritos em detalhes o envoltório celular, constituído pela membrana plasmática, membrana basal e parede celular, e o septo que é a zona de contacto entre as células que se encontram alinhadas ao longo das hifas. Baseando-se nos aspectos ultraestruturais destas células e em seu grau de interrelacionamento, é discutida a possibilidade das mesmas constituírem-se em clamidospores em potencial.

I N T R O D U Ç Ã O

Embora muito se tenha escrito sobre a paracoccidioidomicose, poucos são os trabalhos de Autores brasileiros que enfocam a ultraestrutura do *Paracoccidioides brasiliensis*. Na bibliografia sobre a paracoccidioidomicose levantada por LACAZ¹⁰, de 1908 a 1978, observa-se somente um trabalho de Autor brasileiro que trata do estudo do *P. brasiliensis* em cultura através da microscopia eletrônica. Mesmo assim, tal trabalho refere-se ao estudo do *P. brasiliensis* por microscopia eletrônica de varredura¹¹. Sendo este microrganismo classificado como dimórfico, por apresentar predominância de formas gemulantes ou leveduriformes quando em vida parasitária ou quando cultivado à temperatura de 37°C e predominância de micélios filamentosos septados quando cultivado à temperatura ambiente, é de grande interesse a avaliação dos aspectos ultraestruturais do fungo em ambas as fases. Os Autores enfocam no presente trabalho as unidades que constituem as hifas e as membranas envoltórias do microrganismo, pois pouca ênfase tem sido da-

da nesse sentido e isso poderia contribuir para a melhor compreensão do ciclo evolutivo e da patogenicidade do *P. brasiliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Paracoccidioides brasiliensis, objeto deste estudo, foi obtido da Seção de Bacteriologia do Laboratório Geral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Seu cultivo foi inicialmente realizado em ágar Sabouraud à temperatura de 37°C e, depois, à temperatura ambiente, quando então se desenvolveram as formas filamentosas. O material obtido foi a seguir pré-fixado em glutaraldeído a 2% com tampão cacodilato 0,15M. Após duas horas de fixação em glutaraldeído o material foi lavado com tampão cacodilato por 15 minutos. Fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% com tampão cacodilato 0,30M. Em seguida, foi feita lavagem com solução de tampão cacodilato 0,15M e 0,2g NaCl durante 15 minutos, após o que foi contrastado com acetato de

(*) Trabalho realizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, Brasil

(1) Professor Adjunto, Departamento de Clínica Médica, U.F.Pr

(2) Professor Assistente, Centro de Microscopia Eletrônica, U.F.Pr

(3) Bioquímica, Hospital de Clínicas, U.F.Pr

(4) Professor Titular, Centro de Microscopia Eletrônica, U.F.Pr

uranila a 2% por 24 horas. O material foi novamente lavado em água destilada durante 5 minutos e a desidratação realizada com etanol. Em seguida foi colocado em acetona a 100% e embebido numa mistura de Polylyte. Secções ultrafinas foram obtidas através do ultramicrotomo Sorval MT2B e coletadas em grades de cobre, coradas com citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico Philips EM300.

RESULTADOS

Quando se observa ao microscópio eletrônico o *P. brasiliensis* em sua fase filamentososa, o que mais chama a atenção do examinador é o seu envoltório celular. Aparentemente, tal envoltório é constituído de três membranas:

uma interna, a membrana plasmática, bastante fina, uma externa, a membrana basal, de aspecto granuloso e de espessura superior à da membrana plasmática e, entre ambas, a parede celular (Figs. 2 e 3). A parede celular chama atenção por sua acentuada espessura em relação às demais e por ser bastante eletrônica densa. Embora possa parecer uma estrutura laminar, não são identificadas na parede celular subunidades estruturais, como é o caso das lamelas encontradas na bainha de mielina, mesmo quando aquela estrutura é observada em grandes aumentos (Figs. 3, 4 e 5), como também nela não são observados poros de qualquer natureza.

