



# Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células endoteliais

Monteiro da Silva, J.L.<sup>1\*</sup>; Andreotti, P.F.<sup>1</sup>; Mendes-Giannini, M.J.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 12/09/05 / Aceito 08/11/05

## RESUMO

A paracoccidioidomicose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e *Paracoccidioides brasiliensis*, seu agente etiológico, pode atingir vários tecidos com ênfase ao pulmão. A migração de fungos patogênicos através da camada de células endoteliais é considerada pré-requisito para a invasão de múltiplos órgãos e sua disseminação. No presente estudo verificou-se a adesão de *P. brasiliensis* às células endoteliais *in vitro* e se esta adesão poderia representar um mecanismo para a disseminação do fungo. Para tanto, além da técnica convencional de microscopia ótica, uma outra metodologia foi desenvolvida, emblocando os cordões umbilicais em parafina, no intuito de detectar o fungo presente no material (*in vivo*). Experimento de migração de *P. brasiliensis* através da monocamada de células endoteliais também foi realizado, e nos poços sem células, a migração de células leveduriformes foi maior em menor período de tempo. Os fungos conseguiram passar através da monocamada, quando comparados com o controle sem as células, mas com redução em torno de 30%. Isso mostra que a monocamada foi parcialmente impediante para o fungo, mas que este foi capaz de migrar através dessas células. Em nossos experimentos com estas células, houve grande dificuldade de se encontrar *P. brasiliensis* aderido ao tapete celular nos períodos de tempo padronizados. Sugere-se com esses resultados que o fungo atravessa as células endoteliais de uma maneira muito rápida, que não pode ser detectada através do cultivo *in vitro*. Portanto, *P. brasiliensis* teria capacidade de atravessar rapidamente as células endoteliais e provavelmente alcançar tecidos mais profundos.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, células endoteliais, migração.

## INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose profunda causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, endêmica na América Latina, principalmente no Brasil. A capacidade de *P. brasiliensis* causar micose com grande variedade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até doença disseminada evoluindo para letalidade, depende provavelmente da relação entre a

virulência do fungo, a habilidade deste em interagir com as estruturas do hospedeiro e invadi-las, e a resposta imunológica deste último.

Com intuito de estudar os passos envolvidos desde o contato inicial de *P. brasiliensis* até os eventos que culminam em sua entrada na célula, nosso grupo tem desenvolvido o modelo de culturas celulares. *P. brasiliensis* pode desenvolver vários fenótipos (crescimento, invasão e metástase) dependendo da amostra fúngica, do hospedeiro e outros fatores (Lenzi et al., 2000).

A capacidade de aderência a moléculas específicas da superfície celular, confere ao patógeno a habilidade para selecionar com qual componente do hospedeiro este quer interagir e, a partir daí, a colonização do tecido. A interação de adesinas (constituintes do microrganismo) com receptores celulares, que estão normalmente envolvidos no contato célula-célula ou célula-matriz (especialmente integrinas), podem ser usados pelo patógeno para invadir e existir como parasita intracelular (Goosney et al., 1999). Outro dado sugestivo observado diz respeito à perda da capacidade de aderência de isolados após subcultivos. A capacidade de adesão e de virulência para animais é restaurada quando se obtém retro-cultivos após inoculação (Brumer et al., 1990; Kashino et al., 1985; Andreotti et al., 2005) ou a partir de culturas de células infectadas (dado não publicado). A adesão epitelial ocorre tipicamente no ponto inicial de contato entre microrganismo e hospedeiro, enquanto que a endotelial é quase que uma consequência da primeira, após a invasão tecidual do parasita ou mesmo inoculação intravascular. A interferência na adesão epitelial pode interromper ou abortar a colonização do microrganismo, enquanto que na endotelial previne a ocorrência de disseminação tecidual.

Grande número de microrganismos patogênicos pode invadir células eucarióticas e utilizar este ambiente para se multiplicar ou escapar da resposta imune do hospedeiro. Fagócitos profissionais e células normalmente não fagocíticas, como epiteliais e endoteliais, podem ser invadidos (Finlay & Falkow, 1997).

O estabelecimento da infecção disseminada pelo microrganismo e colonização de órgãos é um processo complexo que envolve etapas individuais, envolvendo aderência a células endoteliais, migração transendotelial e penetração da matriz extracelular (Booyse et al., 1975; Zink et al., 1996).

