

ULTRAESTRUTURA DO PARACOCIDIÓIDES BRASILIENSIS II — NA FASE LEVEDURIFORME (*)

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 leveduriforme, dando-se ênfase ao envoltório celular encontrado nesta fase: na fase leveduriforme, aparentemente não ocorre membrana basal, estrutura facilmente identificável na fase filamentosa; a parede celular é pouco eletrônica e não apresenta aspecto laminado tal como observado na fase filamentosa e a membrana plasmática é de fácil identificação. O microrganismo na fase leveduriforme é unicelular e apresenta núcleos, cromatina e nucléolos bem evidentes. Sua divisão se processa por brotamentos, sendo as gêmulas facilmente identificáveis pela microscopia eletrônica.

I N T R O D U Ç Ã O

No trabalho anterior sobre a ultraestrutura do *Paracoccidioides brasiliensis* na fase filamentosa em cultura, os Autores chamam a atenção para o pequeno número de trabalhos brasileiros^{6,7} e venezuelanos¹⁻⁵ dedicados ao assunto. O objetivo do presente trabalho é mostrar as diferenças ultraestruturais observadas no envoltório celular e no núcleo do microrganismo durante as duas fases do seu ciclo dimórfico, ou seja, a fase leveduriforme e a fase filamentosa.

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. As formas filamentosas obtidas com o cultivo à temperatura ambiente foram pre-

paradas convenientemente e examinadas ao microscópio eletrônico, resultando daí as observações contidas no trabalho anterior que trata da ultraestrutura do *P. brasiliensis* na fase filamentosa. Em seguida, parte da cultura foi novamente colocada à temperatura de 37°C em ágar-Sabouraud-sangue quando então se desenvolveram novas formas leveduriformes. O material foi colhido e imerso em glutaraldeído a 2% com tampão cacodilato 0,15M. Após duas horas de pré-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 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

(*) 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

grades de cobre, coradas com citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico Philips EM 300.

RESULTADOS

Ao contrário do que se observa na fase filamentosa, na fase leveduriforme o microrganismo é unicelular e seu envoltório celular cha-

ma atenção por possuir parede celular pouco eletrônica densa cuja superfície de corte apresenta aspecto uniforme (Figs. 2 e 7) e, a exemplo da fase filamentosa, poros também não são observados nesta estrutura, nesta fase. Nesta fase, ainda, os limites de separação entre o citoplasma e a parede celular são nítidos e a identificação da membrana plasmática é fácil (Fig. 1). Por sua vez, membrana basal típica,

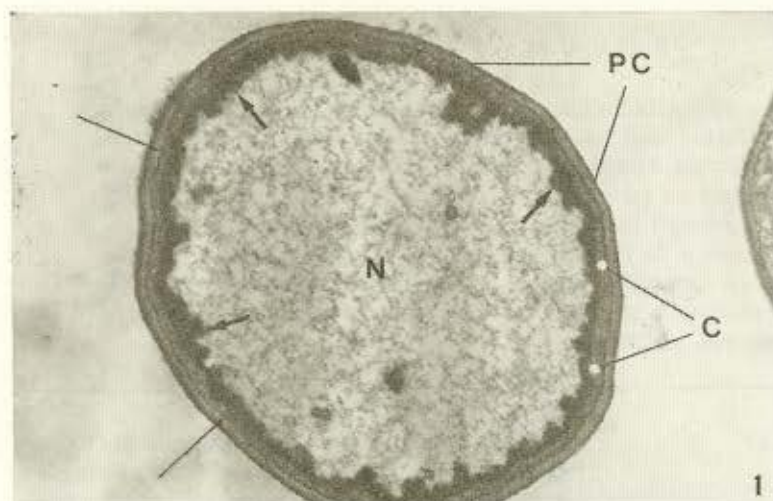


Fig. 1 — Corte de um fungo mostrando parede celular (PC), membrana plasmática (setas finas) e o núcleo (N) que ocupa quase a totalidade do interior da célula. O citoplasma (C) está reduzido a uma pequena porção marginal que circunda o núcleo. O nucleoplasma é claro e a cromatina (setas grossas) encontra-se acolada ao envelope nuclear. 39.000 \times