A membrana externa ou basal aparece como um manto único que envolve todas as cé-

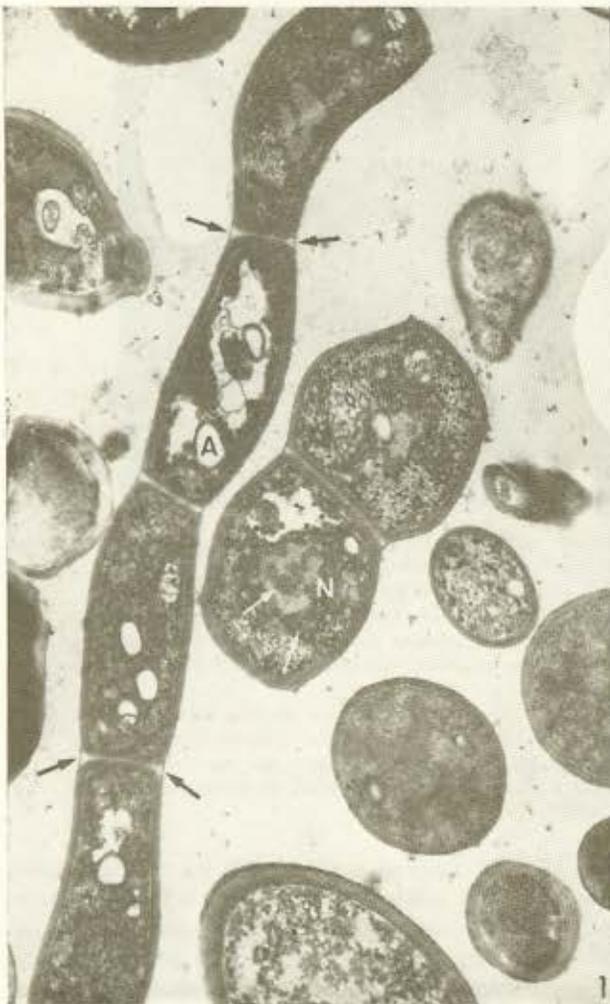


Fig. 1 — A esquerda, vê-se uma hifa em secção longitudinal constituída por quatro células separadas entre si pelos respectivos septos. São bastante evidentes a parede celular e a membrana basal (setas grossas), esta última envolvendo todas as células a um só tempo. Alguns artefatos de técnica são vistos no interior das células (A). A direita destas células aparece um corte de outra hifa que permite a visualização de apenas duas células em secção longitudinal. No campo aparecem ainda secções transversais de outras células. Algumas das células mostram o núcleo (N) com respectivas cromatinas (setas finas). 15.000 ×