Estudos realizados com cultura de células endoteliais

\*Autor Correspondente: Juliana Leal Monteiro da Silva - Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil. E-mail: julmon@ig.com.br, Fone: 16-33016556, Fax: 16-33016547.

incubadas com *Candida albicans* demonstraram a presença de leveduras intracitoplasmáticas incluídas em vacúolos e injúria celular concomitantemente à formação de hifas. Este microrganismo pode induzir a fagocitose em células endoteliais através da polimerização dos microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto (Filler et al., 1995; Zink et al., 1996). Foi sugerido que substâncias citotóxicas secretadas pelas hifas causariam tais danos. A migração de *C. albicans* pelo endotélio tem sido considerada etapa crucial para a invasão do parênquima e estabelecimento da infecção sistêmica (Zink et al., 1996). Phan et al., (2005) observaram que apenas a forma filamentosa de *C. albicans* foi capaz de invadir células endoteliais *in vitro* induzindo sua própria endocitose. Essa endocitose não foi induzida por moléculas presentes no soro e foi parcialmente dependente da presença de cálcio extracelular. Os autores observaram que a N-caderina presente nas células endoteliais se liga às formas filamentosas da levedura e não aos blastoconídios, mostrando que a N-caderina serve como um receptor da célula endotelial que medeia a endocitose das formas filamentosas de *C. albicans*.

A internalização de conídios de fungos oportunistas como *Aspergillus fumigatus* em cultura de células endoteliais estaria também associada com o mecanismo de escape dos fagócitos assim como uma possibilidade para a disseminação (Paris et al., 1997). A participação de células epiteliais na paracoccidiodomicose pode, por outro lado, ser um ponto de transição do fungo para sua colonização e invasão tecidual.

Entre os fungos, existem várias espécies conhecidas capazes de invadir células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*, mas existem poucos estudos descrevendo o processo de invasão (Mendes-Giannini et al., 2000; Tsarfaty et al., 2000; Wasyluka & Moore, 2002; Mendes-Giannini et al., 2004).

Nosso grupo tem proposto o estudo desses mecanismos em células epiteliais e endoteliais, já que o fungo deve transpassar essas barreiras para causar a infecção disseminada. Assim, dando continuidade a esta linha de pesquisa, neste trabalho foi avaliado o comportamento de *P. brasiliensis* em monocamadas de células endoteliais, como o primeiro mecanismo de invasão tecidual.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Microrganismo:** Foi empregado o isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb) na fase leveduriforme, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FCM-USP). Durante a realização deste trabalho, o isolado foi mantido em meio de Fava Netto em estufa a 35°C e repicado a cada 3-4 dias. Para a recuperação da virulência, o isolado foi passado em monocamadas de células e reisolado em meio de Fava Netto.

**Antígeno cell-free de *P. brasiliensis*:** Este antígeno foi obtido com o isolado 18, na fase leveduriforme. Cerca de 300mg de crescimento com 3-4 dias em meio PYG foram adicionados em 1mL de tampão salina-fosfato (PBS), pH 7,4, 0,01M estéril. Esta mistura foi agitada em *vortex* por 30 segundos e centrifugada a 400 x g por 1 minuto. O

sobrenadante (antígeno *cell-free*) foi retirado, aliquoteado e armazenado a -20°C. A concentração protéica foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951) e em seguida a amostra avaliada por SDS-PAGE.

**Soro anti-cell-free de *P. brasiliensis*:** Soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis*, foi produzido à partir do antígeno *cell-free*, do isolado 18. Cerca de 0,2, 0,5, 0,7 e 1,0mL do antígeno (500 µg/mL) foram inoculados intradermicamente em coelho, intercaladas as inoculações a cada quatro dias, sendo que nas duas primeiras a suspensão foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação, uma sangria de prova foi realizada e a avaliação do título de anticorpos foi feita através da técnica de imunoblot. Em seguida, foram feitas quatro doses de reforço de 1,0 mL cada, em um intervalo de 15 dias de cada aplicação. Nova sangria de prova foi realizada e após 15 dias da última inoculação a sangria total. O anti-soro obtido foi precipitado com sulfato de amônio, aliquoteado e estocado a -70°C.

**Cultura de Células Endoteliais:** No presente estudo, células de cultura endotelial – HUVEC foram isoladas a partir da veia de cordões umbilicais humanos, segundo Jaffe et al. (1973), com aprovação pelo Comitê de Ética.

Os cordões foram coletados após o parto e mantidos em tampão PBS (NaCl 1,37 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, KCL 40 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM pH 6,5) suplementado com solução de 111mM de glicose e os antibióticos, penicilina 0,05 µg/mL, estreptomicina 0,05 µg/mL e neomicina 1µg/mL.

Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após a assepsia externa do cordão com gaze estéril, a veia foi lavada com tampão PBS-glicose, o qual foi injetado com uma seringa conectada a uma cânula para perfusão com encaixe *Lower-lock* estéril. Em seguida, colagenase tipo IV 0,1% foi inserida no cordão e estes foram incubados por uma hora a 37°C em solução salina. Após a incubação, o tampão PBS rico em glicose, foi injetado na veia com colagenase obtendo-se a suspensão celular que foi coletada em um tubo, contendo meio 199 suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina 2mM e os antibióticos, penicilina/streptomicina 2,5 UI/mL e fungisone 2,5 µg/mL. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 860 x g, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em meio 199 suplementado com 20% de SFB e antibióticos. A seguir, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, cobertas previamente com gelatina bovina 1%, na concentração de 5,0x10<sup>5</sup> células por garrafa. A cultura foi mantida em estufa umidificada a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e, pelo menos uma vez por semana, as células foram repicadas. No preparo dos subcultivos, o descolamento do tapete celular foi feito, através de tripsinização. Para isto, a monocamada celular foi lavada com 1mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz) e, após a lavagem, esta foi desprezada e acrescentado mais 1 mL de ATV. Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variáveis de meio 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Nesta

etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultura; o volume total da suspensão celular foi diluído em meio 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, e transferido para outras garrafas, de modo a se obter concentração celular de  $10^6$  cels/mL.

**Teste de infecção de *P. brasiliensis* às células endoteliais:**

Os ensaios de infecção foram realizados em placas de 24 poços, contendo no interior uma lamínula redonda (deckglaser) e para os testes, uma suspensão celular de  $3 \times 10^4$  cels/mL foi padronizada. Assim, após a tripsinização e homogeneização, 0,2 mL da suspensão celular, foi diluída em 1,8 mL de meio de cultivo 199. A contagem das células foi realizada em hemocitômetro, para que, através de diluições adequadas, a concentração desejada fosse ajustada. Ao término desta etapa, 0,5 mL dessa suspensão de células foi dispensada em cada orifício da placa e estas incubadas a  $36,5^\circ\text{C}$  por 24 horas, até confluência da monocamada celular sobre a lamínula, sendo, a partir daí, utilizada para os testes de adesão e invasão.

**Preparo e padronização do inóculo de *P. brasiliensis*:** *P. brasiliensis* (Pb 18) foi cultivado em meio PYG (Peptona-Extrato de levedura-Glicose) durante três dias, a  $35^\circ\text{C}$ . Quantidade suficiente do fungo foi adicionada a um volume de 10 mL de PBS estéril, para obtenção de suspensão turva, homogênea, correspondente a  $1 \times 10^5$  cels/mL, de acordo com a escala de McFarland e ajustada também através de leitura em espectrofotômetro ( $D.O_{550\text{nm}} = 0,5$ ).

Após a formação do tapete celular sobre as lamínulas contidas na placa de 24 orifícios, por aproximadamente 24h, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as células lavadas por três vezes com um mL cada de PBS 0,05 M, pH 7,2 estéril. Em seguida, cada poço foi inoculado com 300  $\mu\text{L}$  da suspensão padronizada de *P. brasiliensis* em PBS acrescida de 300  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo. A seguir, as células infectadas foram incubadas em estufa a  $36,5^\circ\text{C}$ , em diferentes períodos de tempo.

**Períodos de infecção:** As células foram submetidas a infecção nos períodos de 5, 10, 20 e 30 minutos, bem como 1, 2, 3, 5, 8 e 24 horas. Em todos os testes foram feitos controles de células não infectadas.

Após o período de infecção, as células foram lavadas cinco vezes com PBS 0,05 M pH 7,2, eliminando-se, desta forma, células fúngicas não aderentes às culturas celulares. As células infectadas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por um período de duas horas a temperatura ambiente.

Após o tempo de fixação das células, as lamínulas foram lavadas cinco vezes com PBS 0,05 M, pH 7,2, secas a temperatura ambiente e coradas pelo lactofenol azul algodão.

**Avaliação do processo de adesão e invasão:** Após obtenção das células endoteliais dos cordões umbilicais e infecção da monocamada com *P. brasiliensis*, várias técnicas foram realizadas no intuito de detectar o parasitismo do fungo. As lamínulas, infectadas nos diferentes períodos de tempo, foram coradas com lactofenol azul algodão e analisadas através de microscopia ótica comum. Também foi realizada técnica de imunoperoxidase *in situ* nessas lamínulas, utilizando anticorpo específico (anti-*cell-free* de *P.*

*brasiliensis*) para facilitar a marcação do fungo no tapete celular.

Devido à grande dificuldade de se encontrar o fungo nas células endoteliais em monocamada, outra metodologia foi desenvolvida, na qual infecção de *P. brasiliensis* foi feita diretamente nos cordões umbilicais por diferentes períodos de tempo, e estes incluídos em parafina para a obtenção de cortes do material, como descrito a seguir.

