

JULIANA REIS BURJACK

**PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS DE PAREDE
CELULAR DE LEVEDURAS NEGRAS DE INTERESSE CLÍNICO**



**CURITIBA
2010**

JULIANA REIS BURJACK

**PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS DE PAREDE
CELULAR DE LEVEDURAS NEGRAS DE INTERESSE CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente

**CURITIBA
2010**

À Deus pela existência e oportunidade. A toda minha família pelo amor e carinho. À minha mãezinha, que sempre vai estar no meu coração caminhando comigo, meu exemplo de vida e dignidade. Meu pai e minha irmã pelas lições e ensinamentos. A minha vizinha pela sabedoria e amor. E em especial ao meu marido, meu anjinho, pelo apoio, compreensão, paciência e amor incondicional. Aos meus verdadeiros amigos pelo carinho, companheirismo e motivação e a todos que acreditaram na minha capacidade em concluir este trabalho, me incentivando e apoiando.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só se tornou possível, devido o apoio, carinho, compreensão, ajuda, incentivo, motivação, críticas e elogios de pessoas maravilhosas e inesquecíveis que acompanharam o encaminhar desta pesquisa.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, minha família e amigos por estarem sempre presentes na minha vida. Ao meu marido, Anderson Luiz, meu anjinho, companheiro de mestrado e idas ao laboratório nos finais de semana, amigo verdadeiro, agradeço todo amor, carinho, compreensão, incentivo e cumplicidade.

A minha amiga irmã de coração, Ana que mesmo longe esteve sempre presente, por toda sua amizade, carinho, motivação e apoio.

Agradeço ao meu orientador Guilherme Sasaki, por toda ajuda, incentivo e orientação.

Agradeço a minha co-orientadora Vânia Vicente pela oportunidade, orientação e confiança.

A Professora Adriana Costa e professora Andrea pelos esclarecimentos e auxílio.

A Professora Larissa pela colaboração.

A todos meus melhores e verdadeiros amigos, Nathália, Fabíola, Gustavo, Vivianny, Alcides Neto, Beto, Eduardo Farneze, Ana Cláudia, Giovanna, Isabela, Juninho, Renan, Dudu, Flávinha, Tatiana, Tia Luci e Janete pelo apoio, carinho e amizade incondicional.

A tia Elza pelas palavras de apoio, carinho, amizade e incentivo.

Aos meus amigos de mestrado, Paulo, Guisepe, André, Franciele, Eduardo, Raquel, Martha, Saloê, Guilherme, e em especial a Fabiana, Patrícia, Samarina, Angela por estarem sempre presentes em todos os momentos, desabafos, risadas, companhia no laboratório nos finais de semana e no RU, apoio, compreensão, entendimento, motivação e amizade.

Agradeço imensamente a Juliana Duarte, o seu companheirismo, companhia, amizade verdadeira e única, ajuda, superação e apoio incondicional. A Bianca pela sua amizade e incentivo.

Agradeço a Alessandra pela ajuda com os ensaios imunológicos, alegria e conversas animadas. Ao Higor Guerim pela ajuda e disposição.

Aos colegas de laboratório Mariana, Sabina, Diogo, Carlos, pelo apoio e compreensão.

Agradeço aos colegas da Bioquímica, Fernanda, Dirce, Ana Helena, Arquimedes, Daniel e em especial a Andrea pela disposição no esclarecimento das perguntas e ajuda, sem ela a interpretação deste trabalho seria difícil. A Yanna por todo carinho e compreensão.

Aos professores que ministraram as disciplinas durante esse período.

À Rosane e ao Professor Guilherme pelas análises no GC-EM e RMN.

Ao programa de Pós-graduação, e a Coordenação do Curso.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os Professores da Biomedicina e amigos, em especial a Professora Maria Augusta, Professor Cláudio, Professor Valdir, nunca esquecidos, Professora Tânia e Professora Vivianny, pelo conhecimento adquirido e ensinamentos e a Kathyúscia, Márcio, Fábio Kimura e Marcella pela sua amizade e lembranças boas.

À todos que de alguma forma fizeram parte desta etapa científica, em especial a minha grande família, obrigada a todos!!!

A Ciência e Deus

Um senhor de 70 anos viajava de trem tendo ao seu lado um jovem universitário, que lia o seu livro de ciências. O senhor, por sua vez, lia um livro de capa preta. Foi quando o jovem percebeu que se tratava da Bíblia, e que estava aberta no livro de Marcos. Sem muita cerimônia o jovem interrompeu a leitura do velho e perguntou:

- O senhor ainda acredita neste livro cheio de fábulas e crendices?

- Sim, mas não é um livro de crendices. É a Palavra de Deus. Estou errado?

- Mas é claro que está! Creio que o senhor deveria estudar a História Universal. Veria que a Revolução Francesa, ocorrida há mais de 100 anos, mostrou a miopia da religião. Somente pessoas sem cultura ainda crêem que Deus tenha criado o mundo em sete dias. O senhor deveria conhecer um pouco mais sobre o que os nossos cientistas pensam e dizem sobre tudo isso.

- É mesmo? E o que pensam e dizem os nossos cientistas sobre a Bíblia?

- Bem, respondeu o universitário, como vou descer na próxima estação, falta-me tempo agora, mas deixe o seu cartão que eu lhe enviarei o material pelo correio com a máxima urgência.

O velho então, cuidadosamente, abriu o bolso interno do paletó e deu o seu cartão ao universitário. Quando o jovem leu o que estava escrito, saiu cabisbaixo sentindo-se pior que uma ameba.

No cartão estava escrito: "Professor Doutor Louis Pasteur, Diretor Geral do Instituto de Pesquisas Científicas da Universidade Nacional de França".

O fato ocorreu em 1892. É verdadeiro e integrante da sua biografia.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

(Louis Pasteur)

RESUMO

Os fungos dematiáceos constituem um grupo grande e heterogêneo, caracterizados por possuírem um pigmento escuro, dihidroxinaftaleno melanina-DHN, na parede celular de suas células. Na natureza são encontrados principalmente na microbiota do solo e de matéria orgânica em decomposição, distribuindo-se em regiões de clima tropical e subtropical. Muitos deles são sapróbios de crescimento rápido, entretanto há uma parcela patogênica em hospedeiros vertebrados que está reunida na família *Herpotrichiellaceae*. Para este estudo foi utilizado o fungo dematiáceo da espécie *Fonsecaea monophora*, agente de cromoblastomicose, o qual pode causar infecção de forma disseminada em pacientes imunocomprometidos. Com o objetivo de obter, os glicoconjugados de parede celular, os exopolissacarídeos (EPS) e a biomassa das linhagens de origem clínica e ambiental de *F. monophora* (MMHC82 e FE5p4), respectivamente, realizou-se o cultivo nos meios Mínimo (MM) e Czapeck-Dox (CD). Os EPS foram avaliados quanto a sua composição monossacarídica nos diferentes meios de cultivo e como resultado desta composição, açúcares como manose, galactose e glucose foram encontrados como prevalentes. Os polissacarídeos da parede celular das duas linhagens também apresentaram açúcares como glicose, manose e galactose em sua composição. Quando as frações de parede foram submetidas a análise de metilação e de RMN, foi possível observar a presença de Galf (1→5) e (1→6) ligada, bem como na forma de terminal não redutor, devido a presença dos derivados per-O-metilados 2,3,6-Me₃-Galf, 2,3,5-Me₃-Galf e 2,3,5,6-Me₄-Galf, respectivamente, em conjunto com os sinais em δ 108,4 e 106,0, indicando a presença de uma possível galactofuranana como polissacarídeo estrutural. Além de Galf, a mistura de polissacarídeos de parede também apresentou unidades de Glcp e Manp, sugerindo a presença de α- e β-glucanas e de α-mananas, devido à presença dos sinais em δ 98,4 e 103,0, e 101,3, respectivamente. Baseado nos dados de metilação observou-se que as unidades de Glcp apresentaram-se principalmente 3-O-, 4-O- e 4,6-di-O-substituídas, enquanto que as unidades de Manp eram substituídas em O-4 e O-6, ou 2,4-, 4,6-, 2,6-, 3,6-di-O-substituídas, ou ainda 2,3,6-tri-O-substituídas. Na análise quimiométrica os resultados de ¹H RMN corroboraram com os dados de metilação, onde observou-se que a linhagem MMHC82 de *F. monophora* em meio CD apresentou uma maior variação no perfil fisiológico relacionado aos carboidratos da parede celular. Os glicoconjugados foram utilizados como antígenos em ensaios imunológicos utilizando soros provenientes de pacientes portadores de cromoblastomicose. O antígeno, polissacarídeo pertencente à parede celular do fungo MMHC82 (patogênico), cultivado no meio MM, foi o que obteve melhor resposta antigênica. A distribuição destas espécies na natureza e o conhecimento destes polissacarídeos e glicoconjugados de parede poderão contribuir para ampliar o entendimento e elucidação da patogênese deste fungo podendo auxiliar no diagnóstico e tratamento destas doenças.

Palavras-Chave: *Fonsecaea monophora*, EPS, polissacarídeos, parede celular, cromoblastomicose

ABSTRACT

Dematiaceous fungi form a large and heterogeneous group, characterized by dark pigment, dihydroxynaphthalene melanin (DHN) on their cell walls. They are mainly found on soil and on decomposing organic matter microbiot, in tropical and subtropical regions. Many of them are fast growing saprobiotic, however some are pathogenic of vertebrate hosts, which are grouped in the Herpotrichiellaceae family. The genus *Fonsecaea monophora*, which was used in this study, can cause diseases like chromoblastomycosis, especially in immunocompromised patients. Exopolysaccharides (EPS) were obtained from fungal strains MMHC82 (pathogenic) and FE5p4 (saprobiotic), their biomass as well as the glycoconjugates from their cell walls were used for analysis. Also, these polymers were obtained as antigens for immunological tests. Strains were grown on minimal medium (MM) and Czapeck-Dox medium (CD). EPs were tested for their monosaccharide composition on different growth media and, as a result, sugars like mannose, galactose and glucose prevailed. The polysaccharides from the cell walls of the two strains also showed sugars like glucose, mannose and galactose in their composition. When fractions of the cell wall were submitted to methylation analysis and RMN, it was possible to observe the presence of $\text{Gal}f(1\rightarrow5)$ and $(1\rightarrow6)$ connected, as well as in the form of a non-reductive terminal due to the presence of per-*O*-methylated 2,3,6- Me_3 - $\text{Gal}f$, 2,3,5- Me_3 - $\text{Gal}f$ and 2,3,5,6- Me_4 - $\text{Gal}f$ respectively, together with the signals in δ 108,4 e 106,0, which indicate the presence of a possible galactofuranan as a structural polysaccharide. Besides $\text{Gal}f$, the mixture of wall polysaccharides showed $\text{Glc}p$ and $\text{Man}p$ units, suggesting the presence of α - and β -glucans and α -mannan, due to the presence of signals in δ 98,4, 103,0, and 101,3, respectively. Based on methylation data, it's observed that the $\text{Glc}p$ units present as 3-*O*-, 4-*O*- and 4,6-di-*O* substituted, while $\text{Man}p$ units present themselves as substituted in *O*-4 and *O*-6, or 2,4-, 4,6-, 2,6-, 3,6-di-*O*-substituted, or still 2,3,6-tri-*O*- substituted. Chemometric analysis of the results from ^1H RMN corroborate with the methylation data obtained. It was observed that strain MMHC82 in CD medium showed a greater variation in the physiological profile related to cell wall carbohydrates. The distribution of these species in the wilderness and the knowledge of cell wall exopolysaccharides and glycoconjugates can contribute to extend the understanding and elucidation of this fungus's pathogenesis, and can also help in the diagnosis and treatment of these diseases.

Keywords: *Fonsecaea monophora*, EPS, polysaccharides, cell wall, chromoblastomycosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - CURVAS DE CRESCIMENTO DA BIOMASSA OBTIDA PARA A LINHAGEM FE5P4 DE <i>Fonsecaea Monofora</i> PROCEDENTE DE ORIGEM AMBIENTAL.....	43
Figura 2 - CURVAS DE CRESCIMENTO DA BIOMASSA OBTIDA PARA A LINHAGEM MMHC82 DE <i>Fonsecaea Monofora</i> PROCEDENTE DE AMOSTRA CLÍNICA.....	43
Figura 3 - CURVAS DE CONSUMO DE GLUCOSE OBTIDAS PARA AS LINHAGENS DE FE5P4 E MMHC82 DURANTE O CULTIVO EM MEIO MM.....	45
Figura 4 - CURVAS DE CONSUMO DE SACAROSE OBTIDAS PARA AS LINHAGENS DE FE5P4 E MMHC82 DURANTE O CULTIVO EM MEIO CD.....	46
Figura 5 - CURVAS DE EPS PARA A LINHAGEM FE5P4.....	47
Figura 6 - CURVAS DE EPS PARA A LINHAGEM MMHC82.....	47
Figura 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS DAS LINHAGENS MMHC82 E FE5P4 PARA O MEIO CD E MM.....	49
Figura 8 - PROPORÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS ENTRE AS LINHAGENS MMHC82 E FE5P4 PARA O MEIO CD.....	50
Figura 9 - PROPORÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS DAS LINHAGENS MMHC82 E FE5P4 PARA O MEIO MM.....	51
Figura 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE DAS LINHAGENS MMHC82 E FE5P4 PARA OS MEIO CD E MM.....	51
Figura 11 - PROPORÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE ENTRE AS LINHAGENS MMHC82 E FE5P4 PARA O MEIO CD.....	52
Figura 12 - PROPORÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE ENTRE AS LINHAGENS MMHC82 E FE5P4 PARA O MEIO MM.....	53

Figura 13-	ANÁLISE DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DA LINHAGEM MMHC82 PARA O MEIO CD.....	54
Figura 14-	ANÁLISE DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DA LINHAGEM MMHC82 PARA O MEIO MM.....	55
Figura 15-	ANÁLISE DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DA LINHAGEM FE5P4 PARA O MEIO CD.....	56
Figura 16 -	ANÁLISE DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DA LINHAGEM FE5P4 PARA O MEIO MM.....	57
Figura 17-	COMPARATIVO ENTRE ALDITOL ACETATOS O-ME-OBTIDOS POR METILAÇÃO.....	59
Figura 18-	ANALISE QUIMIOMÉTRICA PARA OS RESULTADOS DOS COMPOSTOS METILADOS.....	61
Figura 19-	ANALISE QUIMIOMETRICA PARA OS RESULTADOS DOS ESPECTROS DO RMN.....	61
Figura 20-	ANTIGENOS DE NATUREZA MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARIDEOS DE PAREDE DAS LINHAGENS MMHC82 E FE5P4 PARA OS MEIOS CD E MM	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - ALDITOL ACETATOS O-ME- OBTIDOS POR METILAÇÃO ANALISADOS POR GC-EM (COLUNA DB-225)	58
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS

δ	- Deslocamento químico
Ac ₂ O	- Anidrido acético
Ara	- Arabinose
¹³ C	- Carbono treze
CD	- Meio Czapeck-Dox
CH ₃ I	- Iodeto de metila
CIE	- Contraímunoeletroforese
DID	- Imunodifusão dupla
D ₂ O	- Óxido de deutério
<i>f</i>	- Furanosídico
Fuc	- Fucose
Gal	- Galactose
GC-EM	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GLC	- Cromatografia em fase gasosa
Gluc	- Glucose
ELISA	- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPS	- Exopolissacarídeo
HPLC	- Cromatografia líquida de alta resolução
HSQC	- Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy
Me ₂ SO	- Dimetilsufóxido
Me ₂ SO-d ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado
Man	- Manose
NaBD ₄	- Borohidreto de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NK	- Células Natural Killer
nm	- Nanômetro
OPD	- Ortofenilenodiamina
<i>p</i>	- Piranosídico
PC	- Componente principal
PBS	- Salina tamponada
Rib	- Ribose
Rha	- Ramnose

RMN	- Ressonância magnética nuclear
TFA	- Ácido trifluoracético
TLR	- Receptor toll-like
TNF	- Fator de necrose tumoral
TLC	- Cromatografia em camada delgada
Xyl	- Xilose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS.....	16
Geral	16
Específicos	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 FUNGOS DEMATIÁCEOS	17
2.1.1. IMPORTÂNCIA CLÍNICA	17
2.2 CROMOBLASTOMICOSE	19
2.3 FEOHIFOMICOSE	21
2.4 POLISSACARÍDEOS	24
2.5 EXOPOLISSACARÍDEOS.....	26
2.6 POTÊNCIAL IMUNOPATOGENICO	28
2.7 TESTES BIOQUÍMICOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	34
3.1.1 Linhagens utilizadas	34
3.2 MANUTENÇÃO E REPIQUE DOS ISOLADOS	35
METODOLOGIA.....	35
3.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO	35
3.4 EXTRAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS	36
3.5 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE MICÉLIO	36
3.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EPS E POLISSACARÍDEOS	36
3.6.1 Hidrólise ácida total	36
3.6.2 Redução e acetilação	37
3.6.3 Metilação	37
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
3.7.1 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM).....	38
3.7.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	38
3.7.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)	39
3.7.4 Análise quimiométrica	39
3.7.4.1 Análise por Componentes Principais.....	39
3.8 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS	41
3.8.1 Preparação da placa de ELISA	41
3.8.2 Reação Imunoenzimática	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	42
4.1.1 Curva de crescimento de Biomassa.....	42
4.1.2 Curva de glucose	44
4.1.3 Curva de sacarose	45

4.1.4 Curva de crescimento do Exopolissacarídeo (EPS).....	46
4.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXOPOLISSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS DE PAREDE	48
4.3 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR NOS MEIOS DE CULTIVO	53
4.3.1 Análise quimiométrica	59
4.4 AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS.....	62
5. CONSIDERAÇÕES.....	66
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68
8. ANEXO	76

1. INTRODUÇÃO

A família *Herpotrichiellaceae* reúne um amplo grupo de fungos cuja principal característica é a presença de hifas e conídios com melanina. Alguns fungos dematiáceos pertencentes a esta família são patogênicos para hospedeiros vertebrados. As leveduras negras patogênicas fazem parte deste grupo, e durante parte do seu ciclo de vida apresentam desenvolvimento leveduriforme. Estes fungos negros são capazes de suportar condições adversas de crescimento, causando uma variedade de infecções (VICENTE *et al.*, 2001; VICENTE *et al.*, 2008).