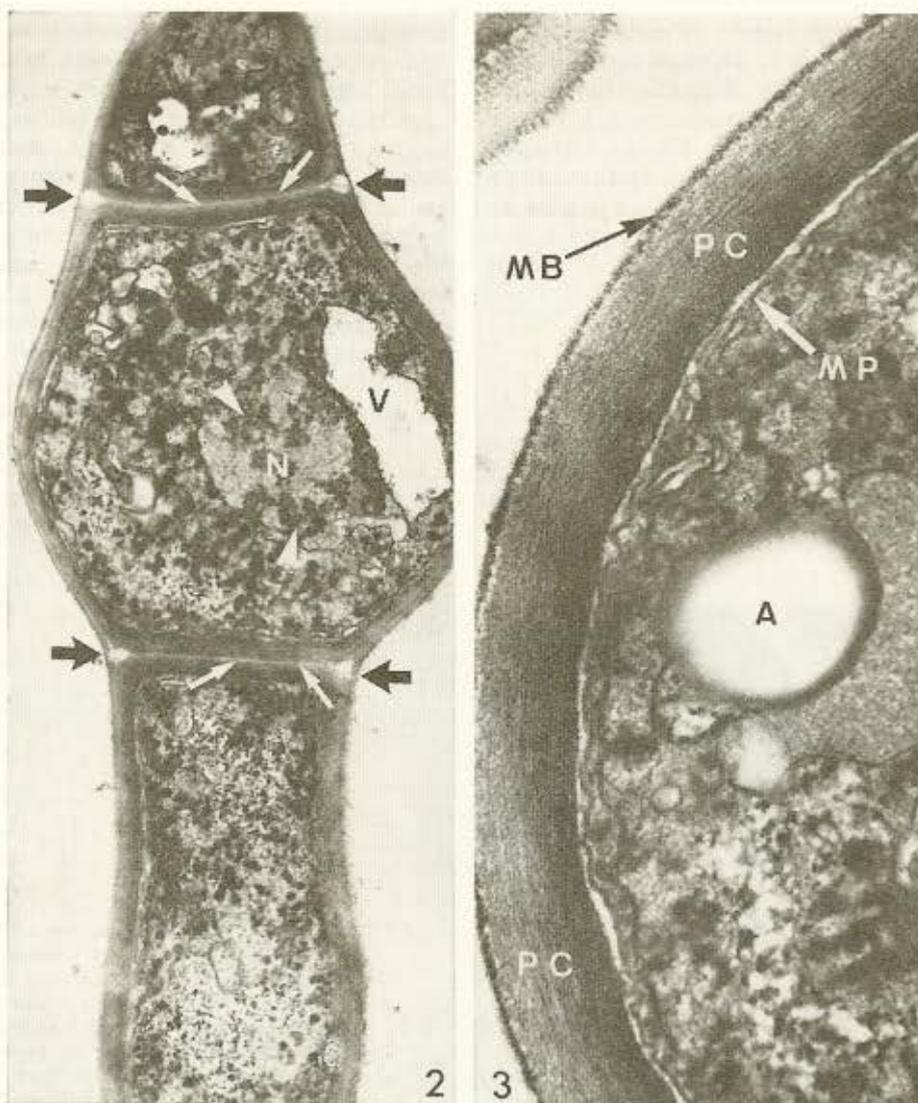


Fig. 2 — Corte longitudinal mostrando o espaço existente entre as paredes celulares ao nível dos septos (setas finas). Observe que não ocorre membrana basal entre as paredes celulares ao nível dos septos e que as paredes celulares encontram-se retificadas àqueles níveis. As setas grossas indicam a membrana basal que envolve as células como um manto único. As cabeças de setas indicam a cromatina do núcleo (N). Numerosos grânulos eletrondensos são vistos no citoplasma. O grande vacúolo (V) observado na célula do centro apresenta membrana limitante. 28.000 ×

Fig. 3 — Corte transversal de uma célula de uma hifa mostrando detalhes das três membranas que formam o envoltório celular. PC = parede celular; MP = membrana plasmática; MB = membrana basal; A = artefato. Observe o aspecto laminar da parede celular e sua espessura em relação às outras membranas. Observe também a ausência de poros ao nível da parede celular. 70.000 ×

lulas de uma hifa. Sua identificação é mais fácil ao nível dos septos — porções limitrofes entre as células — pois àqueles níveis ocorre uma discreta diminuição dos calibres das hifas (Figs. 1, 2 e 6). O septo por sua vez é forma-

do por íntima aposição das paredes celulares de duas células justapostas. No septo observa-se pequeno espaço entre as paredes celulares das duas células vizinhas, mas dentro dele não se visualiza qualquer sinal da membrana exter-



Fig. 4 — Corte transversal de uma das células constituintes de uma hifa. PC = parede celular; MP = membrana plasmática. As setas delimitam parcialmente o núcleo que abriga em seu interior certa quantidade de cromatina. Partículas eletrônicas densas são vistas no citoplasma, 25.000 \times

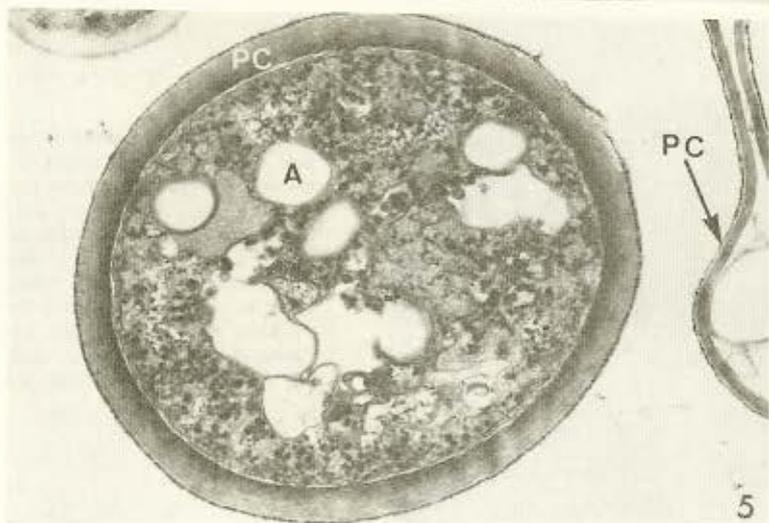


Fig. 5 — Corte transversal onde se destaca a proeminência da parede celular (PC). No citoplasma são vistos alguns artefatos de técnica (A). À direita do campo aparecem restos de parede celular sem conteúdo citoplasmático. 22.000 \times

na ou basal (Fig. 2). Ao nível do septo, ainda, ocorre uma retificação da curvatura natural da superfície das células e, às vezes, nele são observados espessamentos das paredes celulares de projeção para o interior das células (Fig. 6).