**Infecção dos cordões umbilicais com *P. brasiliensis*:** Os cordões foram obtidos e preparados adequadamente antes da infecção para a retirada do excesso de sangue. Em condições de assepsia, os cordões foram limpos com gaze estéril por dentro e por fora, e em seguida passado no seu interior 40 mL do tampão cordão (PBS + glicose + antibióticos). As duas extremidades dos cordões foram cortadas e um dos lados canulados. Foi preparada uma suspensão de *P. brasiliensis* (Pb 18) em PBS estéril correspondente a escala três de Mc Farland, e adicionada até preencher todo o volume dos cordões umbilicais. A outra extremidade foi canulada e os cordões incubados a  $37^\circ\text{C}$  em banho-maria por períodos de três e cinco horas. Após esses períodos os cordões foram lavados com PBS (3 vezes) e fixados em paraformaldeído 4% durante 24 horas.

**Inclusão, microtomia e desparafinização:** Os cordões fixados foram devidamente desidratados em bateria de álcoois para posterior inclusão em parafina. Cortes histológicos de três e cinco  $\mu\text{m}$  foram realizados, colocados sobre lâminas e submetidos a desparafinização. As lâminas foram deixadas em água até o momento de corar para não desidratar os cortes. Os cortes foram submetidos a coloração pelo H.E. (Hematoxilina-eosina) e May Grünwald-Giemsa e observados em microscopia ótica comum.

**Reação de imunoperoxidase *in situ*:** Os cortes primeiramente sofreram digestão enzimática com proteinase K (25  $\mu\text{g/mL}$ ) em Tris-HCl 0,05 M e cloreto de cálcio 20 mM, pH 8,0 por três minutos a  $37^\circ\text{C}$  no escuro. As lâminas foram colocadas em PBS e em seguida incubadas com soro normal de coelho (diluído a 1:40 em PBS) por uma hora a  $37^\circ\text{C}$  em câmara úmida, para o bloqueio de reações inespecíficas. As lâminas foram lavadas em PBS por três vezes sob agitação. Na etapa seguinte, incubação foi feita com o anticorpo primário anti *cell-free* de *P. brasiliensis* 18, diluído 1:100 em PBS e BSA 1% por uma hora.

As lâminas foram submetidas a três lavagens sucessivas de cinco minutos cada em PBS sob agitação e posterior incubação com o anticorpo monoclonal anti IgG de coelho biotilado diluído 1:200, em tampão PBS, por uma hora em câmara úmida a  $37^\circ\text{C}$ . Ao término do período de incubação, as lâminas foram lavadas novamente por três vezes de cinco minutos cada em PBS e subsequente incubação com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (DAKO) a 2  $\mu\text{g/mL}$  em PBS, em câmara úmida a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Novas lavagens foram feitas em PBS e em seguida as lâminas foram submetidas à revelação com diaminobenzidina (DAB) 0,005g em 30 mL de PBS e 150  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) até a observação de uma leve tonalidade castanha. A reação foi bloqueada,

usando água, e em seguida, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Mayer por um minuto, passando posteriormente em água amoniacal por cinco segundos e depois algumas vezes em água de torneira. As lâminas foram secas, desidratadas, clarificadas em bateria de álcoois e xilol montadas em *permount* (SIGMA), observadas em microscópio e documentadas. Os controles negativos foram feitos substituindo os anticorpos primários por tampão fosfato.

**Ensaio de migração de *P. brasiliensis* através da monocamada de células endoteliais :** A migração de fungos patogênicos através da camada de células endoteliais é considerada pré-requisito para a invasão de múltiplos órgãos e disseminação das doenças. Neste estudo, foi utilizado sistema experimental (Zink et al., 1996), no qual a monocamada confluenta das células endoteliais (HUVEC) foi crescida, utilizando-se placas de 24 orifícios com filtros de policarbonatos inseridos. Poros de 8,0 µm foram utilizados, que permitem a passagem do fungo e impedem a passagem das células, promovendo então a formação da monocamada confluenta de células endoteliais. Esses poros separavam o compartimento luminal do subluminal, onde estava contido o meio de cultivo 199. No ensaio, as células foram plaqueadas em concentração de  $8,0 \times 10^4$  cel/ml em meio 199. Em seguida, foram incubadas a 37°C até a confluência por 24 horas. O compartimento subluminal foi inoculado com 1,5 mL da suspensão padronizada de *P. brasiliensis* contendo  $2,0 \times 10^6$  cel/mL e incubados a 37°C em diferentes períodos (30 minutos, 1, 3, 5, 8, 24 e 48 horas). Ao final de cada período de incubação, o meio abluminal foi recolhido e plaqueado em meio PYG acrescido de 4% de soro fetal bovino (SFB) para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. brasiliensis* caso estivesse presente. O aparecimento de células leveduriformes no compartimento subluminal foi monitorado pela contagem de células viáveis no meio de cultura. Como controle positivo de crescimento, a quantidade de fungos adicionada em cada poço no início do experimento, foi plaqueada e contado o número de UFCs. Os poços sem a monocamada de células endoteliais foram utilizados como controle negativo.