A maioria das culturas de leveduras negras avaliadas é de casos clínicos. O isolamento de linhagens ambiental e sua identificação são mais difíceis devido ao pleomorfismo e crescimento lento (VICENTE *et al.*, 2001; VICENTE *et al.*, 2008).

As leveduras negras foram definidas por Ajello, em 1978, como fungos fuliginosos e filamentosos, os quais em certa fase de seu desenvolvimento e sob certas condições ambientais, possuem uma forma unicelular durante a qual se processa a reprodução por brotamento. Nessa fase as colônias são lisas e pretas e podem causar micoses humanas e em outros animais. Estas micoses são mais freqüentes em áreas de climas tropicais e subtropicais, considerando-se que os principais fatores que favorecem o desenvolvimento desses fungos são o calor e a umidade (RASUL *et al.*, 2007).

A maioria dos fungos dematiáceos são sapróbios habituais do solo e de vegetais em decomposição. A infecção depende, basicamente, de três fatores muito importantes para se estabelecer: a resistência do hospedeiro, a quantidade do inóculo e a virulência do fungo (ALVIANO *et al.*, 2003).

A sobrevivência destes fungos no hospedeiro humano, tido como habitat hostil, é favorecida não somente pela presença de melanina na parede celular, mas também pela ocorrência de lipídios nessa estrutura e a termotolerância a 37°C (RIBEIRO *et al.*, 2006).

As melaninas fúngicas são provenientes de diversos compostos fenólicos. Essas substâncias dão origem a diferentes melaninas através de processos enzimáticos ou auto-oxidativos. Muitas das enzimas envolvidas no metabolismo das melaninas estão sendo investigadas, mas comprovadamente, as melaninas fúngicas exercem um papel protetor ao estresse ambiental, restando ainda elucidar algumas de suas funções na patogenicidade e virulência fúngica (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Os fungos dematiáceos são responsáveis por uma ampla variedade de infecções clínicas, entre as quais estão às superficiais e profundas. Entre estas síndromes clínicas, as micoses subcutâneas são as infecções mais comuns causadas por este grupo diversificado de fungos que ataca o homem e os animais. As lesões aparecem inicialmente a partir do ponto de inoculação de estruturas fúngicas, através de traumatismos diversos e podem permanecer localizadas ou se espalhar pelos tecidos adjacentes, por via hematogênica ou linfática. (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006).

Entre as principais micoses subcutâneas desenvolvidas por estes fungos estão a cromoblastomicose e a feohifomicose. Os agentes etiológicos da cromoblastomicose são fungos pertencentes principalmente aos gêneros *Fonsecaea*, *Cladophialophora* e *Phialophora*, enquanto a *Exophiala* spp. é o agente etiológico relevantes na feohifomicose (HOOG *et al.*; 2004; VICENTE *et al.*, 2008; ALVIANO *et al.*, 2009).

A parede celular é uma estrutura vital para todos os fungos e constitui a superfície de contato da célula com o meio externo, os protegendo do estresse ambiental. Sua função está também relacionada com crescimento e interações enzimáticas implicadas na digestão de substratos nutritivos complexos (PINTO *et al.*, 2008).

Os polissacarídeos em grande quantidade apresentam-se associados aos polipeptídeos, constituindo as glicoproteínas da parede, expostos nas camadas mais externas da parede dos fungos, estão envolvidos em diferentes tipos de interação com o ambiente extracelular, além de diversas funções enzimáticas e estruturais (SILVA *et al.*, 2008).

Estas moléculas também são indispensáveis nas vias metabólicas, e no crescimento e reprodução das células fúngica e várias destas moléculas são compostos ativos imunologicamente com grande potencial como reguladores na patogenicidade e na reposta imune do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2008).

Algumas destas moléculas ainda podem ser reconhecidas por anticorpos presentes no soro dos pacientes, sugerindo que podem ser úteis no diagnóstico das infecções fúngicas. As proteínas e glicoproteínas expostas nas camadas mais externas das estruturas de parede estão envolvidas em vários tipos de interação das células fúngicas. Estas glicoproteínas são conhecidas à muito tempo por influenciar na resposta imune (PINTO *et al.*, 2008).

Dentro deste contexto, a avaliação do crescimento das linhagens de origem clínica e ambiental do fungo *Fonsecaea monophora*, agente da cromoblastomicose, e a caracterização de seus polissacarídeos foram alvos deste trabalho. Para tanto, foram utilizados testes bioquímicos, a partir de biomoléculas de polissacarídeos visando observar as diferenças bioquímicas entre estas linhagens. Assim, este estudo pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos e de virulência envolvidos entre as linhagens sapróbias e patogênicas, auxiliando no diagnóstico e tratamento da doença.

OBJETIVOS

Geral

Caracterizar os polissacarídeos sintetizados pelas linhagens de origem clínica e ambiental de *Fonsecaea monophora*, agente casual de cromoblastomicose, visando determinar diferenças entre a parede celular através dos seus glicoconjugados.

Específicos

1. Avaliar o crescimento dos isolados de origem clínica e ambiental de *Fonsecaea monophora* em meios de cultura diferentes;
2. Produzir material biológico como biomassa e obter polissacarídeos e exopolissacarídeos (EPS) das diferentes linhagens estudadas;
3. Caracterizar a mistura de polissacarídeos e glicoconjugados por análise de metilação e por ressonância magnética nuclear;
4. Determinar a antigenicidade dos polissacarídeos de *F. monophora* a partir da sua interação com anticorpos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS DEMATIÁCEOS

Os fungos dematiáceos ou fungos pigmentados compõem um grupo heterogêneo de organismos que são responsáveis por uma ampla variedade de quadros clínicos, abrangendo desde infecções superficiais, cutâneas e subcutâneas, doenças alérgicas, pneumonia até infecções disseminadas. Estes agentes acometem indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. Entre estas doenças a de maior interesse para este estudo é a cromoblastomicose que é tipicamente distinta de outras doenças, como feohifomicose e micetoma, baseado na presença de corpos muriformes durante o diagnóstico histológico (REVANKAR, 2007).

O desenvolvimento filamentoso destes agentes é caracterizado por colônias de aspecto escuro (marrom, verde oliva ou negras) onde microscopicamente observam-se hifas com septos escuros. Muitas espécies são sapróbias e de crescimento rápido, enquanto outras patogênicas desenvolvem-se lentamente em meios de cultura definidos. As leveduras negras pertencentes à família *Herpotrichiellaceae* apresentam crescimento lento, inicialmente leveduriforme, porém com o tempo, a textura da colônia torna-se aveludada com hifas mononucleadas e maturação de talo determinada (HOOG; GUARRO, 1995).

Os fungos dematiáceos apesar de terem uma ampla distribuição mundial são encontrados principalmente nas áreas de clima tropical e subtropical (MOMIN *et al.*, 2008). Estes fungos têm sido identificados e classificados por testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Recentemente a análise molecular tem sido introduzida também para estes fins (SUH, 2005). O diagnóstico mais realizado é avaliado pelo resultado da cultura. Não existem testes sorológicos ou antigênicos simples que avaliam a detecção destes fungos em sangue ou tecido, ao contrário de outras micoses comuns que causam doenças humanas (REVANKAR, 2007).

2.1.1. IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Entre as infecções micóticas causadas por estes fungos, inclui-se micetomas eumicóticos, feohifomicose e cromoblastomicose, as quais podem

permanecer nos locais de inoculação traumática, interiorizar-se ou disseminar-se. Os fungos dematiáceos podem ser encontrados em diversas formas nos tecidos do hospedeiro, variando de acordo com a micose (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006).

A formação de nódulos contendo grãos nos tecidos é um indicativo de micetoma. Esta doença é caracterizada como uma infecção crônica de longa evolução, predominantemente localizada nos pés. A doença pode ser causada por bactérias, especificamente actinomicetos e então denominada de actinomicetoma. Quando causada por fungos é conhecida por eumicetomas, relacionada com uma diversidade de agentes etiológicos, entre eles fungos dematiáceos (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006).

A infecção por estes fungos ocorre a partir de sua inoculação traumática, seguida de edema, eritema e posterior fistulização, o processo inflamatório evolui para tecido subcutâneo, como consequência há um aumento importante do volume do membro, com deformidade e limitação funcional. Nas evoluções prolongadas, ocorre comprometimento ósseo com osteosclerose e osteólise. A doença é classificada como subcutânea, localizada com disseminação rara (REVANKAR, 2007).

O termo feohifomicose abrange um amplo espectro de micoses oportunistas causadas por fungos dematiáceos pertencentes à família *Herpotrichiellaceae*, que ocorrem desde forma superficial, cutânea, subcutânea até sistêmica. Podem apresentar-se nos tecidos lesados como células leveduriformes, pseudohifas, hifas verdadeiras ou qualquer combinação destas formas, sem a formação de corpos muriformes (REVANKAR *et al.*, 2002).

A cromoblastomicose causada por fungos dematiáceos, membros da família *Herpotrichiellaceae*, os quais formam corpos septados nos tecidos, denominados de muriformes. A doença apresenta uma evolução lenta de lesões nódulo verrucosas nos tecidos, atingindo frequentemente membros inferiores, lesões nos membros superiores, nádegas e em outras regiões do corpo ocorrem com menos frequência (TANG, 2001; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009;).

2.2 CROMOBLASTOMICOSE

É uma infecção micótica crônica, de evolução lenta, que acomete a pele e o tecido celular subcutâneo do homem e dos animais. A maioria das lesões é causada por fungos dematiáceos, que vivem no solo ou vegetais em decomposição. A cromoblastomicose é também denominada cromomicose, dermatite verrucosa, dermatite verrucosa cromoparasitária (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; SÁ *et al.*, 2007; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009).

Esta patologia foi descrita pela primeira vez por Alexandre Pedroso no Brasil em 1911, mas os primeiros 6 casos da doença só foram descritos em 1914. Rudolph conseguiu pela primeira vez isolar, cultivar o fungo e reproduzir a patologia em modelo experimental, ele só não descreveu os aspectos histológicos da doença, principalmente a presença dos corpos muriformes, que foram descritos pela primeira vez em 1915 por Lane e Medlar (FUCHS; PECHER, 1992).

Os agentes etiológicos desta doença são fungos pertencentes principalmente aos gêneros *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Cladophialophora* e *Rhinocladiella* (TANG, 2001). Entre estes agentes os mais freqüentes são o *F. pedrosoi* e *C. carrionii* e os menos freqüentes são *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspera* e *Wangiella dermatitidis*. Nos últimos anos, *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala spinifera* foram também observadas nas lesões de cromoblastomicose (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; VICENTE *et al.*, 2008).

Outras espécies como *F. monophora* (HOOG *et al.*, 2004) e a recente espécie descrita *F. nubica* (NAJAFZADEH *et al.*, 2009), além de outros fungos tais como *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium funicola* e *Catenulostroma chromoblastomycosun* (MOMIN *et al.*, 2008) também estão associados com as lesões na cromoblastomicose.

Nas zonas tropicais e nas zonas temperadas como no Uruguai e norte da Argentina o fungo *F. pedrosoi* é a espécie prevalente (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). Países como México, Venezuela, África do sul, Madagascar e Japão também são locais onde foi diagnosticada esta doença (SANTOS *et al.*, 2007).

No estado do Paraná entre 1985 e 1996, 71 casos foram diagnosticados e após um estudo entre 1942-1997 com 325 casos diagnosticados, a região Amazônica foi considerada endêmica (SILVA *et al.*, 1999). No Brasil também são

consideradas áreas endêmicas o Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (MATTE *et al.*, 1997).

O ciclo de vida do fungo compreende diferentes estágios morfológicos que incluem as estruturas reprodutivas como os conídios, as formas fúngicas usualmente encontradas nas espécies saprofíticas como os micélios e os estágios parasitários como os corpos muriformes (SILVA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2007). Os corpos muriformes formam propágulos no interior do hospedeiro que se aderem ao tecido epitelial e se diferenciam em elementos esféricos ou ovóides, alguns permanecem em filamentação, com coloração marrom característica. Os corpos muriformes são efetivamente resistentes a destruição por células imunes efectoras permitindo assim o desenvolvimento da doença crônica (SILVA *et al.*, 2002, ALVIANO *et al.*, 2009). O diagnóstico desta doença é confirmado pela observação destas células no tecido e seu isolamento e a identificação na cultura (QUEIROZ–TELLES *et al.*, 2009).

Estes fungos apresentam colônias com aspecto aveludado ou algodonos, variando da cor esverdeada a marrom-escuro ou negro, com hifas septadas. A identificação das espécies só é possível através da morfologia microscópica do aparelho de conidiação ou órgãos de frutificação (SILVA *et al.*, 2002).

Durante a fase inicial da cromoblastomicose pode ocorrer a eliminação transepitelial ou dermoepitelial espontânea do fungo, onde o tecido conjuntivo lesado pela inoculação de lascas de madeira ou espinhos pode expelir o fungo através da epiderme, resultando em pontos negros na superfície da lesão (SILVA *et al.*, 2002).

O aspecto clínico das lesões é polimorfo, caracterizando-se principalmente pela formação de nódulos, lesões papulosas eritemato-descamativas e pela forma clássica, verrucosa, que pode apresentar-se ulcerada ou não. Os sintomas destas lesões são prurido e dor e o estado geral do paciente geralmente não é comprometido (MARTÍNEZ; TOVAR, 2007).

A supuração destes nódulos pode efetuar-se quando, ao lado do fungo, encontramos microrganismos de infecção secundária, as lesões são bastante hemorrágicas, os nódulos e pápulas lentamente aumentam em número e volume e os mais antigos ulceram-se. Outras vezes, porém, o fundo dessas úlceras torna-se vegetante, adquirindo aspecto papilomatoso, semelhante à couve-flor. As verrugas podem ser planas, crostosas e formam extensas placas que podem também ulcerar. As lesões ósseas são raríssimas na cromoblastomicose e, quando ocorrem, são

devidas geralmente à ausência de movimentação do membro atacado pelo processo mórbido (MARTÍNEZ; TOVAR, 2007).

Normalmente as lesões se localizam nos membros inferiores, principalmente nos pés e pernas. Embora possam ocorrer nos membros superiores, face, orelha, pescoço, tórax, ombros e nádegas. A doença pode se propagar, às vezes, para a rede linfática da região afetada e alguns autores têm descrito casos de localização cutânea com metástase cerebral, bem como disseminação hematogênica (QUEIROZ–TELLLES *et al.*, 2009).

Os indivíduos do sexo masculino são mais acometidos devido ao seu maior contato com o solo e vegetais, especialmente através do seu trabalho na agricultura, que os torna mais susceptíveis a acidentes com estes fungos. Sabe-se ainda que alguns fatores hormonais ou genéticos desempenham um papel na adaptação fúngica ao tecido do hospedeiro e apesar da maioria dos pacientes com a doença serem imunocomprometidos, pessoas imunocompetentes estão sendo também acometidos pela cromoblastomicose (QUEIROZ–TELLLES *et al.*, 2009).

O pigmento negro, a melanina da parede celular fúngica dos agentes da cromoblastomicose, além de favorecer a capacidade fotoprotetora, permitindo o fungo desenvolver-se em ambientes ensolarados, atua também como um dos fatores de virulência desses elementos fúngicos (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Estudos comprovam uma constante estimulação antigênica pelo fungo agente desta doença, visto que *in vivo*, ele apresenta grande quantidade de polissacarídeos na sua parede celular (QUEIROZ–TELLLES *et al.*, 2009).

O tratamento é feito com diversas drogas como tiabendazol, anfotericina B e itraconazol e procedimentos clínicos também têm sido usados, entre os quais, eletrocoagulação, tratamento cirúrgico e mais recentemente, crioterapia vêm sendo empregados com melhores perspectivas (MARTÍNEZ; TOVAR, 2007).

2.3 FEOHIFOMICOSE

A designação feohifomicose foi proposta por Ajello, em 1974, para denominar infecções cutâneas, subcutâneas, as mais freqüentes e profundas (sistêmicas), agudas ou crônicas, causadas por uma grande variedade de fungos dematiáceos (REVANKAR *et al.*, 2004).

Conforme McGinnis, em 1983, engloba importante, distinto e heterogêneo grupo de infecções micóticas, nas quais os agentes etiológicos ocorrem nos tecidos como células leveduriformes, pseudo-hifas e hifas demacióides, curtas ou alongadas, regulares, distorcidas ou dilatadas ou em combinação com qualquer dessas formas. Está é uma infecção oportunista de origem exógena (REVANKAR *et al.*, 2004).

Os agentes etiológicos são, na sua maioria, fungos pertencentes aos gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Wangiella*. Um grande número de casos tem sido diagnosticado somente em bases histopatológicas sem a identificação do agente pelo cultivo. Os fungos estão incomumente associados com doenças cerebrais, porém na feohifomicose os agentes que acometem principalmente o sistema nervoso central causando abscessos cerebrais são *C. bantiana* e *Ramichloridium mackenziei* (REVANKAR *et al.*, 2002).

Em alguns casos de feohifomicose cerebral foram descritos recentemente o fungo *F. monophora* como agente etiológico da doença. Esta espécie foi distinguida da *F. pedrosoi* em estudos baseados na seqüência da região ITS do RNA ribossômico utilizando diferentes linhagens de procedência clínica e ambiental (HOOG *et al.*, 2004). A espécie *F. monophora* apresenta um perfil de virulência diferenciado e pode ser causa a maioria dos casos das infecções cerebrais em pacientes humanos (SURASH *et al.*, 2005; XI *et al.*, 2008).

A feohifomicose é uma infecção esporádica, cosmopolita, que acomete indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos. Esta micose não se restringe aos humanos, podendo manifestar-se, também em outras espécies animais. Os fungos causadores de feohifomicose, assim como na cromoblastomicose apresentam a capacidade de produzir pigmento castanho, a melanina, em suas hifas (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

A infecção geralmente ocorre em pacientes debilitados, com doenças crônicas, diabetes, leucemia, imunodeprimidos em geral. O fator de risco primário é principalmente atribuído à diminuição da imunidade do sistema imune do hospedeiro, porém casos em pacientes imunocompetentes também têm sido confirmados. (REVANKAR *et al.*, 2002).