O citoplasma caracteriza-se por uma grande quantidade de partículas de ribossomos os quais, na maior parte das vezes, são identificados acolados às membranas do retículo endoplasmático. Aparelho de Golgi não foi identificado em nenhum dos cortes examinados. Ocasionalmente, corpos mielínicos são vistos dentro do citoplasma (Fig. 13). Corpúsculos eletrônicos densos são também observados dispersos no citoplasma.

O núcleo é de difícil identificação; seus limites são pouco precisos e irregulares. O núcleo não possui uma forma definida e mesmo nos cortes longitudinais das células que constituem a hifa não são observados núcleos que acompanham com sua forma o maior eixo das mesmas. Nucléolos típicos não foram observados dentro do nucleoplasma, mas uma fina cromatina é vista dispersa no mesmo na maioria das vezes (Figs. 2 e 4). Embora em franca fase de reprodução, não foram observadas nos microrganismos examinados massas organizadas de material cromossômico, bem como centríolos ou microtúbulos.

Nos vários campos examinados foram notadas paredes celulares vazias, isto é, sem qual-

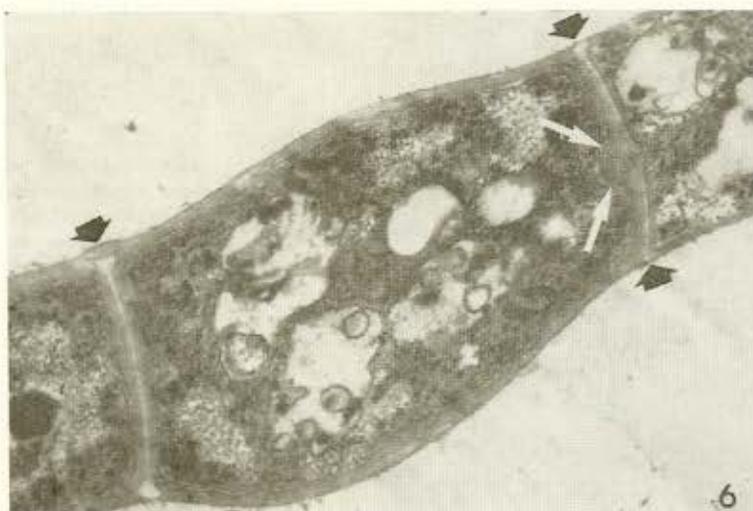


Fig. 6 — Corte longitudinal mostrando discreto espessamento das paredes celulares na porção central dos septos (setas finas). As setas grossas apontam a membrana basal. 31.000 \times

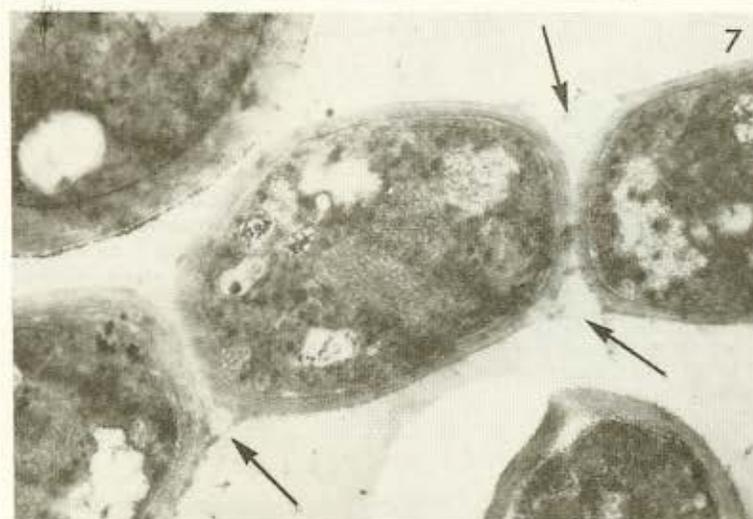


Fig. 7 — Corte longitudinal de uma hifa mostrando aparente início de separação das células que a constituem. Ao nível do ponto de maior proximidade entre as células a membrana basal é quase imperceptível (setas), a retificação da parede celular não é tão marcante e há um discreto aumento do espaço existente entre as paredes celulares. 31.000 \times