## RESULTADOS

A obtenção das células endoteliais foi realizada sem muita dificuldade, apenas algumas vezes foi difícil conseguir número de cordões suficientes para se obter boa quantidade de células para os experimentos. Outra dificuldade encontrada foi no tempo de manutenção dessa linhagem que era muito curto, possibilitando repiques por duas vezes apenas, sem que o tapete se mostrasse morfologicamente alterado.

### Ensaio de adesão e invasão de *P. brasiliensis* às células endoteliais

A Figura 1A mostra o tapete de células HUVEC não infectado com *P. brasiliensis*, corado pelo lactofenol azul algodão para visualização da morfologia das células endoteliais.

Quantidade muito pequena de células de *P. brasiliensis* aderiram ao tapete de células endoteliais. Em relação ao processo de invasão também houve grande dificuldade de se encontrar *P. brasiliensis* no tapete celular nos períodos de tempo padronizados. Ensaio de adesão, em períodos que variaram de cinco minutos até 24 horas, foram feitos adicionalmente, para se ter certeza do tempo necessário para que a adesão ocorresse. Mesmo assim, poucas células fúngicas foram encontradas (Figura 1 B) e na maioria das vezes, apenas a presença de um orifício parecendo ser o local de passagem do fungo. Talvez, *P. brasiliensis* transpasse a barreira endotelial muito rapidamente dificultando sua detecção em modelos *in vitro*.

### Reação de imunoperoxidase *in situ*

Devido à grande dificuldade, de se observar o fungo no tapete celular, foi desenvolvida a metodologia de imunoperoxidase *in situ*, utilizando o soro anti *cell-free*, específico para *P. brasiliensis*. Poucos fungos foram observados no tapete celular e quando ocorria marcação, esta foi apenas no local, onde provavelmente o fungo havia passado e deixado seus antígenos superficiais (Figuras 2 A e B).

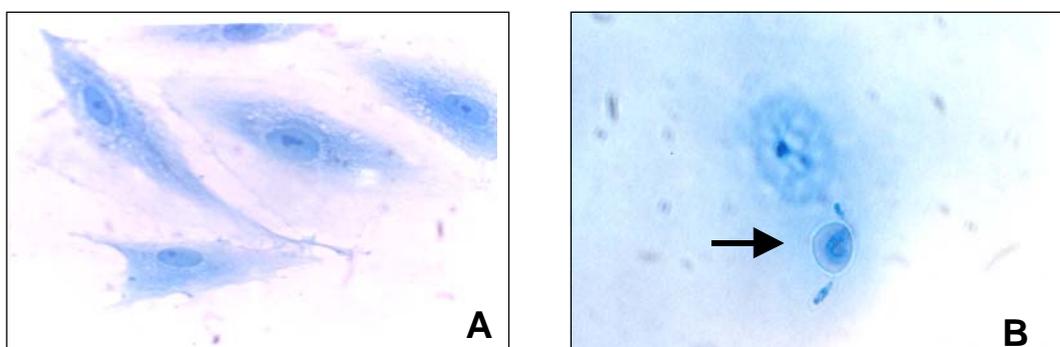


Figura 1 - Tapete de células endoteliais (HUVEC) corado pelo lactofenol azul algodão. A: células não infectadas após 24 horas de cultivo; B: infecção com *P. brasiliensis* após 5 horas. A seta mostra *P. brasiliensis* aderido à célula endotelial. Aumento de 1000x.