O uso de antimicrobianos e corticoterapia prolongadas tornam também esses pacientes vulneráveis aos agentes casuais da feohifomicose. As formas

clínicas mais conhecidas da feohifomicose são basicamente de dois tipos: subcutânea e sistêmica (QUEIROZ–TELLLES *et al.*, 2009).

Na feohifomicose subcutânea os abscessos ou lesões verrucosas podem se desenvolver em várias partes do corpo; sua evolução é lenta e a doença tende a tornar-se crônica. Os abscessos com secreção sanguinolenta podem ser confundidos com infecção bacteriana e são frequentemente moles à palpação, flutuantes e eritematosos e as lesões verrucosas podem lembrar o crescimento exuberante, com aspecto de couve-flor, da cromoblastomicose (ESTERRE; TELLES, 2006).

Na doença sistêmica ou disseminada os órgãos internos podem ser invadidos por alguns agentes etiológicos desta doença. Algumas vezes a infecção é confinada ao cérebro, com raro envolvimento dos pulmões e outras partes do corpo. Estas lesões do cérebro isoladas ou múltiplas aparecem como abscessos encapsulados ou infiltrações inflamatórias generalizadas. Os sintomas associados com a feohifomicose cerebral incluem: cefaléia, náuseas, vômitos, febre, dor e rigidez de nuca (FERREIRO *et al.*, 2007).

A histopatologia e o cultivo do material constituem exames indispensáveis para o diagnóstico de feohifomicose. Como estes agentes estão dispersos na natureza, os simples cultivos de fungos dematiáceos não assegura a natureza fúngica da infecção (FERREIRO *et al.*, 2007).

Vários quimioterápicos têm sido utilizados, sem sucesso, pois as lesões causadas pela feohifomicose são extremamente difíceis de serem tratadas. O sucesso da terapia depende do agente etiológico (*C. carrionii* é mais sensível que *F. pedrosoi*) e da severidade da doença (ESTERRE; TELLES, 2006).

O uso de itraconazol tem atividade mais consistente *in vitro* quando comparadas a outras drogas antifúngicas (SINGH *et al.*; 2006). O tratamento cirúrgico baseia-se, quase exclusivamente, na remoção cirúrgica dos tumores com boa margem de segurança e recidivas podem ser freqüentes (SINGH *et al.*; 2006). O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e a combinação de terapias podem conter o sucesso para um melhor tratamento desta infecção no futuro (REVANKAR *et al.*, 2002).

2.4 POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo de compostos dos mais abundantes e importantes da biosfera (GLAZER; NIKAIDO, 1995). Estes polímeros são constituídos de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas diferindo entre si na unidade e no grau de ramificações destas ligações, no seu tipo, que as unem e no comprimento de suas cadeias, apresentando diferentes composições e funções (CHAPLIN, 1994).

Fungos, bactérias e plantas vêm sendo pesquisados como potenciais fontes de polissacarídeos e a sua possibilidade de aplicação na saúde humana, assim como em outras áreas, têm levado a intensivos estudos relacionados à sua extração e caracterização. Polissacarídeos bioativados isolados de parede celular fúngica têm sido caracterizados como homopolímeros, heteropolímeros ou, ainda, encontram-se ligados aos resíduos de proteínas formando glicoproteínas (FUKUDA *et al.*, 2009).

Em microrganismos, os polissacarídeos podem ser estruturais, excretados ao meio como exopolissacarídeos ou localizarem-se no citoplasma, exercendo a função de reserva energética (FUKUDA *et al.*, 2009). Nos fungos além de atuarem como elemento de suporte das hifas, alguns polissacarídeos constituem uma capa extracelular ao redor do micélio, proporcionando um suporte para adesão das enzimas excretadas e participando na degradação de algumas substâncias. Acredita-se ainda que a síntese de polissacarídeos represente uma estratégia de alguns microrganismos em condições desfavoráveis (CORRADI *et al.*, 2006).

O polissacarídeo mais importante, obtido por fermentação, foi a dextrana. Portanto foi a partir da análise da dextrana que se iniciou o estudo dos exopolissacarídeos microbianos (BARBOSA *et al.*, 2004).

A composição e estrutura química dos polissacarídeos são variáveis entre as diferentes espécies de microrganismos. Com base nos resultados provenientes de caracterização dessas moléculas, alguns autores propõem a sua utilização como marcadores para a classificação taxonômica de fungos filamentosos e leveduras (CARBONERO *et al.*, 2003).

Recentemente verificou-se que muitos polissacarídeos, principalmente aqueles com seis ou mais unidades monossacarídicas, conservam ou até mesmo potencializam as propriedades biológicas de seus polímeros. Uma possível

explicação para essa constatação é a melhor solubilidade dos polissacarídeos quando comparados às suas moléculas nativas, bem como ao tamanho dos polissacarídeos e a sua manutenção na conformação da molécula original (SILVA *et al.*, 2008).

As glucanas são polímeros de glucose amplamente distribuídos na natureza e classificadas conforme o tipo de ligação glicosídica [α , β] da cadeia principal. Nos fungos, estas moléculas participam como componentes menores do citossol, da parede celular e como polissacarídeos excretados ao meio. Nos fungos patogênicos tem um importante papel na interação entre a célula fúngica e o hospedeiro (SERVIOUR *et al.*, 1992).

Atualmente estes polissacarídeos fúngicos têm recebido atenção especial devido as suas propriedades físico-químicas peculiares, associada as suas novas funções (CORRADI *et al.*, 2005). Essas moléculas são capazes de ativar células do sistema imunológico humano, como macrófagos, neutrófilos e células (*natural killer*) NK, para a secreção de citocinas (interleucinas, interferon e fator necrosante tumoral) que são substâncias que atuam como sinais químicos nos processos de diferenciação, proliferação e apoptose celulares, contribuindo para a manutenção da homeostase no organismo (FUKUDA *et al.*, 2009).

A aplicação terapêutica dos polissacarídeos fúngicos parece depender da estrutura química e da conformação espacial de cada molécula, sendo que pequenas diferenças estruturais de cada polímero resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (CORRADI *et al.*, 2006).

Alviano e colaboradores (1991), demonstraram que os polissacarídeos da parede celular do *Fonsecaea pedrosoi* e seus lipídeos são capazes de induzir reação granulomatosa pulmonar em animais e estão relacionados com a patogenicidade. Em micélios e parede celular de conídios foram identificados glucose, manose, ramnose e glucosamina. Na parede celular das hifas foram identificados lipídeos e proteínas. Todos estes componentes podem influenciar no reconhecimento do fungo pelas células de defesa do hospedeiro (LIMONGI *et al.*, 1997).

A parede celular de diversos fungos como o *Paracoccidioides brasiliensis* e o *Histoplasma capsulatum* (SÁ-NUNES *et al.*, 2004) também é constituída de lipídeos, proteínas e polissacarídeos, que apresentam uma variável de cada um destes componentes de acordo com cada fungo.

Os polissacarídeos presentes na parede celular dos fungos são a glicose, a manose, a galactose e os polímeros alfa(α)-glucana, beta(β)-glucana, galactomanana e quitina (SAN-BLAS *et al.*, 1987). As beta-glucanas são encontradas esterificadas de várias formas distintas com β -1-6 glucana, β -1-3 glucana, que geralmente estão integrados com a quitina. As ligações entre estes polímeros determinam a rigidez e a solubilidade destes componentes (GOPAL *et al.*, 1984).

Sabe-se que um polissacarídeo presente na parede celular do *F. pedrosoi* é a α -1-3-glucana, presente em todos os fungos patogênicos dimórficos e que está relacionado com a virulência de alguns como o *P. brasiliensis* e o *H. capsulatum* (GIMENES *et al.*, 2006). Na *Candida albicans* as glucanas são importantes na interação fúngica com o hospedeiro e podem realizar o primeiro contato com o sistema imune (PINTO *et al.*, 2008).

As propriedades físicas e fisiológicas dos polissacarídeos são determinadas pelas diferenças químicas tais como: tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação e composição monossacarídica (GUTIÉRREZ; MARTINÉZ, 1995). As grandes variações no grau de ramificação desses polímeros podem afetar sua solubilidade, a composição do meio e as condições de cultivo e também interferem diretamente na produção do EPS fúngico (BARBOSA *et al.*, 2004).

2.5 EXOPOLISSACARÍDEOS

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados á células ou são excretados para o meio extracelular (SUTHERLAND, 1998). Nos fungos, os EPS constituem uma importante porcentagem da biomassa, participando com mais de 75% dos polissacarídeos constituintes da parede da hifa (GUTIÉRREZ; MARTINÉZ, 1995).

Fungos patogênicos geralmente têm hifas especializadas, utilizadas na extração de fontes de carbono do organismo infectado. A espécie e a quantidade de carbono extraído pelas hifas influenciam diretamente na quantidade de EPS produzido, assim como o maquinário enzimático que o fungo utilizará no processo de toxicidade. Portanto, o processo de patogenicidade pode estar intimamente

relacionado com a capacidade do fungo em produzir polissacarídeos (BARBOSA *et al.*, 2004).

Vários exopolissacarídeos ainda não foram caracterizados, mas sabe-se que alguns produzidos por espécies geralmente não patogênicas de fungos desempenham papel importante e aplicação na área médica, evitando a colonização do pulmão por células tumorais (efeito anticancerígeno), no controle da formação de leucócitos (efeitos antiinflamatório), na síntese de antígenos para a produção de anticorpos (imunização) (BARBOSA *et al.*, 2004).

Estes EPS podem ser aplicados também na terapia farmacêutica devido a sua atividade fisiológica como antivirais (CORRADI *et al.*, 2005); e no efeito protetor contra danos oxidativos de DNA, na interação com lipoproteínas de baixa densidade por meio de forças de van der Waals, que resulta na eliminação da fração lipídica sanguíneo, e em cosméticos como agentes de hidratação da pele (CORRADI *et al.*, 2006).

A atividade antitumoral de exopolissacarídeos como escleroglucana, esquizofilana, cinereana, lentinana e pestalana podem estar relacionados à estrutura química da cadeia principal da glucana na forma de tríplice hélice, à frequência e complexidade das cadeias laterais e à sua massa molecular (BARBOSA *et al.*, 2004). Portanto, decifrar as características estruturais destes polímeros é essencial para entender como as glucanas dos fungos são reconhecidas pelo sistema imune (SERVIOUR *et al.*, 1992), (BITTENCOURT, 2006).

A lentinana e esquizofilana que são glucanas fúngicas, tornaram-se clinicamente relevantes como imunoadjuvantes na terapia contra o câncer, em países como o Japão. Estas glucanas, não citotóxicas, supostamente expressam seu efeito antitumoral por estimulação do sistema imunológico. Acredita-se que a ação aconteça, principalmente, pela ativação das células T “helper”, células NK e macrófagos tanto quanto por um aumento nas células T citotóxicas (KEN-ICHIRO *et al.*, 2009).

Várias são as fontes de carbono estudadas para a produção de EPS fúngicos: glucose, sacarose, maltose, frutose, galactose, xilose, sorbitol, xilitol, manitol, arabinose e inositol, sendo observado que a glucose e sacarose têm sido as fontes de carbono mais utilizadas para a produção de EPS fúngico. Outro fator nutricional importante para a produção de EPS é a fonte de nitrogênio, altos níveis

deste composto no meio de cultivo podem reprimir a sua formação (BAE *et al.*, 2000).

2.6 POTÊNCIAL IMUNOPATOGÊNICO

Poucos grupos de fungos podem causar uma diversidade de quadros clínicos divergentes como os dematiáceos. Especialmente as leveduras negras patogênicas que causam micoses em humanos sem serem dependentes de parasitas animais. Dentro deste grupo, observam-se micoses que se estabelecem após inoculação traumática independente do estado imunológico do paciente até micoses sistêmicas provenientes de inalação (HOOG, 1993).

Sabe-se que diversos fatores interferem no processo evolutivo da infecção fúngica. Esses fatores decorrem da interação entre o hospedeiro (idade, sexo, hereditariedade, resistência natural e competência imunológica) e o agente fúngico (grau de virulência, viabilidade e quantidade de inóculo), ressaltando ainda nessa relação, o grau de incapacidade digestiva das células fúngicas pelos neutrófilos e macrófagos que interagem diretamente no estabelecimento do processo estabelecido por estes agentes. Este comprometimento imunológico celular favorece a liberação de enzimas tóxicas que atuam sobre os neutrófilos, prejudicando a funcionalidade do sistema imunológico do indivíduo infectado (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro no curso da cromoblastomicose tem sido de grande interesse. O mecanismo de defesa do indivíduo influencia na manifestação e severidade da infecção causada pelo fungo (GIMENES *et al.*, 2006). Estudos demonstram que no interior do hospedeiro o fungo adere-se a células epiteliais e se diferencia em células muriformes, que efetivamente resistem à destruição por células efetoras do hospedeiro e assim permite o estabelecimento da doença crônica (GIMENES *et al.*, 2005).

Estes mecanismos de defesa do hospedeiro na cromoblastomicose não têm sido extensivamente investigados, mas estudos da interação do fungo e hospedeiro demonstram uma resposta celular imune predominante, com a ativação de macrófagos e neutrófilos envolvidos na fagocitose do fungo (CORBELLINI *et al.*, 2006). A imunidade mediada por células em pacientes com períodos avançados da doença pode estar prejudicada, sendo estes indivíduos incapazes de uma reação

imune eficiente contra os antígenos fúngicos contribuindo para a persistência deste microrganismo no tecido (SANTOS *et al.*, 2007).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na infecção por *F. pedrosoi* por ativarem uma primeira linha de defesa no organismo. Estas células e seus produtos estão envolvidos no desenvolvimento de uma inflamação granulomatosa e tem uma importância central na ativação de linfócitos T específicos contra os antígenos fúngicos. Porém a eliminação fúngica pelos macrófagos nem sempre é eficiente (BOCCA *et al.*, 2006).

Alguns autores tem observado também a presença de anticorpos do tipo M (IgM), IgG e IgA na resposta imune humoral de pacientes com cromoblastomicose (GIMENES *et al.*, 2005; ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). Outros estudos também sugerem que indivíduos infectados têm uma resposta imune humoral contra um grande número de antígenos fúngicos, incluindo os anticorpos contra a melanina de *F. pedrosoi* (BOCCA *et al.*, 2006).

A imunidade celular é importante na defesa do hospedeiro contra a infecção nos pacientes com cromoblastomicose. Sabe-se que nos estágios avançados da doença a imunidade celular pode estar diminuída, pois estes pacientes são incapazes de desenvolver uma reação imune aos antígenos fúngicos que contribuem para a persistência dos fungos nos tecidos e cronicidade da doença (GIMENES *et al.*, 2005; CORBELLINI *et al.*, 2006).

Os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são importantes no controle da doença, pois *in vitro* quando estimulados com antígenos específicos produzem preferencialmente INF- γ e sabe-se que na ausência destas células ocorre a forma severa da doença, sendo assim, os linfócitos demonstram ser relevantes na proteção e combate contra este microrganismo (SOUZA *et al.*, 2006). A resposta imune determinada pela ativação das células Th1 e Th2, contribui ainda para um melhor entendimento da regulação da resposta imune efetora na cromoblastomicose, pois estas células têm um importante papel no controle ou na resposta exacerbada de infecções severas como na cromoblastomicose (GIMENES *et al.*, 2005).

Sabe-se que os tipos de citocinas predominantes na cromoblastomicose dependem do estágio da doença. Experimentos demonstram que nas formas severas da doença ocorreu principalmente um aumento de produção de interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral (TNF) e diminuição nos níveis de interferon- γ (INF- γ) (BOCCA *et al.*, 2006). Em contraste, pacientes com formas mais brandas da

doença predominantemente produzem INF- γ e baixos níveis de IL-10, ambos com uma eficiente proliferação de células T. Estes resultados indicaram que as células T CD4⁺ foram requeridas na indução da imunidade protetora contra o *F. pedrosoi* (SOUSA *et al.*, 2008).

Neste mesmo trabalho, os resultados indicaram que a interação do fungo com os monócitos indurizam uma cascata de reações e a produção de citocinas inflamatórias (SOUSA *et al.*, 2008). Conforme ESTERRE E COLABORADORES (2000), pacientes com a forma mais severa da doença, com múltiplas lesões apresentaram altos títulos de anticorpos IgG específicos comparados com pacientes com formas brandas da doença e com lesões localizadas.

Diferentes componentes das células fúngicas como lipídeos e polissacarídeos de parede celular tem sido determinados na patogênese da cromoblastomicose. Outros componentes comuns para diversos fungos, que influenciam no curso da doença por interferir na resposta imune é a melanina, principal antígeno da *F. pedrosoi* e está potencialmente envolvido na ativação de receptores Toll-like (TLR) (BOCCA *et al.*, 2006).

A estimulação destes receptores TLRs por moléculas fúngicas conhecidas como as β -glucanas indicam que o mecanismo imune pode estar envolvido na resposta inata contra a cromoblastomicose. As β -glucanas também são moléculas ligantes envolvidas na ativação de atividade fungicida de neutrófilos e também está associada com o controle da infecção fúngica (BOCCA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

Sabe-se que a habilidade do microrganismo patogênico em produzir estes pigmentos tem sido associada com a sua virulência, assim como ocorre com *F. pedrosoi*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus* e *Blastomyces dermatitidis* (BOCCA *et al.*, 2006).

A melanina parece contribuir com a virulência por reforçar a resistência das células fúngicas quando o sistema imune do hospedeiro é ativado. Este pigmento provavelmente possibilita três mecanismos: a redução da fagocitose, a proteção dos fungos contra as enzimas hidrolíticas produzidas por macrófagos e contra os derivados de oxigênio e nitrogênio (BOCCA *et al.*, 2006). A presença da melanina tem um efeito inibitório na patogênese clássica e proteção contra a destruição do *F. pedrosoi* por células imunes do hospedeiro, sendo que neste fungo é constituída de

carboidratos (manose, galactose e glucose), além de aminoácidos e ácidos graxos saturados (ALVIANO *et al.*, 2003), (BOCCA *et al.*, 2006). O mecanismo como este fungo evade o sistema imune e persiste nos tecidos humanos ainda não é conhecido, mas sabe-se que a produção da melanina protege o fungo contra a ativação de macrófagos e neutrófilos (BOCCA *et al.*, 2006).