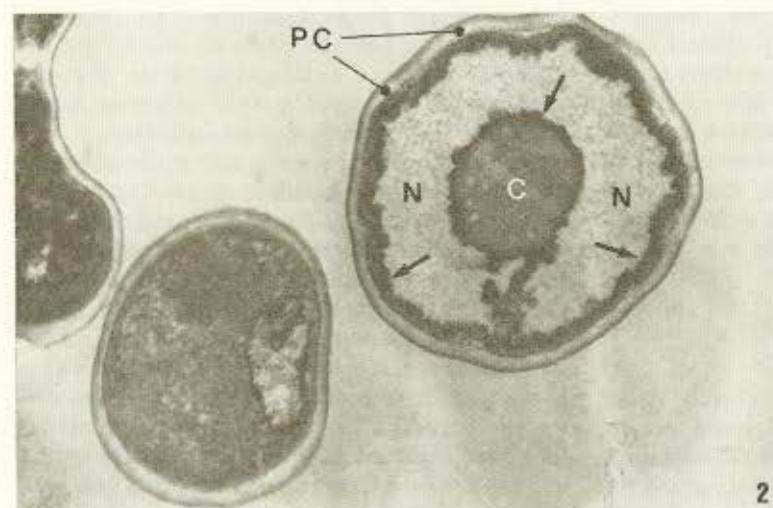


Fig. 2 — A direita aparece o corte de uma célula mostrando uma porção central de citoplasma (C). O restante do interior celular é quase que totalmente preenchido pelo núcleo (N) cuja cromatina (setas) encontra-se acolada ao envelope nuclear. A parede celular (PC) é pouco eletrônica densa. 30.000 \times

como observada na fase filamentosa, não foi visualizada nos microrganismos examinados. Na fase leveduriforme, o citoplasma apresenta características de granulação fina onde mitocôndrias são observadas em pequeno número e o retículo endoplasmático está raramente presente. O núcleo é bastante característico e facilmente identificável. O nucleoplasma é claro

e nele às vezes são observadas massas homogêneas de cromatina constituindo os nucléolos ou, então, granulações finas de cromatina dispersas no interior do núcleo ou ainda acoladas à parede interna do envelope nuclear (Figs. 1, 3, 6, 8 e 9).

Nos vários campos examinados foram observados núcleos ocupando quase que a totali-

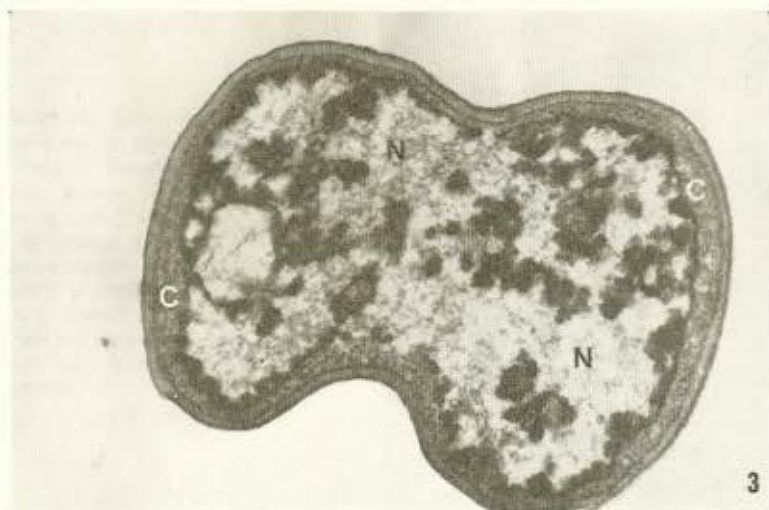


Fig. 3 — Neste corte observa-se diminuição do calibre da célula ao nível de sua porção medial. O núcleo (N) ocupa a maior parte do interior da célula e condensações pequenas de material bastante eletrôn denso que representa a cromatina são observados no nucleoplasma. C = citoplasma. 39.000 \times