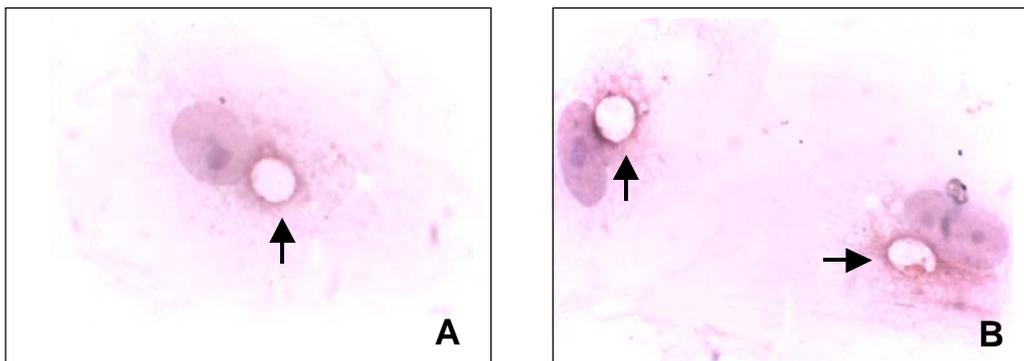


Figura 2 - Reação de imunoperoxidase *in situ* de *P. brasiliensis*, (Pb 18) e células HUVEC, após 3 horas de infecção, mostrando a marcação de seus antígenos, quando revelado pelo soro anti *cell-free*. A setas mostram *P. brasiliensis* aderido à célula endotelial. Aumento de 1000x.

### Cortes histológicos dos cordões umbilicais incluídos em parafina

A infecção nos cordões umbilicais foi desenvolvida para verificar a interação de *P. brasiliensis* com as células endoteliais. Após a infecção com *P. brasiliensis* durante cinco horas, cortes histológicos foram realizados, não sendo possível a observação do fungo. Entretanto, foi possível localizar o fungo em alguns locais do corte histológico, após a revelação pela técnica de imunoperoxidase *in situ* com anticorpo específico anti *cell-free* de *P. brasiliensis*, como mostrado na Figura 3.

### Migração de *P. brasiliensis* através da monocamada de células endoteliais

Este experimento foi realizado utilizando poços com e sem a monocamada de células endoteliais. Nos poços sem as células, a migração foi maior, ou seja, houve maior número de fungos crescidos no meio de cultivo (UFC) recolhido do lado subluminal da placa, nos diferentes períodos de tempo (Figura 4).



Figura 3 - Imunoperoxidase *in situ* dos cordões umbilicais infectados com *P. brasiliensis* por 5 horas. A seta mostra *P. brasiliensis*. Aumento de 1000x.

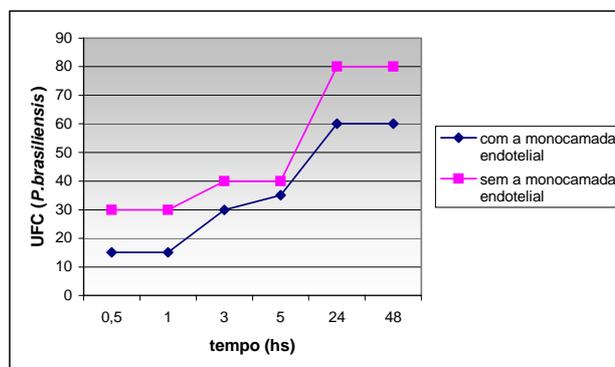


Figura 4 - Gráfico mostrando a migração de *P. brasiliensis* através da monocamada de células endoteliais, em UFCs e em função do tempo de incubação.

Em nenhum dos experimentos e períodos de tempo houve tanto crescimento como no controle positivo. A Figura 4 apresenta os valores obtidos, mostrando que mesmo com a monocamada presente nos poços, houve migração dos fungos para o compartimento subluminal, mas em quantidades menores. A redução foi variável no decorrer do tempo, ficando estável após 24 horas. Assim, a monocamada não foi impeditiva para o fungo, apenas retardou o processo, sendo este capaz de migrar através dessas células. Estes resultados corroboram os obtidos anteriormente neste estudo, pois a migração do fungo pela monocamada endotelial foi aumentando de maneira proporcional ao tempo de infecção.

### DISCUSSÃO

*P. brasiliensis*, como outros patógenos (Sebghati et al., 2000), é capaz de penetrar mucosas, principalmente dos pulmões, alcançando o interior de células eucarióticas, ou invadindo tecidos para posterior colonização e crescimento (Franco et al., 1989; Lenzi et al., 2000). Estudos anteriores demonstraram que células leveduriformes de *P. brasiliensis* têm a capacidade de aderir e invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (Mendes-Giannini et al., 1994;

Mendes-Giannini et al., 2000; Tuder et al., 1985) e esse fenômeno de adesão foi variável, dependendo do isolado (Hanna et al., 2000).