Estudos recentes sugerem novos dados sobre a importância da melanina. Segundo ALVIANO E COLABORADORES (2009), possivelmente a secreção deste pigmento poderia induzir uma resposta celular e humoral protegendo o hospedeiro contra a cromoblastomicose. Neste trabalho, os níveis de fagocitose por neutrófilos em conídios e células escleróticas do fungo foram reforçadas pela presença de melanina fúngica, sugerindo a ativação destas células fagocíticas. Esta hipótese foi sustentada devido ao fato que foi visto o aumento da explosão oxidativa de neutrófilos na presença de células do *F. pedrosoi*.

Como neste estudo as análises foram realizadas *in vitro* sugere-se que seja pesquisada a concentração da melanina *in vivo*, porque sabe-se que ela possibilita a neutralização dos anticorpos do hospedeiro conforme visto anteriormente (ALVIANO *et al.*, 2009).

2.7 TESTES BIOQUÍMICOS

A caracterização dos exopolissacarídeos e polissacarídeos são iniciados primeiramente por sua purificação. Para analisar a estrutura de um polissacarídeo é necessário determinar os tipos de resíduos monossacarídeos que constituem o composto biológico (BARBOSA *et al.*, 2004). Portanto, para investigar as propriedades e reações dessas moléculas é necessário primeiro isolá-las e purificá-las até a homogeneidade (CORRADI *et al.*, 2006).

A primeira medida a ser tomada a respeito da análise estrutural de um polissacarídeo é conhecer os resíduos monossacarídeos que o constituem. Os polímeros possuem velocidades de hidrólise diferentes que variam de acordo com a configuração anomérica e natureza das ligações glicosídicas, conformação dos monossacarídeos, presença de grupos funcionais na molécula, intensidade das interações intra e intermoleculares e outras (CORRADI *et al.*, 2006).

Com o advento de métodos cromatográficos, a determinação da composição monossacarídica é relativamente simples. Para isto, é imprescindível

que este EPS e polissacarídeos sejam, antes, hidrolisados em suas unidades constituintes. Os métodos como ressonância magnética também podem ser utilizados (BARBOSA *et al.*, 2004).

A cromatografia em papel, uma técnica simples e de baixo custo, é utilizada para identificar qualitativamente os monossacarídeos, obtidos por hidrólise, do EPS. A cromatografia em camada delgada utilizada para o mesmo fim apresenta melhor resolução e rapidez, quando comparada à cromatografia em papel. Existem ainda métodos mais sensíveis e rápidos como a cromatografia em fase gasosa (GLC) e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (CHAPLIN, 1994).

Outra forma de obtenção de polissacarídeos pode ser a hidrólise ácida parcial de β -glucana. O tipo de ácido, sua concentração e as condições de hidrólise (tempo e temperatura) devem ser padronizados para se obter os oligossacarídeos de interesse (SILVA *et al.*, 2008).

A análise de metilação, uma das técnicas mais comuns na caracterização de polissacarídeos, é usada para estabelecer a posição da ligação glicosídica e o tipo de anel dos açúcares constituintes. Esse conjunto de análises, realizado permite caracterizar concretamente as estruturas químicas dos polissacarídeos e EPS (MONTREUIL, 1994).

Embora a metilação seja considerado um dos principais métodos para estudar a estrutura dos carboidratos, não é capaz de proporcionar informação adequada a respeito da configuração anomérica e do arranjo espacial das várias unidades monossacarídicas (CORRADI *et al.*, 2006).

Métodos espectroscópicos como ressonância magnética nuclear e infravermelho são também utilizados para identificar a configuração das ligações glicosídicas dos polissacarídeos (GORIN, 1980; SCHMID *et al.*, 2001). A ressonância magnética baseia-se na observação de que núcleos magnéticos tais como hidrogênio, carbono, fósforo e nitrogênio podem absorver energia em frequências características, quando colocados em um campo magnético forte (CORRADI *et al.*, 2006).

Outra análise espectroscópica também utilizada para estudo de polissacarídeos como as glucanas é o infravermelho que, mesmo fornecendo espectros complexos, é usualmente aplicado à identificação de características estruturais específicas, como a configuração das ligações glicosídicas, a presença

de ácido urônico, através do sinal característico da carbonila e, até mesmo, a presença de proteína (CORRADI *et al.*, 2006).

2.8 TESTES IMUNOLÓGICOS

Algumas metodologias têm sido empregadas para identificação sorológica e o diagnóstico da cromoblastomicose e feohifomicose. Testes como reações de imunodifusão dupla (DID), contraímuno eletroforese (CIE) e entre os mais utilizados os testes imunoenzimáticos (ELISA), que evidenciam alta sensibilidade e especificidade (VIDAL *et al.*, 2003).

Segundo Vidal e colaboradores (2003), em estudo realizado sobre as técnicas de imunoprecipitação e ELISA na detecção de anticorpos anti-*Fonsecaea pedrosoi* na cromoblastomicose, demonstraram 78% de sensibilidade e 83% de especificidade. Estes resultados indicaram que as reações sorológicas podem ser uma ferramenta útil no auxílio diagnóstico desta infecção, quando a cultura do agente não for possível.

Alguns testes intradérmicos de hipersensibilidade da pele também estão sendo utilizados na pesquisa epidemiológica destas infecções fúngicas. Estes testes podem ser úteis para avaliar a exposição primária destes agentes na cromoblastomicose e feohifomicose, pois podem indicar as respostas inflamatórias mediadas por células T por antígenos exógenos ou autoantígenos, sendo frequentemente usados para avaliar uma ampla variedade de patógenos (CORBELLINI *et al.*, 2006).

Considerando a importância destes polissacarídeos e suas diversas aplicações, em especial na área clínica, a caracterização dos fungos patogênicos, como o *Fonsecaea monophora*, agente da cromoblastomicose é fundamental para melhor entendimento e elucidação de sua patogênese, visto que estes polímeros podem estar relacionados com a virulência destes microrganismos.

Os dados deste trabalho também podem contribuir em novos conhecimentos imunogênicos sobre os polissacarídeos e glicoconjugados, uma vez que, estes polímeros podem influenciar no reconhecimento do fungo pelas células do sistema imune do hospedeiro. Sabe-se ainda que as moléculas presentes nas ligações entre estes polissacarídeos e ausentes no hospedeiro humano têm sido

descritas entre diversos fungos patogênicos, como um antígeno diferencial entre fungo e hospedeiro permitindo a indução de citocinas e do sistema imune.

Estudos com estes polímeros na área clínica ainda não são muito desenvolvidos, principalmente utilizando técnicas bioquímicas, como cromatografia e RMN, sendo relevantes novos dados para estudos futuros, com perspectiva da produção de testes rápidos e imunogênicos entre outras pesquisas que colaborem com o auxílio no diagnóstico e tratamento da cromoblastomicose que pode ser fatal em pacientes imunocomprometidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Linhagens utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de *F. monophora* de origem clínica e ambiental: a linhagem MMHC82 (CBS 102248) isolada de lesões de cromoblastomicose gentilmente cedida pelo setor de micologia do Hospital de Clínicas da UFPR/Curitiba e a linhagem FE5p4 (CBS 102225/DH 11584) procedente de fonte ambiental isolada de madeira em decomposição da área do Centro Nacional de Pesquisas de Florestas – CNPF/EMBRAPA no município de Colombo-PR, Região Metropolitana de Curitiba-PR. Estas amostras já foram caracterizadas morfolologicamente e geneticamente no CBS (Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal), Holanda, (HOOG *et al.* 2004; VICENTE *et al.*, 2008).

3.1.2 Soro humano

Para os ensaios imunológicos foram utilizadas doze (12) amostras de soro de pacientes portadores de cromoblastomicose e seis (6) amostras de indivíduos livre da doença. As quais foram gentilmente cedidas pelo setor de micologia do Hospital das Clínicas da UFPR/Curitiba. A manipulação deste material biológico de origem humana foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR, número de registro 2126.021/2010-01(ANEXO).

O critério de inclusão das amostras na soroteca do Hospital de Clínicas foi à comprovação do diagnóstico da cromoblastomicose por exame micológico direto, cultura e/ou histopatológico. O critério de exclusão das amostras foi à realização destes exames e os seus resultados foram considerados negativos para o exame micológico direto cultura e/ou histopatológico.

3.2 MANUTENÇÃO E REPIQUE DOS ISOLADOS

Os fungos isolados foram repicados em frascos com Àgar Sabouraud e incubados a 36°C. Após o crescimento, estes frascos foram mantidos a 4°C e estocados. Os repiques eram repetidos a cada quarenta dias.

METODOLOGIA

3.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

As linhagens MMCH 82 e FE5p4 de *F. monophora*, foram inoculadas em 250 ml de meios de cultura, Czapeck-dox (CD) à base de sacarose e meio Mínimo (MM), composto por glicose, contidos Erlenmeyers. Estes foram submetidos a uma temperatura de 37°C sob agitação durante 24 horas.

Após 24 horas de incubação, uma alíquota de 19 ml foi retirada de cada meio de cultura, usando pipeta de vidro esterilizada. Do volume obtido, 1 ml foi separado e congelado para posterior análise da sacarose, enquanto que os 18 ml restantes foram acrescidos um volume de 54 ml de etanol, permitindo a precipitação do EPS, o mesmo procedimento foi realizado para o polissacarídeo de parede. Todo esse processo foi repetido de dois em dois dias, num total de vinte dias de incubação para cada amostra isolada.

As curvas de crescimento da biomassa e de produção de EPS foram feitas usando a biomassa retida na filtração a vácuo, após a liofilização, e com o precipitado de EPS (produto de filtração liofilizado).

Além das curvas de crescimento e produção de EPS foram analisados os consumos de sacarose no meio CD e glicose no meio MM. A metodologia empregada na quantificação de glicose procedeu com o uso do *Kit* pelo método colorimétrico de glicose oxidase. Para a dosagem de sacarose o método utilizado foi

cromatografia em camada delgada CCD, como padrões foram utilizadas soluções de sacarose em diferentes concentrações. Os resultados observados com a revelação com orcinol, da placa de cromatografia foram analisados através da construção de gráficos (SASSAKI *et al.*, 2001).

3.4 EXTRAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Após o cultivo das linhagens em estudo, o EPS nativo foi obtido por precipitação etanólica (3:1,v/v) do meio residual, separado da biomassa por centrifugação a 12.000 G por trinta minutos, deixado a -20°C *overnight* por 18 horas. Após este período, a solução resultante foi centrifugada a 8.400 G por dez minutos. Foi realizada diálise aberta com água corrente através de membranas com limite de exclusão de 16 kDa por 48 horas. Este produto foi liofilizado, mas não foi purificado.

3.5 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE MICÉLIO

A extração aquosa foi realizada em autoclave com pressão de 1 atm a 120°C por quarenta minutos. Os polissacarídeos foram obtidos por precipitação etanólica (3;1,v/v) do meio residual, separado do micélio, por centrifugação a 12.000 G por trinta minutos, deixado a -20°C *overnight* por 18 horas. Após este período, a solução resultante foi centrifugada a 8.400 G por dez minutos. Foi realizada diálise aberta com água corrente através de membranas com limite de exclusão de 16 kDa por 48 horas. Este produto foi liofilizado, mas não foi purificado.

3.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EPS E POLISSACARÍDEOS

Determinação da composição Monossacarídica

3.6.1 Hidrólise ácida total

Alíquotas de polissacarídeos (~ 1mg) foram tratadas com 1 ml de ácido trifluoracético (TFA) 2M, durante 8 horas a 100°C *overnight* ou com 1 ml de ácidotrifluoroacético (TFA) 1M *overnight* (12 horas) a 100°C (CORRADI, *et al.*, 1993; SASSAKI *et al.*, 2001). Após este período, o ácido foi eliminado por evaporação até

secagem. Os monossacarídeos formados foram submetidos ao processo de redução e acetilação, conforme descrito no item 3.6.2

3.6.2 Redução e acetilação

Os monossacarídeos obtidos pela hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH_4) em temperatura ambiente até pH 9-10, sendo mantidos a temperatura ambiente de 25°C por 12 horas. Após este período, o material foi neutralizado com resina catiônica, até pH 7, para remoção do sódio, as amostras foram então filtradas e levadas à secagem sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol, em rotavaporador, até remoção total do ácido bórico, na forma de borato de trimetila (CORRADI *et al.*, 1993; SASSAKI *et al.*, 2001).

O material resultante foi acetilado com mistura de anidrido acético (Ac_2O) e piridina, 1:1 (v/v), mantidos a temperatura ambiente *overnight* (em torno de 12 horas). A reação foi interrompida por adição de gelo e os derivados acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina e o anidrido acético residual presente no extrato clorofórmico foram removidos por sucessivas lavagens com solução de sulfato de cobre a 5%. Após a lavagem, a fração clorofórmica foi desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão e seco em temperatura ambiente (CORRADI *et al.*, 1993; SASSAKI *et al.*, 2001).

Após secagem, os acetatos de alditóis obtidos foram analisados por detecção espectrometria de massa cromatográfica líquida gasosa (GLC).

3.6.3 Metilação

Uma alíquota (1mg) do polissacarídeo foi solubilizada em 1 ml de dimetilsulfóxido (Me_2SO). Após a solubilização foi adicionado 1 ml de iodeto de metila (CH_3I) e hidróxido de sódio (NaOH). Seguindo de agitação agitada vigorosa por 30 minutos, foi adicionado água, ácido acético e clorofórmio e lavado até ficar com pH 7, a água foi removida e o filtrado contendo clorofórmio foi evaporado à temperatura de 25°C e liofilizado (CIUCANU; KERK, 1984).

Os polissacarídeos *per-O*-metilados foram hidrolisados com 0,5ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% em banho de gelo, após 1 hora foram adicionados 4 ml de

água e o material mantido em estufa a 100°C por 12 horas. A solução foi neutralizada com carbonato de bário e centrifugada a 12.000 G, o sobrenadante foi filtrado e os monossacarídeos per-O-metilados foram reduzidos (NaBH_4), acetilados conforme item 3.8.1 e analisados por GC-EM.

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM)

A determinação da composição monossacarídica foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-EM).

As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso de massa VARIAN-SATURN 2000, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225-MS. As injeções nas colunas foram realizadas com temperatura inicial do cromatógrafo de 50°C (mantida por 1 minuto), com aumento gradual em uma razão de 40°C.min⁻¹ até 210°C (acetatos de alditóis parcialmente O-metilados) ou 220°C (acetatos de alditóis), sendo mantidas isotermicamente até o final da análise por 30 minutos e hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹.

3.7.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a dosagem de sacarose o método utilizado foi cromatografia em camada delgada CCD, como padrões foram utilizadas soluções de sacarose em diferentes concentrações estabelecidas como 2,5, 5 e 10 mg/ml. Foi usado 1 ml do meio de CD a base de sacarose para os diferentes dias de cultivo, num total de vinte dias. Os resultados observados com a revelação com orcinol da placa de cromatografia foram analisados através da construção de gráficos. Estes gráficos foram feitos através da construção da curva padrão de sacarose e das amostras obtidas nos diferentes dias de crescimento (SASSAKI *et al.*, 2001).

3.7.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN 2D $\{^1\text{H};^{13}\text{C}\}$ HSQC foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE III 400 MHz, incorporados a transformador de Fourier, do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram analisadas em “probe” inverso de 5 mm de diâmetro, à temperatura de 30, 50, 70°C, com as amostras sendo solubilizadas em óxido de deutério (D_2O) contendo 1mM de Na^0 . Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D_2O foram expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ^{13}C e ^1H da acetona em δ 30,20 e 2,22, respectivamente.

3.7.4 Análise quimiométrica

A análise quimiométrica, quimiometria ou ainda análise multivariada, denominado reconhecimento de padrões destina-se a agrupar as amostras com características semelhantes e distingui-las das demais, que por sua vez, poderão vir a formar outro grupo. Nas análises exploratórias multivariadas, todos os dados obtidos sobre as amostras em questão são organizados em uma única planilha, a qual é constituída por “n” amostras e “i” variáveis, resultando em uma matriz “n x i”. Desta forma, nos espectros de RMN de ^1H , por exemplo, as amostras são os próprios espectros e as variáveis são as intensidades (áreas) dos sinais nos espectros (Manual Amix, 2008). O reconhecimento de padrão utilizado neste estudo foi a análise por componentes principais (PCA) que é baseada na suposição de que quanto mais semelhantes as amostras forem entre si mais próximas estarão em um espaço multidimensional.

3.7.4.1 Análise por Componentes Principais

A análise por componentes principais (PCA) descreve a variância de um conjunto de dados multivariados em termos de um conjunto de variáveis ortogonais subjacentes, denominadas componentes principais (PC). As variáveis originais, como os valores obtidos pelas áreas formadas no GC-EM pelos componentes metilados, por exemplo, formam a matriz X e podem ser expressas como uma combinação linear específica das componentes principais. A plotagem dos dados no

espaço definido por duas ou três PCs que possuam os maiores valores de variância explicada propicia um meio rápido de visualizar as similaridades e diferenças entre o conjunto de dados, possivelmente permitindo a discriminação das amostras (BEEBE *et al.*, 1998; SUMNER *et al.*, 2003).

Os componentes metilados e os espectros de RMN adquiridos pelas amostras das linhagens fúngicas nos dois diferentes meios foram submetidos à análise quimiométrica por este método e com auxílio dos programas computacional R e AMIX, desenvolvido especialmente para realizar análises multivariadas de dados da metilação e do RMN. Para o RMN a região do espectro utilizada para as análises quimiométricas foi de δ 0,40 a 4,50 dividida em intervalos (*buckets*) de 0,01 ppm. Os métodos de integração e pré-processamento usados foram respectivamente soma das intensidades absolutas e escalamento em relação à intensidade total dos sinais, métodos providos pelo programa.