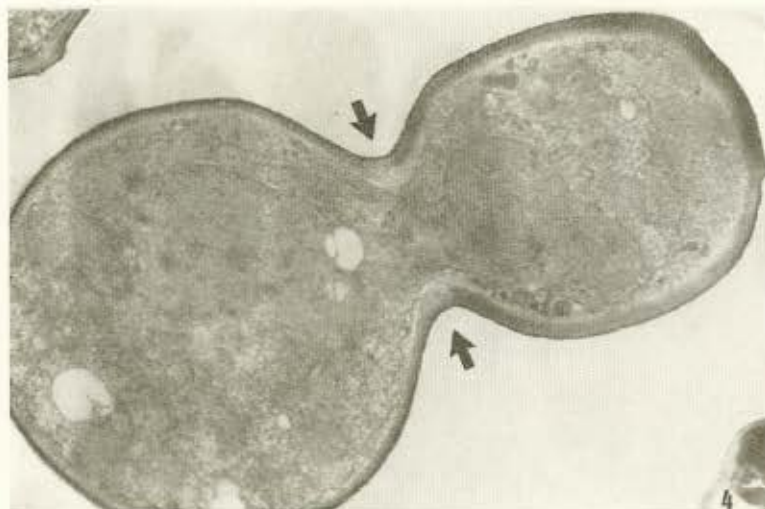


Fig. 4 — Corte de um microrganismo mostrando diminuição do calibre celular (setas) em sua porção medial, por aproximação dos segmentos opostos da parede celular. 30.000 \times

dade da superfície da célula, contendo fina camada de cromatina acolada à parte interna do envelope nuclear.

Ocasionalmente, nestas células ocorrem formações anulares de material cromático que se posicionam nos extremos diametralmente opostos do núcleo. Nestas células, ainda, às vezes são observadas finas membranas, com uma condensação em sua parte medial, as quais parecem separar o núcleo em dois compartimentos distintos (Fig. 5). Formações anulares de material cromático são também às vezes observadas na parte central do microrganismo dando a impressão de célula em alvo (Fig. 2).

Freqüentemente, são visualizados microrganismos com estreitamento do citoplasma e respectivas membranas nos quais se percebe nítida

da distribuição equitativa do núcleo e da cromatina contida no interior do mesmo para ambas as porções originárias de tais estreitamentos (Figs. 3 e 4). Além disso, são constantes as presenças de células interligadas entre si pela íntima aposição de suas paredes celulares. Algumas vezes, uma ou outra destas células interligadas não apresentam conteúdo citoplasmático normal: apenas restos membranosos e substâncias de natureza amorfa são visualizadas dentro da parede celular (Fig. 10).

DISCUSSÃO

Quando observado pela microscopia eletrônica na fase leveduriforme, o *P. brasiliensis* apresenta aspectos morfológicos bastante distintos daqueles observados na fase filamentosa.

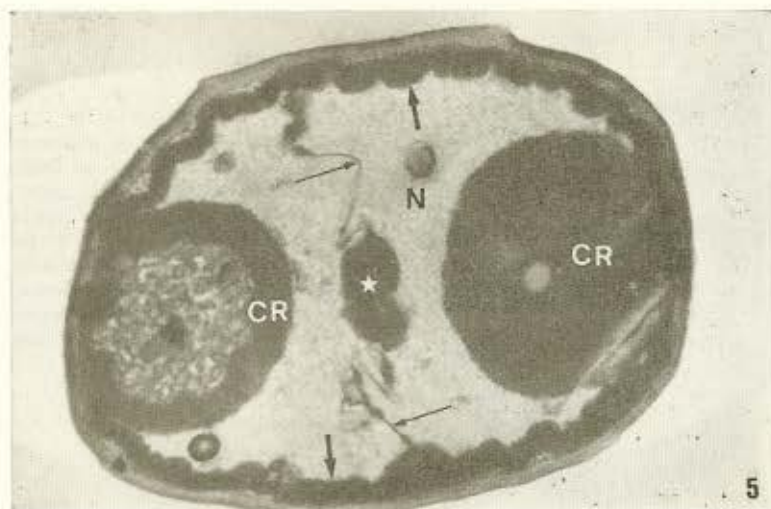


Fig. 5 — Neste corte observa-se a cromatina acolada ao envelope nuclear (setas grossas) e formações circulares de material cromático localizadas em polos opostos (CR). No centro, observa-se estrutura membranosa (setas finas) que atravessa a célula de um lado a outro e que possui uma condensação de material eletrôn denso (*) em sua parte medial. N = núcleo. 39.000 \times .