A adesão de células de *P. brasiliensis* aos tecidos do hospedeiro deve ser um dos passos cruciais no estabelecimento da paracoccidioidomicose. Entretanto, pouco é conhecido como este mecanismo ocorre *in vivo*. A habilidade do fungo em aderir às células epiteliais pode representar um mecanismo, no qual o fungo evitaria o muco que recobre os ductos respiratórios e o movimento das células ciliares, tendo então papel na patogênese. Por outro lado, o arsenal microbicida da célula epitelial é relativamente fraco, quando comparado com macrófagos e outros fagócitos, assim o fungo internalizado poderia continuar viável no citoplasma, funcionando como um mecanismo de escape. Durante o desenvolvimento de infecções fúngicas sistêmicas, é de extrema importância que os patógenos sejam capazes de romper barreiras impostas pelo hospedeiro, constituídas por células epiteliais, endoteliais e suas lâminas basais. Para transpassar essas barreiras, muitos microrganismos patogênicos, incluindo fungos, possuem habilidade de aderir a esses substratos.

Nesse trabalho, foi investigada a adesão de *P. brasiliensis* às células endoteliais *in vitro*, pressupondo a existência de um segundo mecanismo que o fungo possuiria, antes de se disseminar via corrente sanguínea. Dados da literatura já haviam demonstrado que células endoteliais, embora não sejam fagócitos profissionais, possuem similaridade com macrófagos. Com estímulo apropriado, estas células são capazes de expressar antígenos de histocompatibilidade de classe II (Ryan, 1988), e produzir moléculas reativas do oxigênio (Matsubara & Zif, 1989; Rosen & Freeman, 1989). As células endoteliais também produzem óxido nítrico, a principal molécula citotóxica de macrófagos murinos, contra uma variedade de microrganismos (Oswald et al., 1994). Contudo, essas células não são tão eficientes em matar o microrganismo uma vez que este se encontra em seu interior.

Em nossos experimentos com células endoteliais, houve grande dificuldade de se encontrar *P. brasiliensis* aderido ao tapete celular, nos períodos de tempo padronizados. Experimentos adicionais foram utilizados para os ensaios de adesão, mesmo assim, poucas células fúngicas foram encontradas e na maioria das vezes, foi verificada a presença de um orifício, parecendo ser o local de passagem do fungo. Em função da grande dificuldade de se observar o fungo no tapete celular, foi desenvolvido no presente estudo o teste de imunoperoxidase *in situ*, com soro anti *cell-free* de *P. brasiliensis*. Mesmo com esta metodologia, poucos fungos foram observados no tapete celular e quando ocorria marcação pelo anticorpo, esta era apenas no local, onde provavelmente o fungo havia passado e deixado seus antígenos superficiais. Sugere-se com esses resultados que o fungo poderia atravessar as células de uma maneira muito rápida, não sendo possível detectar através do cultivo celular. Para detectar com maior facilidade o fungo presente no tecido, foi desenvolvida uma outra

metodologia, incluindo os cordões umbilicais em parafina, mas mesmo assim a visualização deste foi muito difícil. Por outro lado, a internalização de *A. fumigatus* em células endoteliais tem sido associada com o mecanismo de escape de fagócitos, bem como a possibilidade de disseminação (Paris et al., 1997). Lopes-Bezerra & Filler (2004) investigaram a interação de conídios e hifas de *A. fumigatus* com células endoteliais *in vitro* e encontraram que ambas as formas do fungo induziram o rearranjo de microfilamentos e subsequente endocitose, sugerindo que a angioinvasão e trombose deve ser em parte devido à invasão endotelial.

A migração de fungos patogênicos através da camada de células endoteliais é considerada pré-requisito para a invasão de múltiplos órgãos e sua disseminação (Fratti et al., 1998). Para verificarmos se *P. brasiliensis* teria esta capacidade, foi padronizado experimento de migração de *P. brasiliensis* através da monocamada de células endoteliais. Nossos resultados mostraram que nos poços sem as células endoteliais, a migração de *P. brasiliensis* foi maior (100%), ou seja, houve maior número de células leveduriformes (UFC) no lado subluminal, nos tempos iniciais, e semelhante em cinco horas quando comparado ao poço com células. A partir deste ponto, o fungo cresceu exponencialmente, mantendo uma diferença de aproximadamente 30% entre as UFCs. Estes resultados sugerem que *P. brasiliensis* teria capacidade de atravessar as células endoteliais e provavelmente invadir vasos sanguíneos. Alguns fungos passam através da monocamada de células endoteliais, mas provavelmente tornam-se inviáveis, não conseguindo crescer no meio de cultivo, quando passaram para o lado subluminal (Zink et al., 1996).

Assim, com o presente estudo o conhecimento da interação fungo-célula hospedeira, poderá servir para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e futuramente no desenvolvimento de novas estratégias para conter a infecção fúngica.

## AGRADECIMENTOS

Trabalho realizado com o apoio financeiro da Fapesp (processo n.02/07306-3) e CNPq (processo n.476595/03-7).