3.7.4.2 Análise Proporcional do EPS e polissacarídeo para as linhagens diferentes

Para obter uma relação comparativa entre os valores encontrados na análise dos monossacarídeos, foi realizada a análise proporcional, representada em valores percentuais, resultante da confrontação entre os valores dos EPS e polissacarídeos de parede. Estes valores foram analisados para as diferentes espécies (MMHC82 e FE5p4) entre os meios de cultura (CD e MM). Ao fim deste cálculo foi possível observar o aumento ou diminuição relativa entre os monossacarídeos presentes nos meios. O cálculo foi realizado pela divisão simples entre os valores absolutos dos monossacarídeos encontrados, tendo no numerador o valor da linhagem FE5p4 e no denominador o valor da linhagem MMHC82 no mesmo meio de cultivo. O quociente desta divisão é o índice de aumento relativo (caso seja maior do que 1) ou de diminuição relativa (caso esteja entre 0 e 1), o que significa dizer o quanto de aumento ou diminuição ao se comparar os valores. O cálculo da percentagem requer que este índice seja diminuído no valor 1 (um) e o resultado seja multiplicado por 100 (cem) chegando desta forma ao valor percentual representado.

3.8 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS

As amostras de soro de pacientes portadores de cromoblastomicose (item 3.1.2) foram avaliadas visando determinar capacidade de reação na formação de imunocomplexos como consequência da reação entre o anticorpo do soro frente às glicoproteínas dos polissacarídeos de parede das linhagens de *F. monophora*.

3.8.1 Preparação da placa de ELISA

O teste de ELISA foi realizado com o antígeno da glicoproteína presente na composição do monossacarídeo do fungo *F. monophora*. Placas Falcon de 96 wells foram sensibilizadas com 100uL de uma solução de 10 µg/ml dos antígenos monossacarídicos durante o período de 12-16 horas a 4° C.

3.8.2 Reação Imunoenzimática

Após a sensibilização, a placa de poliestireno foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (0,05% Tween-salina) e bloqueadas com a solução de bloqueio (caseína a 2% diluída em PBS), por 2 h à 37 °C.

Após esta etapa, a placa foi novamente lavada conforme descrito acima e incubada com os soros de pacientes, diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% tween 20). Como controle negativo foi utilizado soro procedente de indivíduos livres da doença.

O segundo anticorpo adicionado na placa consistiu de imunoglobinas anti IgG imuno Fc específico com a enzima peroxidase (Sigma, diluído 1:1000 em tampão de incubação). A atividade enzimática foi revelada utilizando a solução ortofenilenodiamino (OPD); após 15 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico diluído 1:20. As leituras da absorbância foram feitas a 492nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os exopolissacarídeos de *F. monophora* e polissacarídeos da sua parede celular foram avaliados quanto a sua composição monossacarídica nos diferentes meios de cultura e analisados durante a sua produção.

Durante o processo para a produção de EPS, um grande percentual de biomassa também foi obtido. Entretanto, as quantidades de massa micelial e EPS não são necessariamente proporcionais, sendo dependentes dos diferentes fatores utilizados no cultivo, tais como fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, agitação, grau de aeração, entre outros (FUKUDA *et al.*, 2009).

Após vinte dias necessários para o crescimento micelial e para a produção de exopolissacarídeo (EPS), a biomassa fúngica foi separada por centrifugação e uma alíquota do meio líquido foi precipitada com etanol, fornecendo a fração contendo o EPS, a extração dos polissacarídeos de parede também foi realizada.

Estes exopolissacarídeos foram analisados por métodos químicos e espectrométricos e os polissacarídeos de parede também passaram por processos descritos anteriormente (Item 3.7). Além disso, estes polissacarídeos foram avaliados quanto a sua atividade imunogênica.

4.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

A glucose e a sacarose têm sido as fontes de carbono mais utilizadas para a produção de biomassa e EPS fúngicos (BAE *et al.*, 2000). As concentrações destes açúcares usados para a produção destes compostos variaram distintamente para cada linhagem do microrganismo analisado. Por isto, a importância de avaliar o seu crescimento, a influência destes açúcares, produção de exopolissacarídeos e biomassa nos diferentes meios de cultivo pelo fungo *F. monophora*.

4.1.1 Curva de crescimento de Biomassa

Para avaliar o crescimento das linhagens do fungo *F. monophora* (FE5p4 e MMHC82) foram testados dois diferentes meios de cultura: o meio Mínimo (MM), a base de glucose como fonte de energia para o crescimento das amostras, e o meio Czapeck-dox (CD) a base de sacarose. Em ambos, foi quantificado a biomassa e a

produção dos exopolissacarídeos fúngicos (EPS). Esta análise foi feita depois do cultivo das linhagens em meio Sabouraud.

As amostras foram posteriormente inoculadas em dez Erlenmeyers para monitoramento durante vinte dias, sendo retiradas as alíquotas de dois em dois dias para determinar a construção das curvas. Os resultados foram representados pela curva de crescimento da biomassa para as linhagens FE5p4 e MMHC82 de *F. monophora* (FIGURAS 1 e 2).

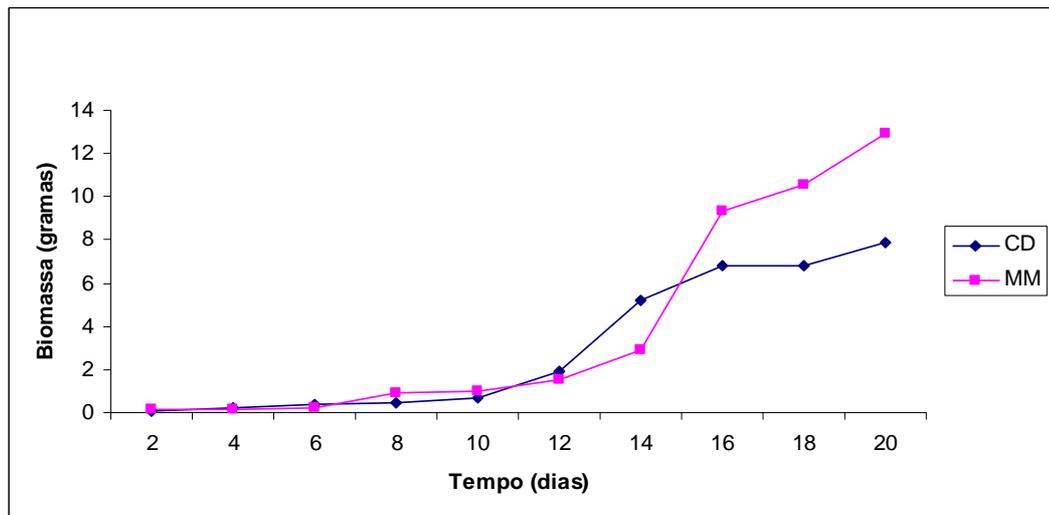


Figura 1 - Curvas de crescimento da biomassa obtida para a linhagem FE5p4 de *Fonsecaea monophora* procedente de origem ambiental

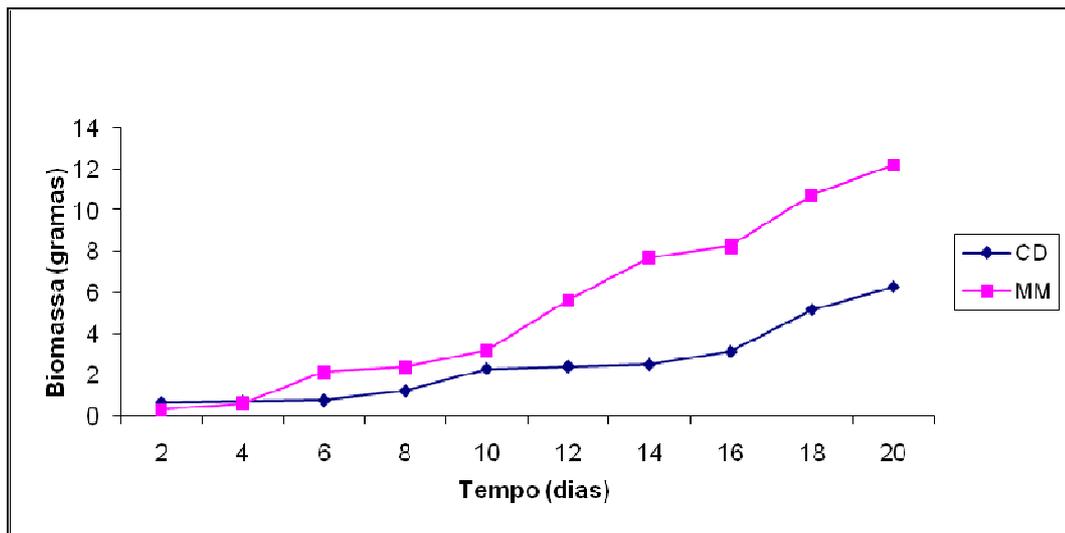


Figura 2 - Curvas de crescimento da biomassa obtida para a linhagem MMHC82 de *Fonsecaea monophora* procedente de amostra clínica

A biomassa teve um aumento significativo a partir do oitavo dia de crescimento, sendo que o melhor meio de cultivo para obtenção da biomassa tanto para a linhagem FE5p4 quanto para a linhagem MMHC82 foi o meio de cultura MM. Assim como estudos realizados comprovaram que quando um substrato orgânico como sacarose e glucose são adicionados ao meio, a biomassa aumenta consideravelmente proporcional a produção de EPS (KAWAI *et al.*, 2006).

Segundo HESS E COLABORADORES (2006), utilizando meio de cultivo a base de sacarose, adicionados de diferentes lipídeos, ou seja, tornando-os mais enriquecidos, em diferentes concentrações, avaliando o crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus*, concluiu-se que estes meios quando adicionados de lipídeos, dependendo de suas concentrações, são mais indicados para a produção de biomassa, polissacarídeos e exopolissacarídeos.

4.1.2 Curva de glucose

As fontes de carbono e energia constituem os principais componentes do meio nutriente em um processo de cultivo, as quais precisam assegurar bom crescimento do microrganismo e rendimento do produto desejado. A produção de EPS em diferentes fontes de carbono tem sido relatada em vários trabalhos de literatura científica, e segundo Selviour e colaboradores (1992), se a fonte de carbono é metabolizada pelo fungo, ele também produzirá EPS, embora nem sempre na mesma extensão que a biomassa.

A partir das alíquotas retiradas do meio de cultura MM nos vinte dias consecutivos do experimento, cuja fonte de açúcar é a glucose, foi dosada a concentração deste açúcar nos dias de crescimento, para verificar seu consumo. Estas análises foram demonstradas para as linhagens FE5p4 e MMHCp82 de *F. monophora* (FIGURA 3).

Estes gráficos foram elaborados a fim de avaliar o comportamento das linhagens do fungo *F. monophora* diante desta fonte de carbono. Pode-se observar que os níveis de glucose do meio de cultura MM diminuem ao longo dos dias, indicando que este açúcar é praticamente todo consumido e que provavelmente tenderia a zero por mais alguns dias de experimento (FIGURA 3). Segundo Guerim (2007), para o fungo *Exophiala spinifera* pertencente à mesma família deste fungo

os níveis de glucose também diminuem ao longo dos dias, indicando um consumo quase que total por volta do vigésimo dia.

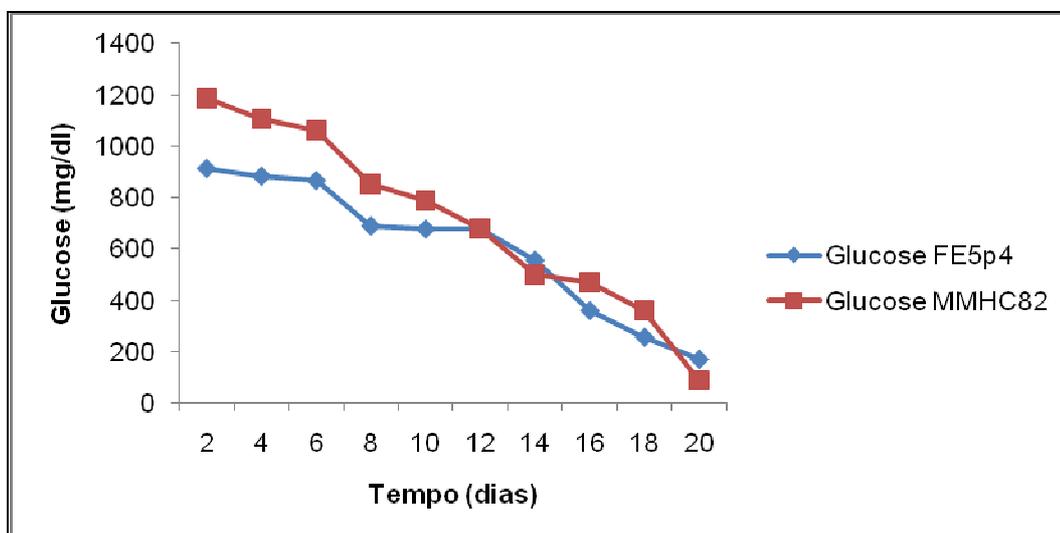


Figura 3 - Curvas de consumo de glucose obtidas para as linhagens de FE5p4 e MMHC82 durante o cultivo em meio MM

4.1.3 Curva de sacarose

Utilizando alíquotas retiradas diariamente do meio de cultura CD, cuja fonte de açúcar é a sacarose, foi determinada o consumo deste açúcar durante os dias do experimento (FIGURA 4). As concentrações foram obtidas usando uma equação da curva padrão com concentrações conhecidas de sacarose e os perfis do consumo de sacarose do fungo *F. monophora* para as linhagens FE5p4 e MMHC82 no meio de cultivo CD (FIGURA 4).

As concentrações de sacarose no meio de cultivo CD foram monitoradas durante os 20 dias de cultivo, podendo observar que os níveis de sacarose diminuem ao longo dos dias e é praticamente consumida e que provavelmente tenderia a zero por mais alguns dias de experimento (FIGURA 4). A escassez da fonte de carbono pode explicar a diminuição de EPS, provavelmente devido à utilização do polissacarídeo como fonte de carbono (BARBOSA *et al.*, 2004).

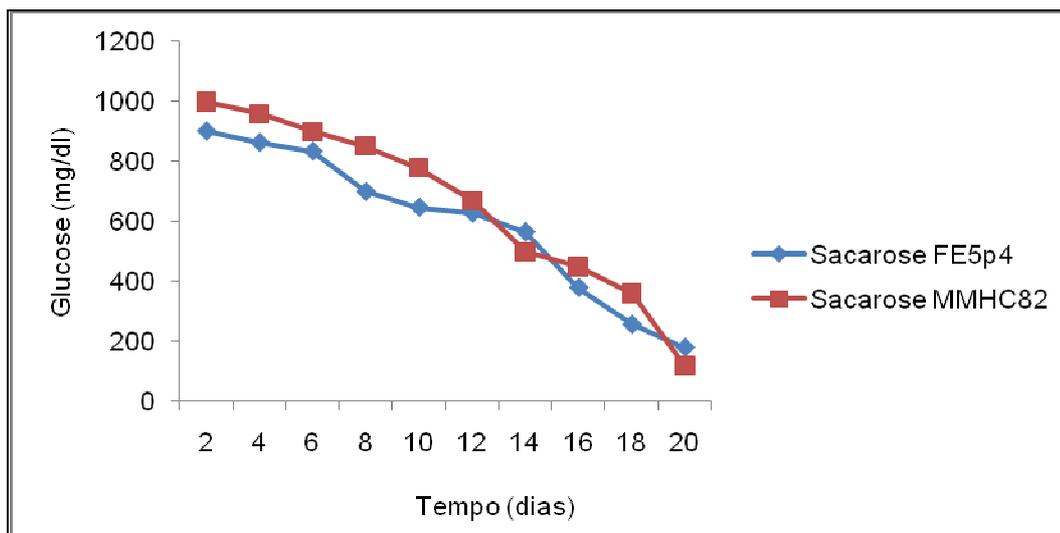


Figura 4 - Curvas do consumo de sacarose obtidas para as linhagens FE5p4 e MMHC82 durante o cultivo em meio CD

4.1.4 Curva de crescimento do Exopolissacarídeo (EPS)

As condições e composição do meio de cultivo interferem diretamente na produção de EPS microbianos. Os microrganismos são adaptados ao meio onde vivem, pois nele existem fatores limitantes como fontes de carbono e nitrogênio, aeração, agitação, microelementos, entre outros (BARBOSA *et al.*, 2004).

O perfil de produção de EPS pelas linhagens FE5p4 e MMHC82 do *F. monophora* foram avaliados nos meios MM e CD (FIGURAS 5 e 6). As curvas de produção destes polissacarídeos foram construídas com o seu monitoramento nos 20 dias consecutivos de crescimento. Amostras de meios de cultivo retiradas foram submetidas à precipitação etanólica (3:1 v/v) para obtenção do EPS e foi realizada diálise em membranas e pesagem após a liofilização. O peso do material seco foi utilizado como fonte de dados para a elaboração dos gráficos (FIGURAS 5 e 6).

Obteve-se uma produção de EPS maior para o meio MM em relação ao meio CD, portanto este meio demonstrou como o melhor meio de cultivo para a produção de EPS conforme resultado das figuras 5 e 6. Segundo Corradi e colaboradores (2006), a fonte de carbono pode determinar a quantidade de polissacarídeos formado, bem como a qualidade do produto sintetizado.