quer conteúdo citoplasmático (Figs. 9, 10 e 12). Tais paredes celulares desprovidas de conteúdo citoplasmático podem representar as formas do *P. brasiliensis* em degeneração, visto serem as paredes celulares, aparentemente, as estruturas de maior resistência do microrganismo e, portanto, as últimas a desaparecerem no processo natural de degeneração. As vezes, contudo, paredes celulares são vistas envolvendo um conteúdo amorfo sem que nele se possa identificar os componentes do citoplasma e isso poderia representar uma fase intermediária do processo de degeneração natural do microrganismo em cultura (Fig. 11).

DISCUSSÃO

Um dos aspectos ultraestruturais que mais se destacam no estudo do *Paracoccidioides bra-*

siliensis é, sem dúvida, o conjunto das membranas que formam o envoltório celular. Destas, chama atenção a membrana externa que por similaridade com certas células animais e vegetais pode ser chamada de membrana basal. A membrana basal em uma determinada fase da evolução do microrganismo envolve todas as células de uma determinada hifa a um só tempo, como um manto celular único. A membrana basal, contudo, não é observada cobrindo as paredes celulares ao nível dos septos. O espaço septal é, portanto, desprovido de membrana basal. Por observações sucessivas dos diversos campos examinados pode-se depreender que determinadas células de uma hifa, após coexistirem por um determinado tempo sob uma mesma membrana basal, em uma determinada fase da evolução do microrganismo afastam-se

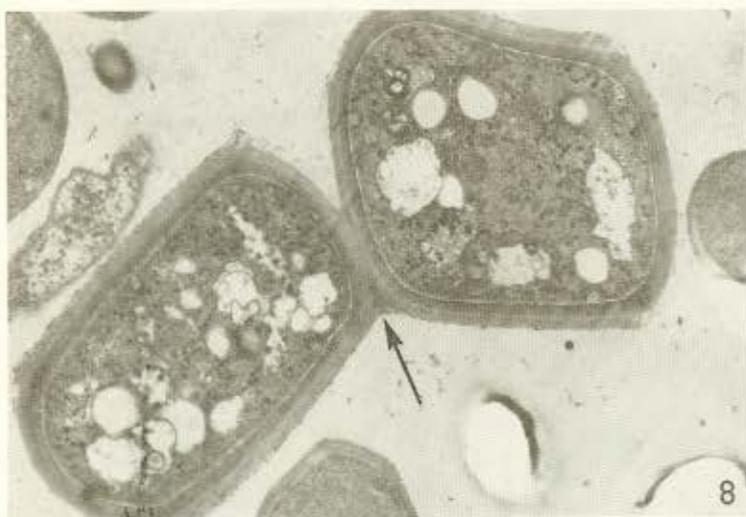


Fig. 8 — Corte longitudinal de duas células de uma hifa mostrando aparente processo de separação entre elas. A membrana basal é vista envolvendo as células somente ao nível do ponto mais próximo entre elas (setas). No lado oposto, há aparente ruptura da membrana basal. 16.000 \times



Fig. 9 — Corte transversal de algumas células em diferentes fases evolutivas: a célula 1 apresenta aspectos normais. A célula 2 apresenta membrana plasmática retraída e um grande espaço existe entre ela e a parede celular. Tal espaço é preenchido por substância amorfa (A). O núcleo (N) apresenta condensações isoladas de material finamente granular, partículas eletrônicas densas a membrana nuclear evidente. Na célula 3 não aparecem constituintes citoplasmáticos normais, apenas restos membranosos de aspecto irregular são vistos no seu interior. 17.000 \times