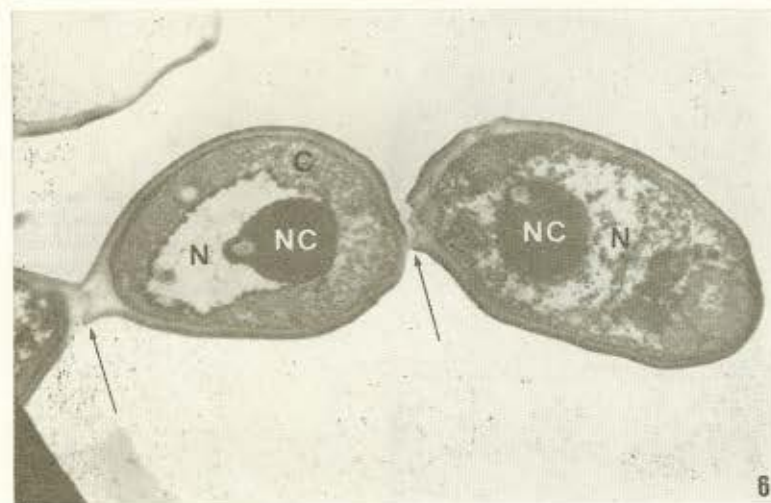


Fig. 6 — Células filhas ainda intimamente relacionadas por justaposição das paredes celulares (setas). No interior dos núcleos (N) são observados nucléolos (NC) bem evidentes. C = citoplasma. 20.000 \times .

sa. Como já foi abordado no trabalho anterior que focaliza a ultraestrutura do *P. brasiliensis* na fase filamentosa, a característica anatômica mais marcante daquela fase é o conjunto de membranas constituintes do envoltório celular, ou seja, as membranas plasmática e basal e a parede celular. Na fase leveduriforme, contudo, o envoltório celular mostra características bem distintas: ao contrário do que se observa na fase filamentosa, na fase leveduriforme a parede celular é pouco ou quase nada eletrônica densa, seu aspecto é claro e sem a aparente laminação observada na parede celular do *P. brasiliensis* na fase filamentosa. Ainda em relação a esta estrutura, o presente estudo não revelou a presença de poros de qualquer natureza. Membrana basal nítida, como observada na fase filamentosa, não foi identificada nos

microrganismos da fase leveduriforme quer isolados, em vias de divisão ou mesmo naqueles microrganismos cujo processo de divisão celular já fora completado, mas cujas células filhas se encontram ainda unidas entre si através da íntima aposição de suas paredes celulares. A membrana plasmática, por sua vez, pode ser identificada em qualquer período da fase leveduriforme do microrganismo. Estas diferenças do envoltório celular observadas durante as duas fases, filamentosa e leveduriforme, devem ser de grande importância para ciclo evolutivo do microrganismo e elas devem ter relação com a manutenção da patogenicidade do fungo. Contudo, comprovação destes fatos só seria possível através de estudos posteriores com aplicação de outra metodologia científica. Outra grande diferença que se observa

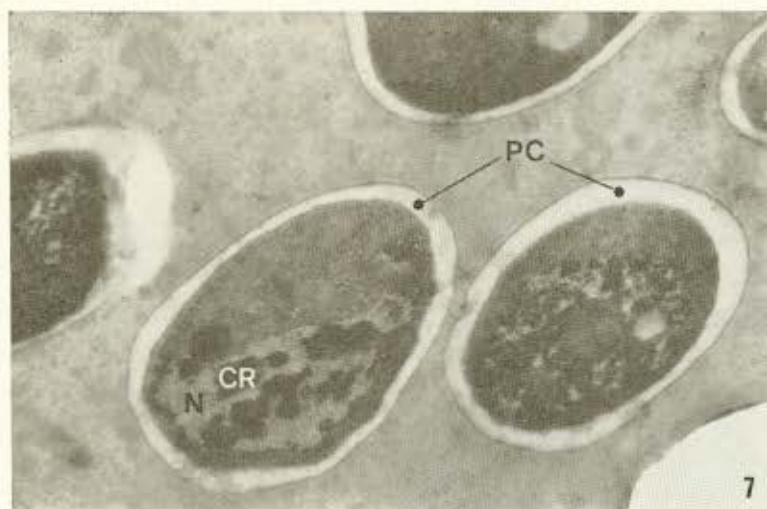


Fig. 7 — Na célula da esquerda observa-se núcleo (N) com condensações de cromatina (CR) dispersas pelo nucleoplasma. As paredes celulares (PC) são claras. 39.000 \times