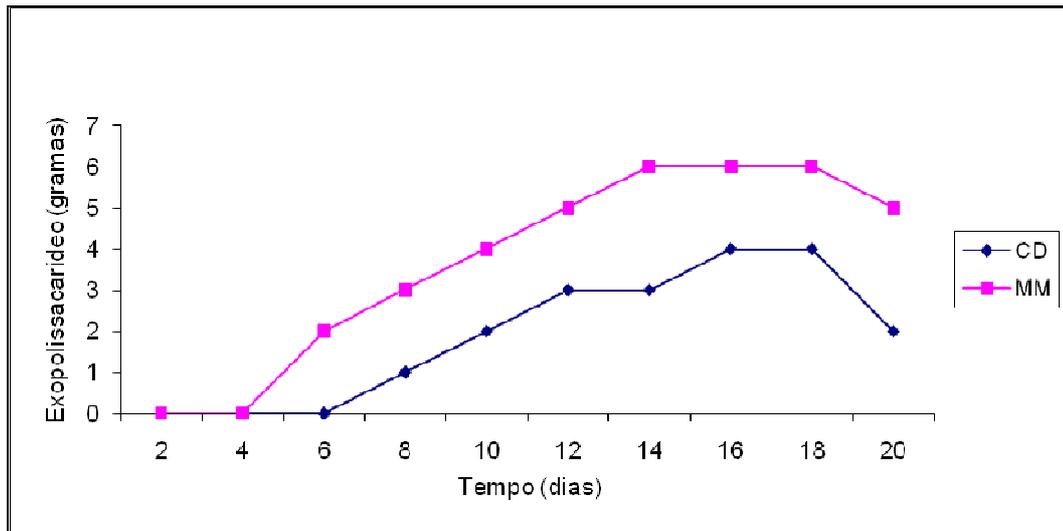


Figura 5 - Curvas de EPS para a linhagem FE5p4

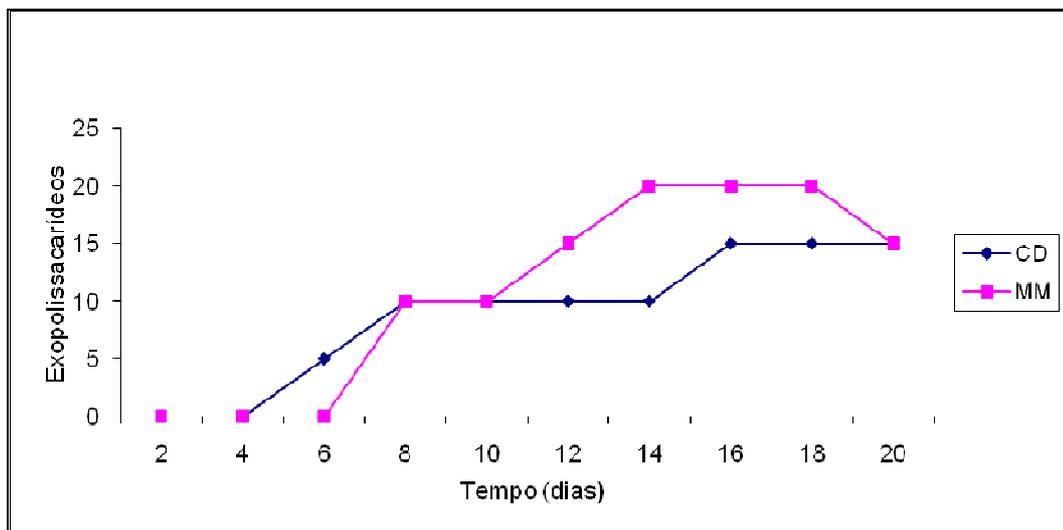


Figura 6 - Curvas de EPS para a linhagem MMHC82

Como as fontes de açúcar não esgotaram totalmente como demonstram os resultados das análises destes açúcares (FIGURAS 3 e 4), os níveis de EPS continuam subindo nas duas linhagens avaliadas durante a fase de crescimento exponencial destes microrganismos e os maiores dias de produção são o décimo sexto se mantendo até o décimo oitavo dia (FIGURAS 5 e 6). Porém a partir do vigésimo dia a produção de EPS tende a diminuir consideravelmente devido ao fato de que o fungo inicia o consumo dos seus próprios exopolissacarídeos a partir do momento em que ocorre a diminuição e quase exaustão das fontes de carbono (açúcar) como foi discutido anteriormente.

Esse comportamento pode ser analisado como uma estratégia de sobrevivência para estes microrganismos e provavelmente o consumo de seus exopolissacarídeos como fonte de carbono, visto que o EPS pode atuar como reserva energética (KAWAI *et al.*, 2006).

No estudo realizado por YURLOVA E HOOG (2002), foram obtidos estes resultados em diferentes quantidades de EPS em variados meios de cultura, porém neste estudo a produção do exopolissacarídeo foi quantificada somente ao final do quinto dia, não sendo feito o controle durante todo o crescimento.

Na produção de EPS por fungos, deve ser considerada a linhagem fúngica escolhida, como também o seu ambiente natural para adequar, em laboratório, o meio de cultivo em termos de características nutricionais (BARBOSA *et al.*, 2004).

O estudo das condições de cultivo também são importantes sobre a produção de EPS, pois, otimizam o rendimento por manipulação da composição do meio, como fontes de carbono, nitrogênio e fatores de crescimento (DUEÑAS *et al.*, 2003).

4.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXOPOLISSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS DE PAREDE

Os EPS obtidos das culturas e os polissacarídeos de parede obtido nos meios de cultivo CD e MM foram hidrolisados e os monossacarídeos obtidos por esta hidrólise foram reduzidos, acetilados e analisados quanto a sua composição na forma de acetatos de alditóis por comatografia gasosa (GLC). Como padrões foram utilizados ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose.

Através da análise foi possível determinar o percentual de cada açúcar presente nas amostras obtidas dos diferentes meios utilizados para o cultivo das linhagens de *F. monophora* (FIGURA 7).

Os EPS produzidos pela linhagem MMHC82 apresentaram maiores quantidades de monossacarídeos como manose, seguido de galactose e glucose, respectivamente, durante o cultivo em meio mínimo, onde verificou-se um percentual de galactose maior em relação à glucose, assim como o observado durante o cultivo em meio CD (FIGURA 7). No estudo feito para avaliar a composição dos carboidratos da melanina purificada deste fungo, também foi comprovada a

presença destes açúcares em maior quantidade na análise cromatográfica (ALVIANO *et al.*, 1991; ALVIANO *et al.*, 2003).

Em outra pesquisa com o fungo *Scedosporium prolificans*, um patógeno oportunista que causa uma infecção localizada em tecidos e ossos em pacientes imunocomprometidos, em comparação com outro fungo *Pseudallescheria boydii*, também oportunista, os monossacarídeos manose e ramnose foram os mais prevalentes na composição do EPS, seguidos de galactose e glucose (BARRETO-BERGTER *et al.*; 2007).

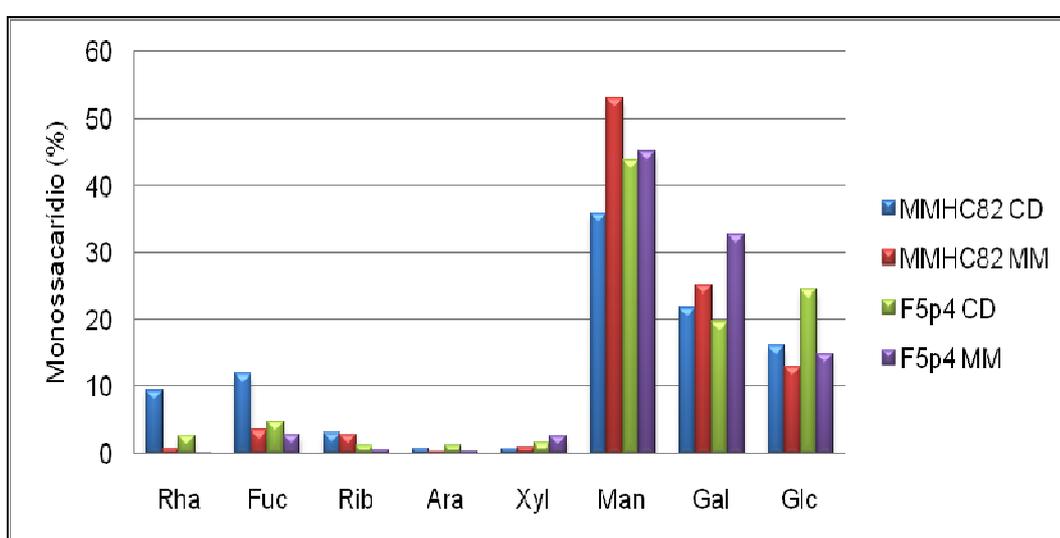


Figura 7 - Composição monossacarídica do EPS das linhagens MMHC82 e FE5p4 para o meio CD e MM

Comparando a proporção dos principais açúcares presentes nos EPS produzidos pelas duas linhagens nos diferentes meios testados, verificou-se que as maiores quantidades de monossacarídeos foram de manose, galactose e glucose, conforme visto anteriormente na figura 7.

Durante esta análise, verificou-se ainda, que a partir do valor encontrado para o açúcar manose foi possível determinar que a quantidade produzida no meio CD pela linhagem de *F. monophora* FE5p4 isolada do ambiente foi 22,3% maior do que a quantidade de produção deste mesmo monossacarídeo da linhagem patogênica MMHC82 sob as mesmas condições de cultivo (FIGURAS 8 e 9). O mesmo não foi observado durante o cultivo meio MM, onde quantidade de manose produzida pela linhagem de procedência ambiental foi 14,9% menor que a quantidade deste açúcar produzido pela linhagem patogênica (FIGURAS 8 e 9).

Assim a quantidade de galactose para a linhagem FE5p4 em meio CD foi 9,7% menor do a que a encontrada na linhagem patogênica (MMHC82), enquanto que para o meio MM foi 29,8% maior a quantidade deste açúcar na linhagem de *F. monophora* isolada do ambiente em relação a linhagem procedente de lesões de cromoblastomicose. Para o monossacarídeo glucose a linhagem sapróbia apresentou 53% maior a quantidade deste açúcar do que linhagem patogênica e no meio MM um aumento de 15% deste açúcar para a linhagem sapróbia (FIGURAS 8 e 9).

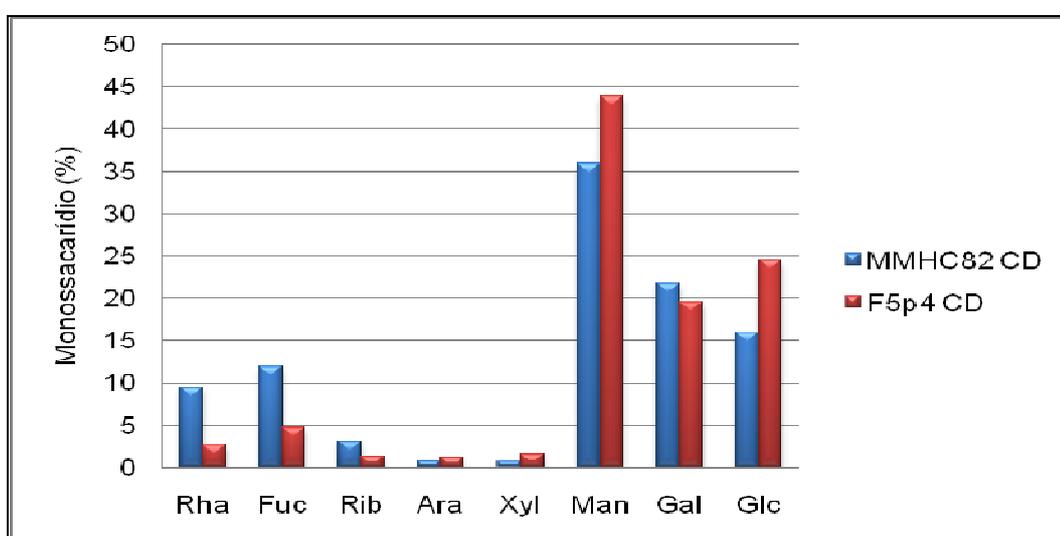


Figura 8 – Proporção da composição monossacarídica do EPS entre as linhagens MMHC82 e FE5p4 para o meio CD

Isto significa que a linhagem isolada do ambiente produziu maior quantidade de EPS para estes monossacarídeos do que a linhagem patogênica, pois provavelmente tenha se adaptado melhor ao meio de cultivo e às condições presentes no experimento, pois sabe-se que para a produção de EPS deve ser considerada não só a linhagem fúngica escolhida, como também o nicho ambiental e adequação as condições de cultivo *in vitro* principalmente no que se refere as *características* nutricionais (DUEÑAS *et al.*, 2003), (FIGURAS 8 e 9).

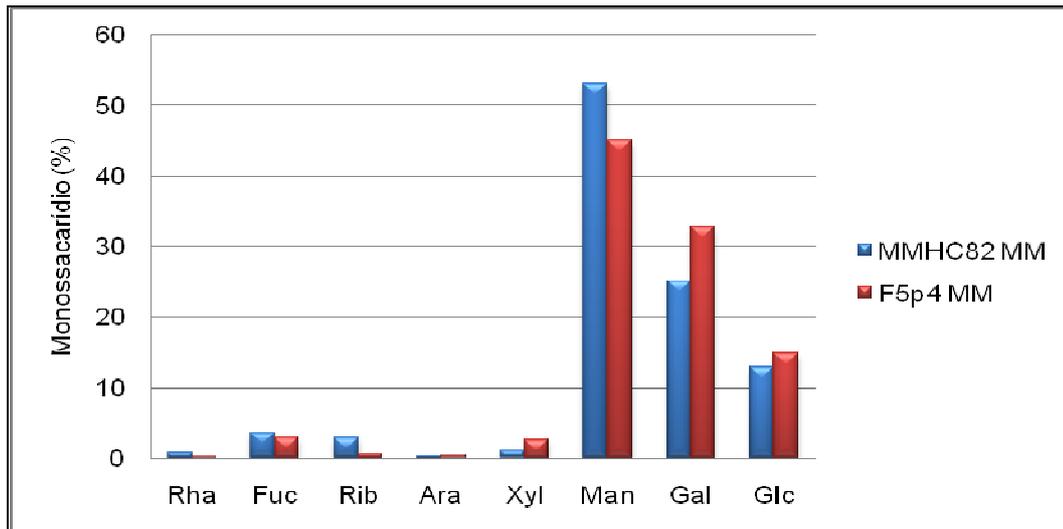


Figura 9 - Proporção da composição monossacarídica do EPS entre as linhagens MMHC82 e FE5p4 para o meio MM

Os polissacarídeos da parede celular produzidos pelas linhagens fúngicas estudadas neste trabalho apresentaram glucose, seguido de manose e galactose respectivamente, e além disso observou-se que tanto em MM quanto em meio CD que os polissacarídeos da parede apresentavam um percentual de glucose maior em relação à manose galactose (FIGURA 10). Da mesma forma no fungo patogênico *Histoplasma capsulatum* ocorre a presença de glucose, seguido de manose e galactose e estes são os monossacarídeos mais abundantes na sua parede celular durante a sua fase leveduriforme e micelial (GOROCICA *et al.*, 2009).

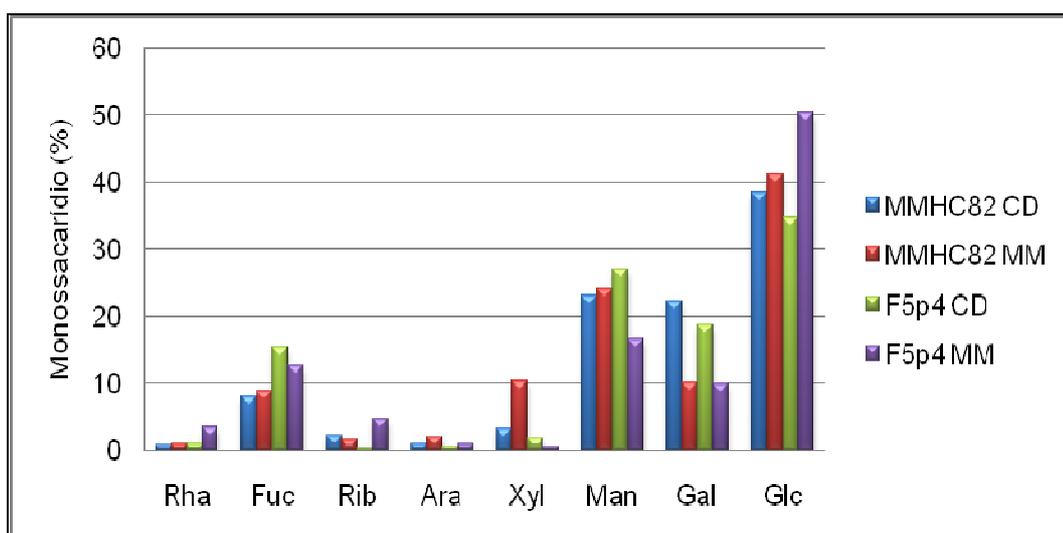


Figura 10 - Composição monossacarídica dos polissacarídeos de parede das linhagens MMHC82 e FE5p4 para os meio CD e MM

Em outras espécies de fungos patogênicos, como *A. fumigatus*, *A. wentii* e *Chaetosartory chrysella*, estas moléculas de manose podem também ser encontradas nas paredes celulares como galactomananas (manoses ligadas a resíduos de galactose) com propriedades químicas e físicas distintas (FUKUDA, 2009). O fungo *H. capsulatum* também apresenta manose, galactose e glucose, com aumento da concentração de manose e galactose, com a presença ainda de aminoácidos e glicoproteínas (DEEP; WOODS, 1999).

Na outra análise realizada, visando identificar os principais açúcares presentes na parede fúngica, conforme já feito para o EPS, os valores encontrados para o açúcar manose mostraram que a quantidade de açúcares presentes na parede da linhagem FE5p4 em meio CD foi 16,4% maior do que a quantidade deste monossacarídeo para a linhagem patogênica MMHC82 em meio CD (FIGURAS 11 e 12). Enquanto que no meio MM verificou-se que a linhagem FE5p4 de origem ambiental, uma quantidade de 31,1% menor de manose em relação a linhagem patogênica (MMHC82). Sendo assim de acordo com estes resultados o meio de cultura parece exercer um papel importante na produção dos polissacarídeos de parede independente da origem de procedência da linhagem.