entre si alargando o espaço existente entre as paredes celulares ao nível do septo. Isto faz com que haja um rompimento da membrana basal ao nível do septo (Figs. 7 e 8) e cada célula, agora individualizada, terá sua própria membrana basal. Na ocorrência da divisão de uma célula individualizada, a mesma se processaria dentro da membrana basal que então passaria novamente a abrigar células filhas como um manto único mantendo-as unidas até nova fase de separação das células. Tem sido des-

cribido que a reprodução do *P. brasiliensis* na fase leveduriforme ocorre por gemulação, ou seja, as gêmulas ou blastósporos derivam por brotamento do microrganismo que nesta fase é unicelular^{2,3,4,6,9,11}. Na fase filamentosa, a reprodução dar-se-ia às custas de clamidósporos que seriam esporos formados às custas dos

filamentos micelianos que são pluricelulares. Baseando-se no processo acima descrito de individualização das células de uma determinada hifa poder-se-ia concluir que o mesmo está diretamente relacionado ao processo de reprodução do microrganismo e que cada célula de uma hifa constitui-se em um esporo em potencial, isto é, cada nova célula uma vez individualizada poderia dar origem por divisões sucessivas a um novo micélio. CARBONELL descreveu a presença de poros de localização mediana nas paredes celulares ao nível dos septos^{5,7}. Tais poros, descritos em outros tipos de fungos com hifas septadas, recebem o nome de poros septais. Segundo vários Autores, tais poros teriam grande participação na troca de material genético entre duas células justapostas. Eles seriam o ponto máximo de estrangulamento da