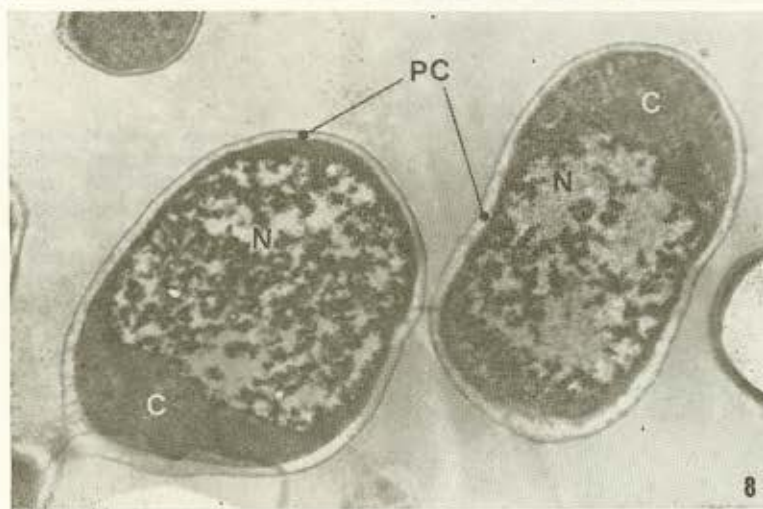


Fig. 8 — Células filhas com núcleos (N) contendo fina cromatina dispersa pelo nucleoplasma. C = citoplasma; PC = parede celular. 23.000 \times

entre as duas fases do ciclo dimórfico do *P. brasiliensis* refere-se ao núcleo. Na fase filamentosa, os núcleos das células que formam as hifas apresentam contornos pouco nítidos, de difícil visualização. A cromatina, bastante fina, apresenta-se dispersa no nucleoplasma e nucléolos não são observados. Na fase leveduriforme, contudo, os núcleos são bem evidentes e na maioria das vezes ocupam a maior parte do citoplasma do microrganismo que nesta fase é unicelular. O envelope nuclear apresenta-se com limites nítidos e bem definidos. A cromatina, bastante eletrônica densa, apresenta-se ora dispersa no nucleoplasma em forma de pequenas condensações de material cromático, ora distribuída periféricamente acolada ao envelope nuclear. Na fase leveduriforme, ainda, nucléolos são bastante comuns e facilmente identifi-

cáveis. Células com estreitamento citoplasmático em suas porções mediais são comuns e isto poderia significar o início da gemulação. Nas fases iniciais deste processo de estreitamento nota-se distribuição uniforme e equitativa, do citoplasma, do núcleo e da cromatina para ambas as porções do microrganismo em fase de gemulação. Em fases mais avançadas, porções mais eletrônicas densas são observadas na porção medial e, posteriormente, ocorrendo a separação definitiva das porções distais, células filhas são observadas com íntima aposição de suas paredes celulares (Figs. 6 e 9). O afastamento definitivo das células filhas quase idênticas, mas que ainda guardam certa proximidade entre si dando a característica "imagem em espelho", é o processo seguinte que caracteriza o ciclo final da divisão do *P. brasiliensis* na fase

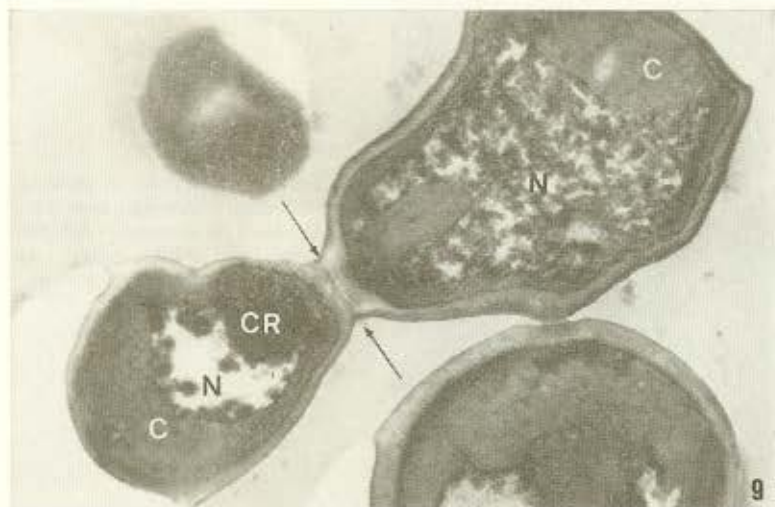


Fig. 9 — Células filhas ainda intimamente relacionadas por justaposição das paredes celulares (setas). C = citoplasma; CR = cromatina; N = núcleo. 39.000 ×