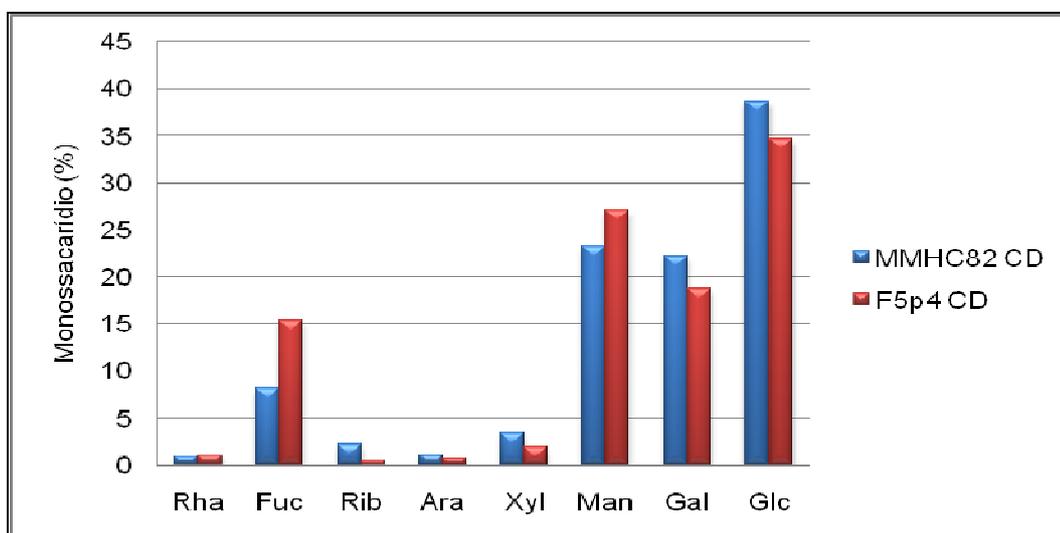


Figura 11 - Proporção da composição monossacarídica dos polissacarídeos de parede entre as linhagens MMHC82 e FE5p4 para o meio CD

A quantidade de galactose para a linhagem FE5p4 obtida no meio CD foi 15,8% menor do que para a linhagem patogênica MMHC82, enquanto que em meio MM foi também observado que a quantidade deste açúcar era 2% menor na

linhagem isolada do ambiente em relação a patogênica. A quantidade do monossacarídeo glucose na linhagem ambiental (FE5p4) foi 10,1% menor do que na linhagem patogênica em meio CD e no meio MM foi verificado um aumento de 22% deste açúcar para a linhagem de procedência ambiental (FIGURAS 11 e 12).

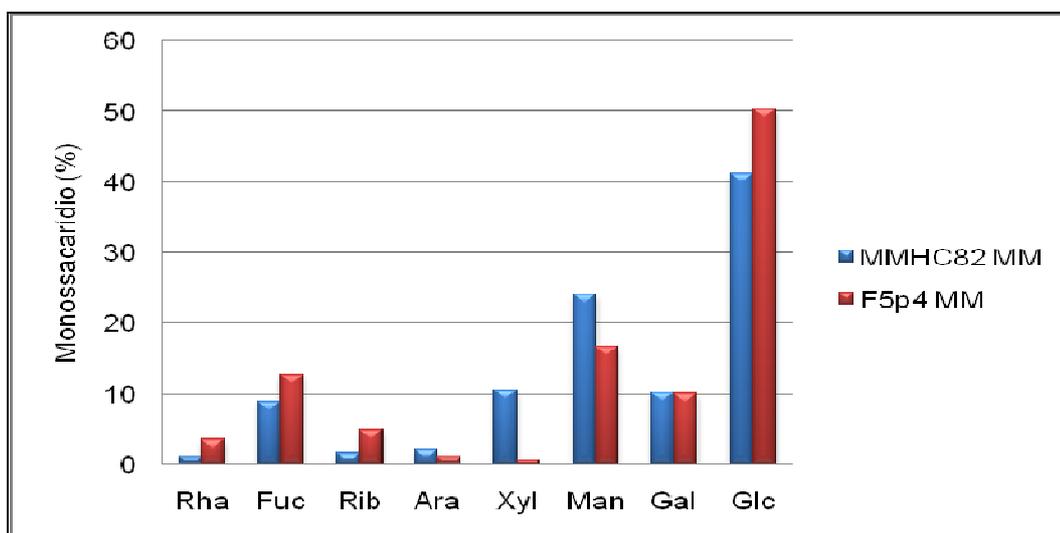


Figura 12 - Proporção da composição monossacarídica do EPS entre as linhagens MMHC82 e FE5p4 para o meio MM

Estes resultados sugerem que produção de polissacarídeos de parede celular da linhagem patogênica foi maior em relação a linhagem isolada do ambiente para a maioria das frações monossacarídicas encontradas, considerando os dois meios de cultivo testados. As sínteses destes polissacarídeos podem representar uma estratégia dos fungos e de alguns microrganismos em condições desfavoráveis (CORRADI *et al.*, 2006). Os fungos patogênicos podem ainda produzir maior quantidade de polissacarídeos de parede, pois o processo de patogenicidade pode estar relacionado com a sua capacidade em produzir estes açúcares (BARBOSA *et al.*, 2004).

4.3 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR NOS MEIOS DE CULTIVO

A determinação da composição monossacarídica em conjunto com as análises de metilação e de RMN 2D $\{^1\text{H};^{13}\text{C}\}$ HSQC, auxiliaram na visualização das

estruturas presentes nos polissacarídeos de parede celular obtidos nos meios de cultivos utilizados (TABELA 1), (FIGURA 13).

As análises de RMN $\{^1\text{H};^{13}\text{C}\}$ HSQC foi importante para determinar a configuração glicosídica das unidades monossacarídicas do polissacarídeos da parede fúngica, especialmente pelos sinais referentes à H-1. Analisando a região anomérica deste espectro para a linhagem MMHC82 para o meio CD, observa-se a presença de sinais correspondentes a unidades na configuração α (δ 101,3/5,21 e δ 98,4/5,01) e na configuração β (δ 108,4/5,10, δ 106,0/5,23, δ 105,3/5,21, δ 103,5/4,73 e δ 103,0/4,50), (FIGURA 13), (GORIN; MAZUREK, 1975).

Analisando a região anomérica deste espectro para a mesma linhagem para o meio MM observa-se a presença de sinais correspondentes a unidades na configuração α (δ 101,3/5,22, e δ 99,1/5,11) e de outras configurações β (δ 108,5/5,10, δ 103,1/4,58, e δ 99,1/4,82), (FIGURA 14), (GORIN; MAZUREK, 1975).

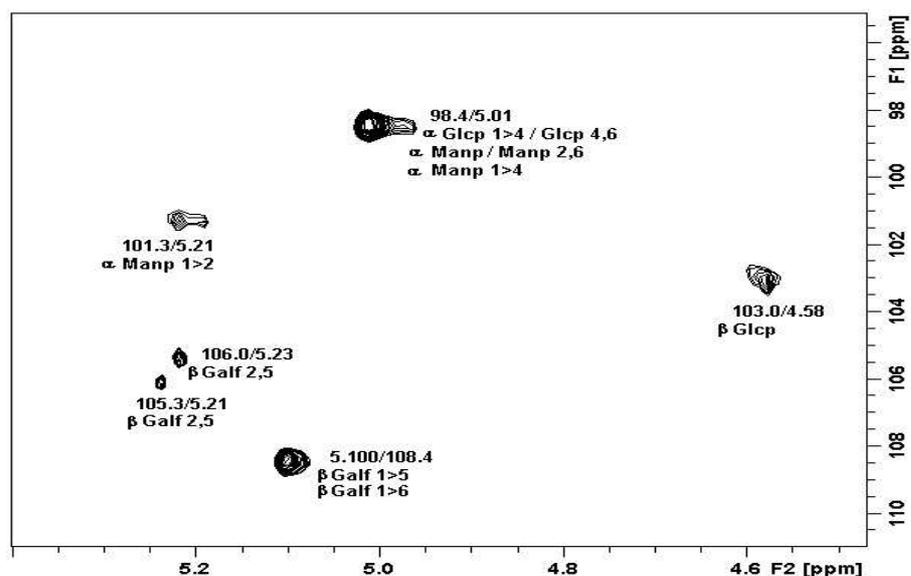


Figura 13 - Análise da região anomérica do espectro da linhagem MMHC82 para o meio CD

As principais diferenças encontrada para esta linhagem entre os dois meios são a presença dos sinais correspondentes a unidades de β -Gal f (δ 106,0/5,23) e (δ 105,3/5,23), (VICCINI, *et al.*, 2009) e no meio CD e de α -Glc p (δ 99,1/5,10; VICCINI *et al.*, 2009) e de α -Man p (δ 99,1/4,82) e (101,3/5,11), (VICCINI *et al.*, 2009), no meio MM (FIGURAS 13 e 14).

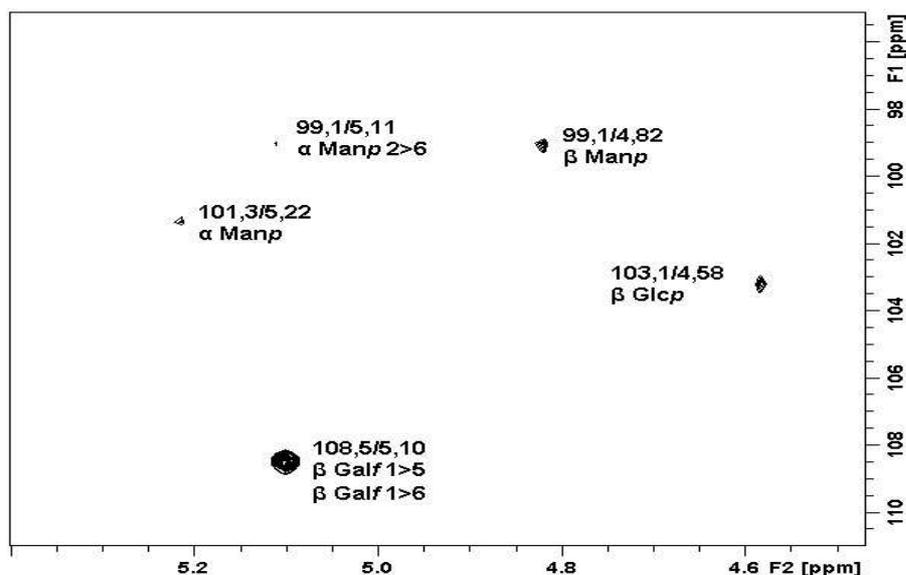


Figura 14 - Análise da região anomérica do espectro da linhagem MMHC82 para o meio MM

Analisando a região anomérica deste espectro para a linhagem FE5p4 para o meio CD observa-se a presença de sinais correspondentes a unidades na configuração α (δ 101,1/5,22 e δ 98,4/5,01) e na configuração β (δ 108,3/5,10, δ 105,9/5,23 e δ 103,0/4,59) da mesma maneira que observado para a linhagem MMHC82 (FIGURA 15), (GORIN; MAZUREK, 1975).

A análise da mesma linhagem para o meio MM também mostra sinais na configuração α (δ 98,9/5,12 e δ 98,2/5,18) e outros na configuração β (δ 108,5/5,10 e δ 105,9/5,24 e δ 102,4/4,63), (FIGURA 16), (GORIN; MAZUREK, 1975), onde as principais diferenças para estas linhagens entre os dois meios são a presença dos sinais referentes a unidades de α -Manp (δ 101,1/5,22), (BARRETO-BERGTER *et al.*, 2008) e (δ 98,4/5,01) (KOMURA, 2006), no meio CD e unidades de α -Glcp (δ 102,4/4,63, δ 99,2/5,18 e 98,9/5,12) no meio MM (FIGURAS 15 e 16), (VICCINI *et al.*, 2009).

As moléculas contendo as ligações Galf têm sido descritas como importantes antígenos entre diversos fungos patogênicos de humanos como o *Paracoccidioides brasiliensis* e como não estão presentes no hospedeiro humano esta moléculas contendo estas ligações poderiam ser um antígeno diferencial entre fungo e hospedeiro permitindo a indução de citocinas e ativação do sistema imune. Anticorpos monoclonais contra estas estruturas estão sendo utilizadas com sucesso na detecção de antígenos circulantes (STYNEN *et al.*, 2006).

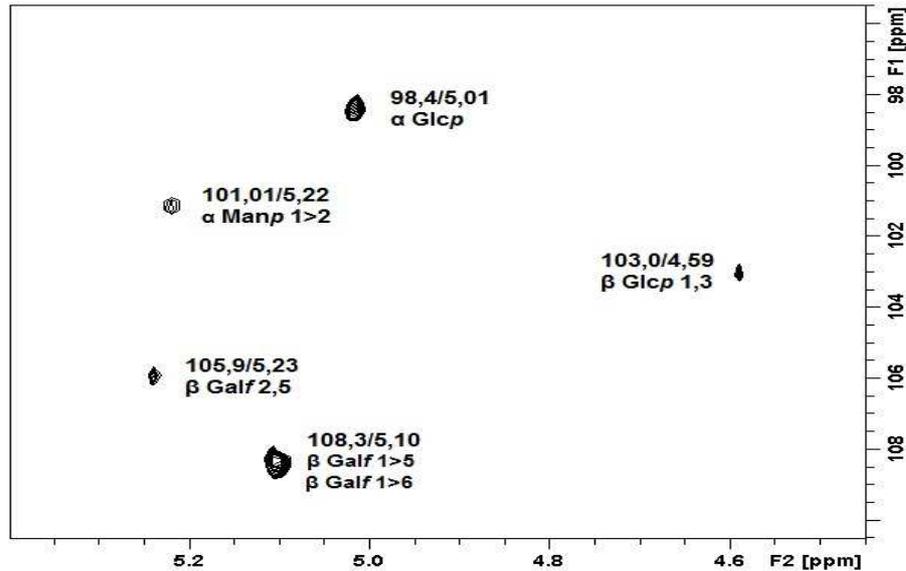


Figura 15 - Análise da região anomérica do espectro da linhagem FE5p4 para o meio CD

O mesmo ocorre com moléculas contendo ligações Manp, antígenos que estimulam a produção de anticorpos e ativação de linfócitos T efetores no combate a doença produzida por este fungo (STYNEN *et al.*, 2006).

Bittencourt e colaboradores (2006), caracterizando a estrutura α -Glcp da parede celular do fungo *P. boydii* avaliando o seu papel na indução da resposta imune inata e concluíram que a remoção desta estrutura causou uma diminuição na indução da fagocitose isto indica um papel da α -Glcp na estimulação de macrófagos e células dendríticas no sistema imune.

Outro componente como a β -glucana tem sido ligado a virulência dos fungos. Quando a parede de *H. capsulatum* contém estas ligações o sistema imune do hospedeiro diminui a produção de citocinas pelos fagócitos, como consequência ocorre a doença provocada pelo fungo (STAHL; EZEKOWITZ, 1998).

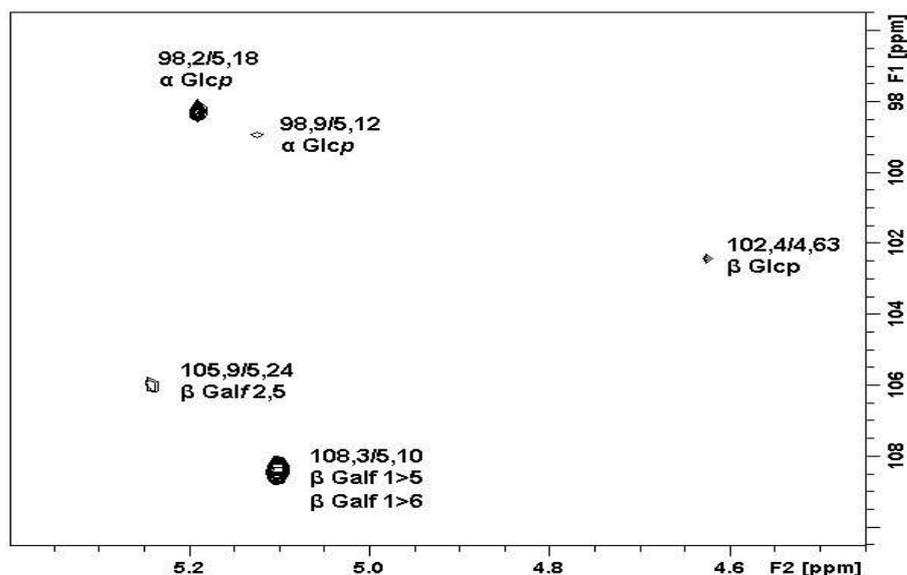


Figura 16 - Análise da região anomérica do espectro da linhagem FE5p4 para o meio MM

As frações polissacarídicas de parede obtidas para as linhagens FE5p4 e MMHC82, apresentaram um grande número de derivados per-*O*-metilados, que pode estar relacionado a presença de uma mistura de polissacarídeos (TABELA 1).

A fração polissacarídica referente a linhagem MMHC82 cultivada no meio CD apresenta-se principalmente composta por unidades de Manp 2,3,6-tri-*O*- (4,2%), 4-*O*- (4,7%) e 6-*O*-substituídas (5,8%), estruturas semelhantes foram descritas por Prieto e colaboradores (2007), Galp 3-*O*- (7,1%) e 6-*O*-substituídas (4,8%), (LEAL *et al.*, 2008), além de unidades de Galf 5-*O*-substituídas (5,4%) e de Glcp 4-*O*-substituídas (5,0%), (GUTIÉRREZ *et al.*, 1996), (SMIDERLE *et al.*, 2006), (GORIN *et al.*, 2010), (TABELA 5), (FIGURA 17). Esta fração apresenta principalmente Glcp (15,5%), Manp (19,5%) e Galf (14,4%) como terminais não redutores (VICCINI *et al.*, 2009).