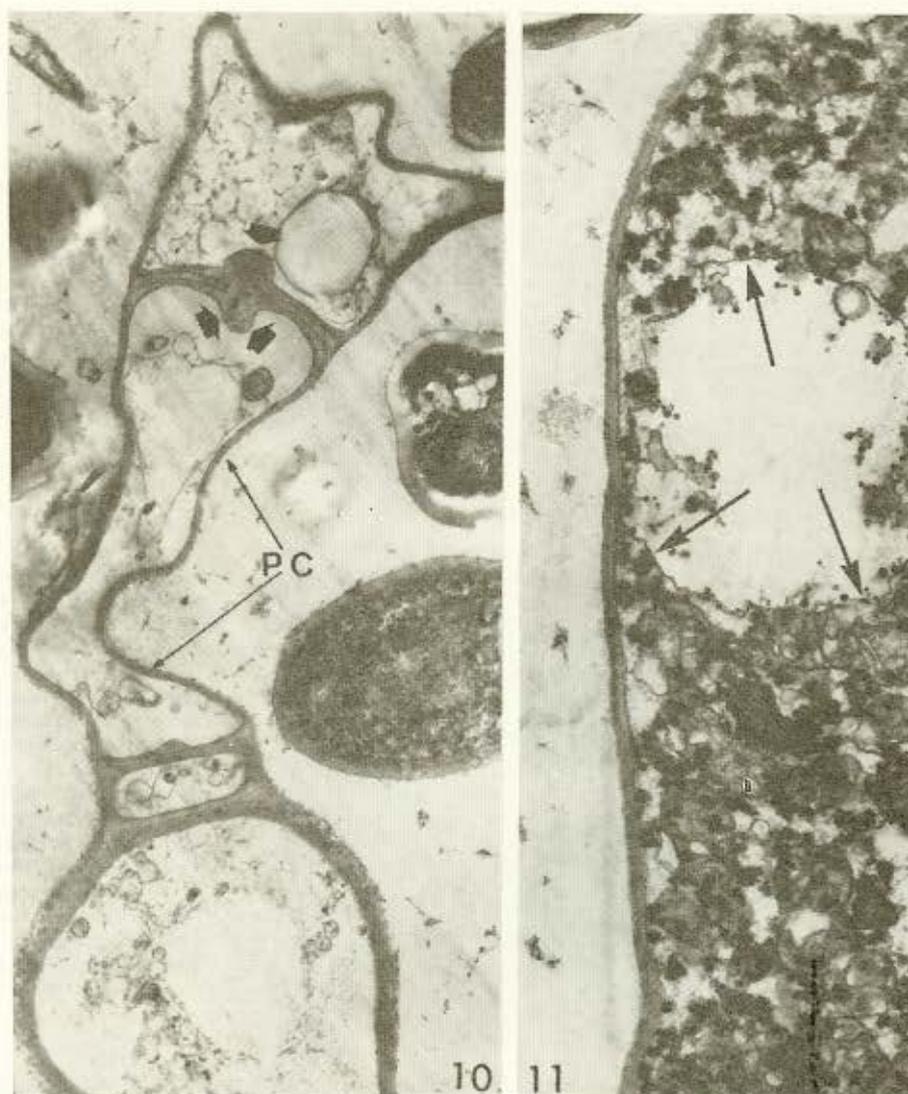


Fig. 10 — Nesta figura observa-se uma parede celular (PC) "vazia", isto é, sem constituintes citoplasmáticos. Septos são ainda observados. O septo situado na parte superior da figura apresenta um espessamento bem evidente em sua parte medial (setas). 15.000 X

Fig. 11 — Corte longitudinal de parte de uma hifa em provável processo de degeneração. É marcante a presença de grandes partículas eletrônicas densas. Porém é evidente um aumento dos espaços vazios entre elas. Restos membranosos, provavelmente representando restos do envoltório nuclear (setas) são ainda observados. 28.000 X

parede celular durante o processo de divisão de uma determinada célula, funcionando como um pertuito através do qual, por invaginação, passa a membrana plasmática que faz continuidade com as células vizinhas. Poros septais, contudo, não foram observados no presente trabalho e, ao contrário, no local onde dever-se-ia observar o poro nota-se algumas vezes espessamento das paredes celulares. Tal diferença po-

deria decorrer de diferentes etapas de desenvolvimento do microrganismo estudada por CARBONELL e pelos Autores do presente trabalho ou, ainda, tais espessamentos das placas septais poderiam sugerir um tipo particular de septo de estrutura mais complexa. A presença de corpos mielínicos no interior do citoplasma do *Paracoccidioides brasiliensis* ainda é objeto de especulação científica¹.

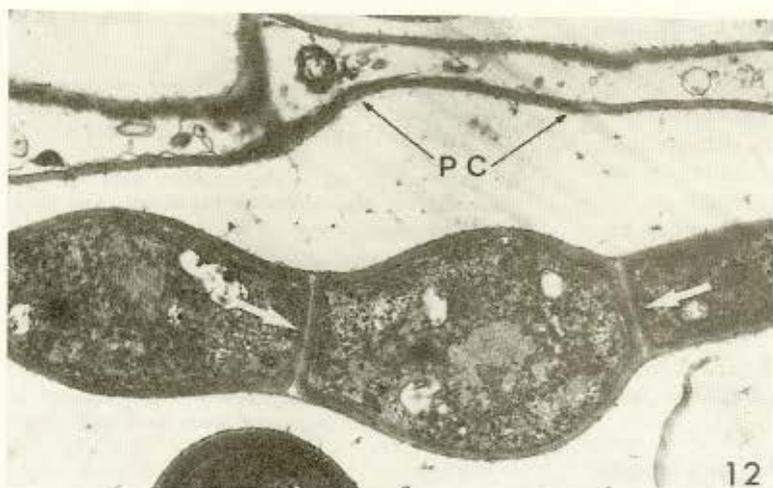


Fig. 12 — Abaixo, corte longitudinal mostrando três células envolvidas por uma mesma membrana basal e separadas entre si pelos septos (setas). Acima, observa-se a parede celular (PC) de outra hifa sem qualquer constituinte citoplasmático. Nela também não são identificadas as membranas basal e plasmática. 19.000 ×