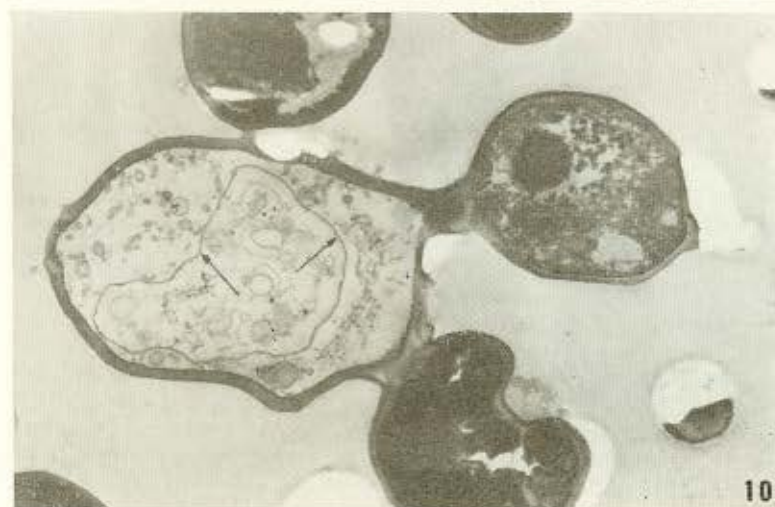


Fig. 10 — Neste corte são observados pelo menos três células intimamente relacionadas entre si por justaposição das paredes celulares. Na célula do meio, não são identificados os elementos normais do citoplasma e do núcleo. Apenas restos membranosos (setas) e substância de natureza amorfa podem ser vistos. 19.000 ×

leveduriforme (Figs. 7 e 8). Cada nova célula formada é ainda potencialmente a fonte de novas e sucessivas divisões para a manutenção do ciclo vital do microrganismo.

SUMMARY

Ultrastructure of *Paracoccidioides brasiliensis* in the yeast phase

Paracoccidioides brasiliensis in the yeast phase obtained from culture at 37°C was studied by electron microscopy. During the yeast phase the fungus has a well defined cellular wall which is considerably less electron dense than the cellular wall observed in the fungus during the mycelial phase. Yet in the yeast phase basement membrane is not seen and the plasma membrane is as well defined structure.

In the yeast phase the nucleus has a clear nuclear envelope, its chromatin is easily identified and nucleolei are frequently seen. In the various fields examined there frequently occurred cells having a constriction in their medial partion. In these cells the nucleus and its chromatin appear equally distributed in both partion of the cell. Later, each partion of the cell become individualised and the daughter cells are seen keeping close proximity by apposition of their cellular wall. Finally, there occurs separation of the daughter cells and each cell resulting from this process of division will eventually be a source of new divisions.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CARBONELL, L. M. & POLLAK, L. — Ultraestructura del *Paracoccidioides brasiliensis* en cultivos de la fase

- levaduriforme. *Mycopathologia* (Den Haag) 19: 184-204, 1963.
2. CARBONELL, L. M. & RODRIGUEZ, J. — Transformation on mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. *J. Bact.* 90: 504-510, 1965.
 3. CARBONELL, L. M. — Cell wall changes during the budding process of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitides*. *J. Bact.* 94: 213-223, 1967.
 4. CARBONELL, L. M. — Ultrastructure of dimorphic transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bact.* 100: 1076-1082, 1969.
 5. GIL, F. & CARBONELL, L. M. — Ultrastructure of the yeast phase of *Paracoccidioides*. *Acta cient. venez.* 19: 45-47, 1968.
 6. 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.
 7. VIEIRA e SILVA, C. E.; 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.