## ABSTRACT

*Interaction of Paracoccidioides brasiliensis with endothelial cells*

**Paracoccidioidomycosis has a variety of clinical manifestations and *Paracoccidioides brasiliensis*, the causative agent, may infect many tissues, most importantly the lungs. Migration of pathogenic yeasts to the endothelial cell layer is considered a prerequisite for multiple organ invasion and dissemination of the fungus. In this study of the adhesion of *P. brasiliensis* to endothelial cells *in vitro*, we investigated whether this**

**adhesion could represent a mechanism of dissemination. To this end, as well as using conventional optical microscopy, an alternative *in vivo* technique was developed, to detect the presence of fungal cells in umbilical cords embedded in paraffin wax. An experiment on the migration of *P. brasiliensis* through an endothelial cell monolayer was carried out, and the migration of yeast cells was greater, and took less time, in control wells with no cells. The fungus crossed the monolayer, but, compared to control wells, the migration-rate was about 30% lower. This shows that the monolayer only partially blocked migration of the fungus. In these experiments, we had great difficulty finding *P. brasiliensis* adhered to the cell monolayer, when it was examined at different times, suggesting that migration of the fungus across the endothelial layer is very fast, and cannot normally be observed in cell culture *in vitro*. Thus, *P. brasiliensis* can cross the endothelium rapidly and probably invades deeper tissue.**

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*, endothelial cells, migration.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailão AM, Soares CMA, Benard G, Soares CP, Mendes-Giannini MJS. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 2005; 7: 875-81.
- Booyse FM, Sedlack BJ, Rafelson ME JR. Culture of arterial endothelial cells. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 31: 825-39.
- Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. *Mycopathologia* 1990; 109:13-8.
- Filler SG, Swerdloff JN, Hobbs C, Luckett P. M. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 3: 976-83.
- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 136-69.
- Franco MF, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezzallah-Wasso M, Montenegro MR. *Clinical tropical medicine and communicable disease*. Paracoccidioidomycosis. London: Bailliere's; 1989. p. 18-196.
- Fratti RA, Ghannoum MA, Edwards JE Jr, Filler SG. Gamma interferon protects endothelial cells from damage by *Candida albicans* by inhibiting endothelial cell phagocytosis. *Infect Immun* 1998; 64: 4714-8.
- Goosney DL, Gruenheid S, Finlay BB. Gut feelings: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 16: 173-89.
- Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Mendes-Giannini MJS. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect* 2000; 1-8.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Ninick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745-56.
- Kashino SS, Calich VL, Burger E, Singer-Vermes LM. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia* 1985; 92: 173-8.
- Lenzi HL, Calich VLG, Mendes-Giannini MJS, Xidieh CF, Miyaji M, Mota EM, Machado MP, Restrepo A. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol* 2000; 38(1): 115-9.
- Lopes-Bezerra LM, Filler SG. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. *Blood* 2004; 103: 2143-9.
- Lowry DH, Rosebrough NJ, Fan L, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- Matsubara T, Ziff H. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1989; 137: 3295-8.
- Mendes-Giannini MJS, Ricci LC, Uemura MA, Toscano E, Arns CW. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 189-97.
- Mendes-Giannini MJS, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VLG, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 2000; 38: 113-23.
- Mendes-Giannini MJS, Hanna AS, Monteiro da Silva JL, Andreotti PF, Benard G, Lenzi H L, Soares CP. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* 2004; 6: 882-91.
- Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1994; 108: 11-8.
- Paris S, Boisvieux-Ulrich E, Crestani B, Houcine O, Taramelli D, Lombardi L, Latgé JP. Internalization of

*P. brasiliensis* e células endoteliais

- Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect Immun* 1997; 4: 1510-4.
- Phan QT, Fratti RA, Prasadarao NV, Edwards JE, Filler SG. N-cadherin mediates endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. *J Biol Chem* 2005; 280:10455-61.
- Rosen GM, Freeman BA. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 81: 7269-73.
- Ryan US. Phagocytic properties of endothelial cells. In: Ryan US, ed. Endothelial cells. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 33-49.
- Sebghati TS, Engle JT, Goldman WE. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science* 2000; 290: 1368-72.
- Tsarfaty I, Sandovsky-Losica H, Mittelman L, Berdicevsky I, Segal E. Cellular actin is affected by interaction with *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 189: 225-32.
- Tuder RM, El Ibrahim R, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1985; 92: 179-88.
- Wasylnka JA, Moore MM. Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun* 2002; 70: 3156-63.
- Zink S, Thorsten NA, Rosen P, Ernst F. Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers. *Infect Immun* 1996; 12: 5085-91.