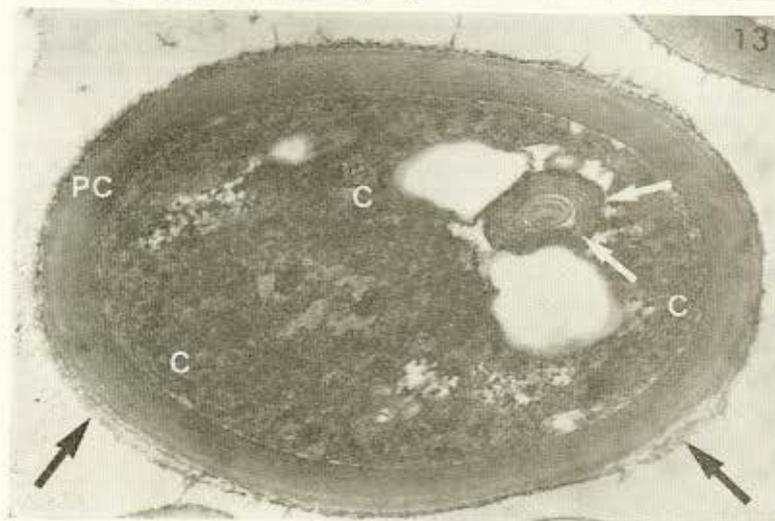


Fig. 13 — Corte transversal de uma célula mostrando corpo mielinico (seta fina) no interior do citoplasma (C). As setas grossas apontam para a membrana basal. PC = parede celular. 35.000 ×

SUMMARY

Ultrastructure of *Paracoccidioides brasiliensis* in the mycelial phase

Paracoccidioides brasiliensis in mycelial phase obtained from culture at room temperature was studied by electron microscopy. At the level of the hypha the fungus has a cellular envelope composed of three layers: an internal layer, the plasma membrane, which is similar to the plasma membrane of any other cell; an external membrane, thicker and more electron dense than the plasma membrane and between the plasma and basement membranes there occurs the cellular wall which is a well defined electron dense structure much more thicker and electron dense than the plasma and basement

membranes. The cellular wall has a laminated appearance and does not exhibit pores on its surface.

At one stage of the fungus development the cells of a certain hypha, which occur in groups disposed longitudinally, are seen surrounded by a common layer of basement membrane. These cells have a small space between them at the level of the septum which is the place where the cellular walls of the near cells lie in close proximity. Basement membrane is not seen surrounding the cellular wall at the level of the septum. In time the space between two near cells may enlarge and the basement membrane suffers an interruption at the level of the septum and each cell acquires its own basement

membrane thus becoming eventually a new multicellular fungus by successive division.

The cells which form the hypha have a single nucleus with fine chromatin dispersed in the nucleoplasm. The cytoplasm contain mitochondria, ribosomes, endoplasmic reticulum, vacuoles and electron dense bodies. Hyphas undergoing degeneration are also described.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARBONELL, L. M. & POLLAK, L. — "Myelin figures" in yeast cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bact.* 83: 1356-1357, 1962.
2. CARBONELL, L. M. & POLLAK, L. — Ultraestructura del *Paracoccidioides brasiliensis* en cultivos de la fase levaduriforme. *Mycopathologia (Den Haag)* 19: 184-204, 1963.
3. CARBONELL, L. M. & RODRIGUES, J. — Transformation on mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. *J. Bact.* 90: 504-510, 1965.
4. CARBONELL, L. M. — Cell wall changes during the budding process of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitides*. *J. Bact.* 94: 213-223, 1967.
5. CARBONELL, L. M. & RODRIGUEZ, J. — Mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitides*: an electron microscope study. *J. Bact.* 96: 533-543, 1968.
6. CARBONELL, L. M. — Ultrastructure of dimorphic transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bact.* 100: 1076-1082, 1969.
7. CARBONELL, L. M. — Observaciones sobre la ultraestructura del *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta cient. venez.* 23 (suppl): 56-58, 1972.
8. FURTADO, J. S. — Citologia e Ultra-Estrutura dos Fungos: In: LACAZ, C. S.; MINAMI, P. S. & PURCHIO, A. (ed.) — *O Grande Mundo dos Fungos*. São Paulo, Editora da Universidade e Editora Polígono, 1970, 45-61.
9. GIL, F. & CARBONELL, L. M. — Ultrastructure of the yeast phase of *Paracoccidioides*. *Acta cient. venez.* 19: 45-47, 1968.
10. LACAZ, C. da S. & ROSA, M. C. B. — *Bibliografia sobre Paracoccidioidomicose (Doença de Lutz) 1908-1978 e Doença de Jorge Lôbo (Blastomicose Queloidiforme) 1931-1978*. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1979.
11. VIEIRA e SILVA, C. R.; MATTOS, M. C. F. I. & FUJIMORE, K. — Scanning electron microscopy of *Paracoccidioides brasiliensis*. Study with and without pre-treatment with pooled sera from patients with South American blastomycosis. *Mycopathologia (Den Haag)* 54: 235-251, 1974.

Recebido para publicação em 13/7/1982.