A fração polissacarídica obtida a partir da mesma linhagem acima, mas cultivada no meio de cultivo MM, apresenta derivados parcialmente metilados similares àqueles obtidos quando este mesmo fungo foi cultivado no meio CD, com algumas diferenças. Neste caso, esta fração apresenta-se principalmente formada por unidades de Galp (1→3) ligadas (7,0%) (LEAL *et al.*, 2008), Galf (1→6) ligadas (5,2%) (PRIETO *et al.*, 2007), (VICCINI *et al.*, 2009), além de unidades de Manp 6-*O*, 2,6- e 3,6-di-*O*-substituídas (5,5%, 7,4% e 4,8%, respectivamente), como observado na tabela 5, (BARRETO-BERGTER *et al.*, 2008), (GORIN *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação analisados por GC-EM (coluna DB-225)

Alditol acetatos parcialmente O-metilados ^a	Fração (%) ^b				Tipo de ligação ^c
	MMHC82	MMHC82	FE5p4		
	CD	MM	CD	MM	
2,3,4,6-Me ₄ -Manp	19,5	15,5	22,6	15,3	Manp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Glc p	15,5	11,1	15,6	15,7	Glc p(1→
2,3,5,6-Me ₄ -Gal f	14,4	17,1	34,7	21,7	Gal f-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal p	4,2	7,3	9,6	9,6	Gal p-(1→
2,3,6-Me ₃ -Manp	4,7	3,5	—	4,8	→4)-Manp-(1→
2,4,6-Me ₃ -Glc p	1,5	1,1	—	1,7	→3)-Glc p-(1→
2,4,6-Me ₃ -Gal p	7,1	7,0	1,3	2,3	→3)-Gal p-(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal f	5,4	4,0	—	6,6	→5)-Gal f-(1→
2,3,4-Me ₃ -Manp	5,8	5,5	1,5	—	→6)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc p	5,0	1,2	—	2,4	→4)-Glc p-(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal f	1,2	5,2	2,6	1,7	→6)-Gal f-(1→
2,3,4-Me ₃ -Gal f	4,8	2,8	—	2,0	→6)-Gal p-(1→
3,6-Me ₂ -Manp	—	1,6	3,9	4,2	→2,4)-Manp-(1→
2,3-Me ₂ -Manp	1,8	1,6	—	4,1	→4,6)-Manp-(1→
2,3-Me ₂ -Glc p	3,2	—	3,9	1,0	→4,6)-Glc p-(1→
3,4-Me ₂ -Manp	1,6	7,4	2,4	1,5	→2,6)-Manp-(1→
2,4-Me ₂ -Manp	—	4,8	1,8	1,1	→3,6)-Manp-(1→
4-Me-Manp	4,2	3,3	—	4,2	→2,3,6)-Manp (1→

^a Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação, seguida de hidrólise ácida (Ácido sulfúrico 72%, 100°C por 8 h), redução com NaB₂H₄ e acetilação, analisados por GC-EM (coluna DB-225).

^b Percentual relativo às áreas de todos os picos.

^c Baseada no derivado O-metilalditol acetato.

A linhagem FE5p4 apresentam uma maior quantidade de terminais não redutores de Gal f (34,7% e 21,7%, respectivamente), quando comparadas a linhagem MMHC82 (14,4% e 17,1%, respectivamente) (TABELA 1), (FIGURA17).

A linhagem FE5p4 quando no meio CD apresenta principalmente em sua fração polissacarídica unidades de Manp 2,4-di-O- e de Glc p 4,6-di-O-substituídas (3,9% para ambas), (BARRETO-BERGTER *et al.*, 2008), (GORIN *et al.*, 2010).

Comparando com a mesma linhagem, mas cultivada no meio MM, esta fração polissacarídica apresenta uma maior diversidade de derivados per-O-metilados, sendo principalmente composta por unidades de Gal f (1→5) ligadas

(6,6%), (LEAL *et al.*, 2008), (VICCINI, *et al.*, 2009) e por unidades de Manp 4-O- (4,8%), 2,4-di-O- (4,2%), (BARRETO-BERGTER, *et al.*, 2008), (GORIN *et al.*, 2010), 4,6-di-O- (4,1%) e 2,3,6-tri-O-substituídas (4,2%), respectivamente (TABELA 1, FIGURA 17).

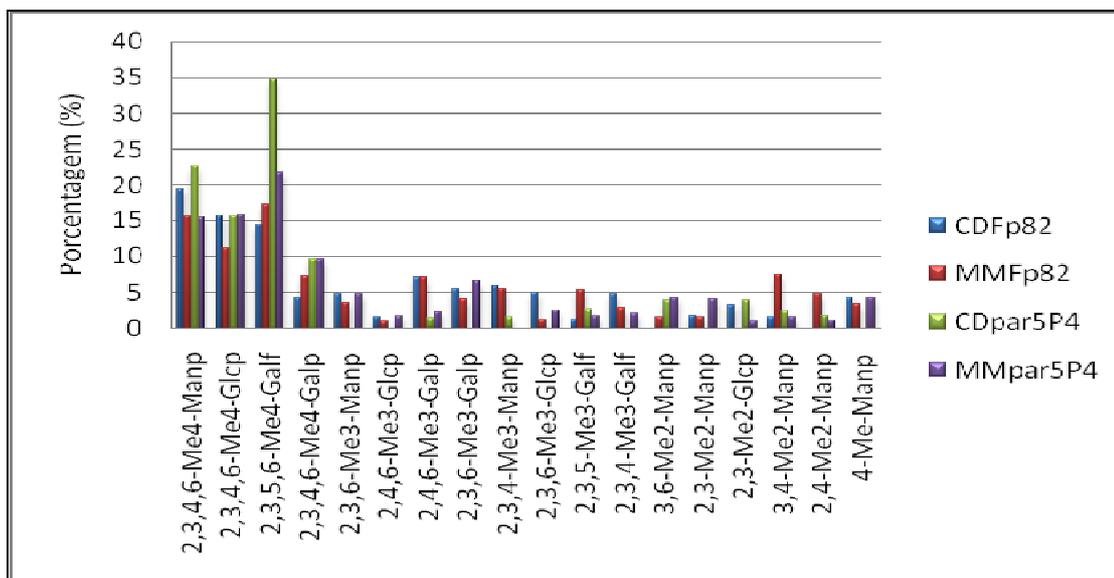


Figura 17 – Comparativo entre Alditol acetatos O-Me- obtidos por metilação

4.3.1 Análise quimiométrica

A análise quimiométrica, quimiometria ou ainda análise multivariada, é uma ferramenta estatístico-matemática valiosa, que em combinação com diferentes técnicas analíticas possibilita a análise de um grande número de variáveis em uma única amostra. Em muitos casos, a mera inspeção visual da análise da metilação e dos espectros de RMN revela apenas uma pequena quantidade de informação. Por isso, tem-se usado métodos estatísticos computadorizados para extrair o máximo de informações destes dados.

A análise por componentes principais (PCA) é um dos métodos mais antigos e mais amplamente utilizados dentre as técnicas multivariadas. A PCA é um modelo linear aditivo no sentido que cada componente principal contém uma porção da variância do conjunto de dados. Geralmente, uma pequena quantidade de componentes principais totalizam mais de 90% da variância total, e nestes casos, os

dados podem ser redimensionados em apenas algumas PCs, reduzindo assim a dimensão do conjunto de dados.

A avaliação dos componentes principais (PCA) foram gerados a partir de resultados obtidos na metilação e no espectro do RMN. Através dos resultados de PCA foi possível sugerir o meio de cultura mais específico para diferenciar as linhagens de origem ambiental e patogênica, conforme descrito no item 3.8.4.1

A análise multifatorial resulta em um gráfico que quando plotados os dados dos componentes metilados geram o componente 1 principal (PC1), representado pelo eixo y, e o componente 2 principal (PC2), representado pelo eixo x (FIGURA 18). Ao se plotar estes componentes, ou seja, PC1 versus o PC2 consegue-se diferenciar as linhagens nos meios de cultura, sendo possível determinar que o meio CD é melhor para diferenciar as linhagens, pois o componente 1 (PC1), expresso no eixo y da figura, explica aproximadamente 85% da variância total e PC2 explicam apenas 11,6% da variância (FIGURA 18).

Esta diferenciação é importante para avaliar perfis fisiológicos distintos entre as respectivas linhagens. Estes resultados são compatíveis com a avaliação feita no espectro de RMN-¹H.

Os resultados de PCA, obtidos dos deslocamentos químicos e intensidades de ¹H RMN (FIGURA 19), geraram componente 1 (PC1), representado pelo eixo x, e o componente 2 (PC2), representado pelo eixo y permitiram diferenciar as linhagens nos meios de cultura, sendo possível determinar que o meio CD, assim como na análise da metilação, foi melhor para separar a linhagem patogênica e ambiental.

Os resultados de ¹H RMN corroboram com os dados de metilação, onde observou-se que a linhagem MMHC82 (patogênica) em meio CD apresenta uma maior variação no perfil fisiológico relacionado aos carboidratos da parede celular.

Segundo os resultados mostrados na figura 18 a linhagem FE5p4 de *F. monophora* isolada de fonte ambiental está mais próxima da linhagem de procedência clínica comparando os polissacarídeos de parede identificados a partir do cultivo no meio MM, sugerindo assim que o meio CD pareceu mais apropriado para mostrar as diferenças de composição polissarídicas entre as linhagens estudadas. Assim como nos dados da metilação, para os dados de análise do RMN, o componente 1 (PC1) explica aproximadamente 81,6% da variância total e os componentes resultantes de PC2 explicam apenas 17,5% da variância.

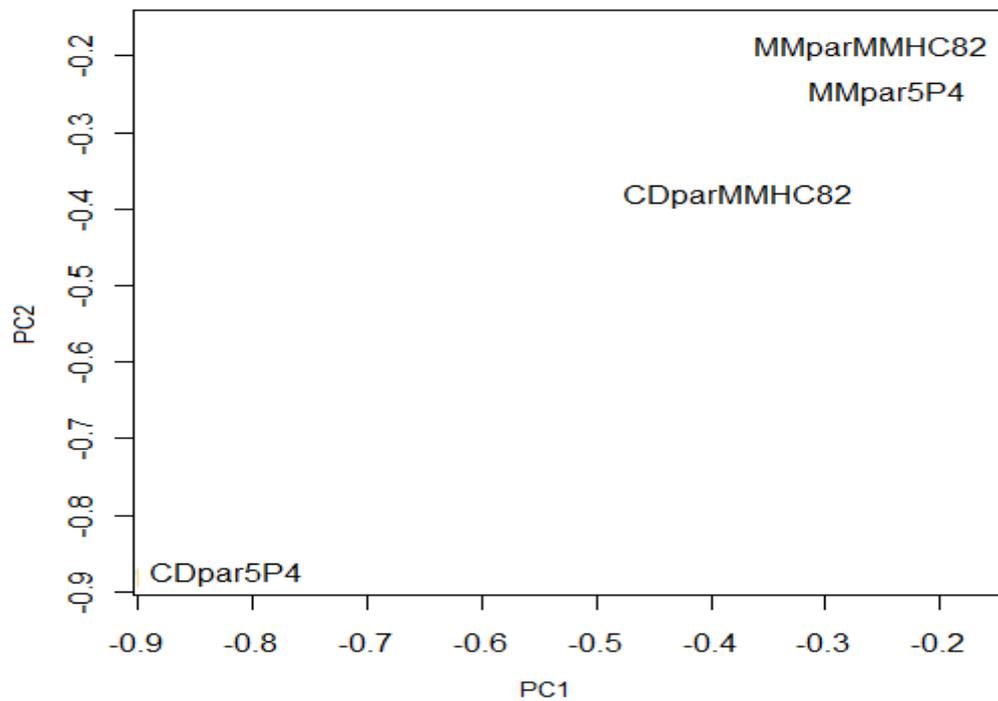


Figura 18 – Análise quimiométrica para os resultados dos componentes metilados

Pode-se concluir também que a análise em PC1 é a mais confiável, pois explica a maior proporção da variância e, como dito anteriormente, em PC1 as linhagens apresentaram uma maior diferenciação no meio CD, sendo este meio melhor para separar as linhagens (FIGURA 19).

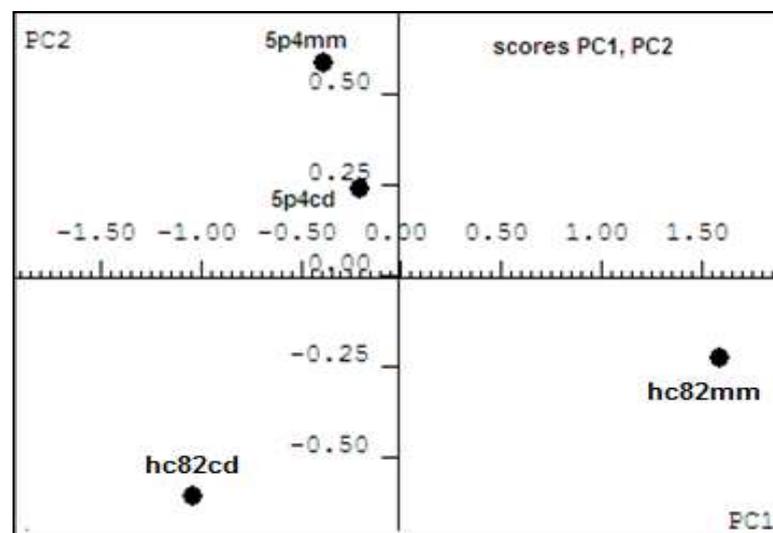


Figura 19 – Análise quimiométrica para os resultados dos espectros do RMN

4.4 AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS

A resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro no curso da cromoblastomicose tem sido de grande interesse. O mecanismo de defesa do indivíduo influencia na manifestação e severidade da infecção causada pelo fungo, além das formas clínicas da doença dependerem da resposta imune do paciente (GIMENES *et al.*, 2006).

Diferentes componentes das células fúngicas como lipídeos, glicoproteínas e polissacarídeos de parede celular tem sido determinados na patogênese da doença. Outro componente comum para diversos fungos, também presentes nas paredes fúngicas, que influencia no curso da doença por interferir na resposta imune é a melanina, principal antígeno da *F. pedrosoi* e está potencialmente envolvido no aumento da resistência à lise dos fungos pelos fagócitos do hospedeiro (ALVIANO *et al.*, 1991).

PINTO E COLABORADORES (2001), observaram que anticorpos poderiam reconhecer estruturas específicas como o polissacarídeo de alguns fungos oportunistas, a exemplo do *Pseudallescheria bonydii*, que apresentam ramnomananas como estrutura diferenciada e antigênica. Nos testes realizados em soro de coelhos, foi determinado que eliminando esta estrutura o resultado encontrado foi a diminuição de 80% de sua reatividade e conseqüentemente menor reconhecimento de anticorpos, sendo que resultados similares foram obtidos com a peptidogalactomanana de *Aspergillus fumigatus*.

Neste trabalho foi realizado o teste de ELISA utilizando soro de pacientes portadores da doença cromoblastomicose. Para o controle utilizou-se soros de pacientes sem a doença. Os soros foram testados frente aos polissacarídeos da parede celular das linhagens MMHC82 e FE5p4 do fungo *F. monophora*.

Estes antígenos foram denominados como antígeno 1 (Ag1), pertencente a parede celular do fungo MMHC82 retirado do meio MM, antígeno 2 (Ag2), antígeno de parede celular do fungo MMHC82 do meio CD, antígeno 3 (Ag3), antígeno de parede celular do fungo FE5p4 retirado do meio MM e antígeno 4 (Ag4), antígeno de parede celular do fungo FE5p4 do meio CD (FIGURA 20).

Os soros dos pacientes com cromoblastomicose denominados P1 a P12 foram avaliados para determinar a sua capacidade de reação na formação de imunocomplexos quando os anticorpos presentes nos soros dos pacientes foram

colocados no ensaio imunológico frente as glicoproteínas presentes nos polissacarídeos de parede das linhagens do fungo *F. monophora* testados. Os soros de indivíduos sem a cromoblastomicose denominados N1 a N6 foram também avaliados para determinar a sua capacidade de reação na formação de imunocomplexos frente aos polissacarídeos de parede (FIGURA 20).

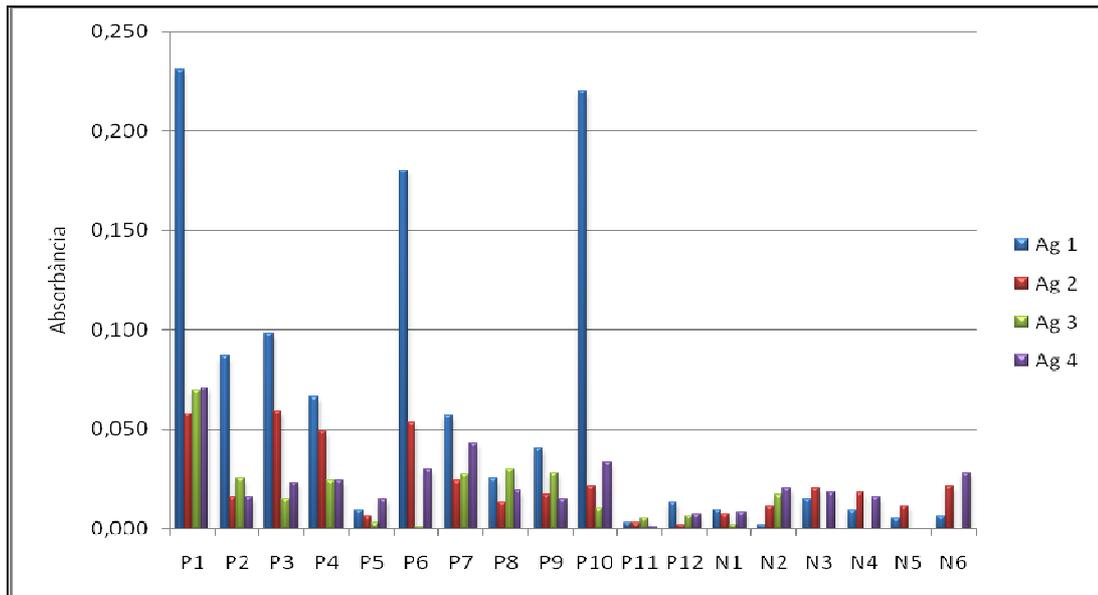


Figura 20 - Antígenos de natureza monossacarídica dos polissacarídeos de parede das linhagens MMHC82 e FE5p4 para os meios CD e MM

Os resultados mostraram que os anticorpos reconheceram os antígenos de maneiras diferentes. Dados da literatura demonstram que os anticorpos específicos foram detectados reconhecendo alguns polissacarídeos em pacientes com aspergiloma em animais infectados experimentalmente (FIGURA 20), (SARFATI *et al.*, 1995).

Os resultados do reconhecimento de anticorpos frente aos antígenos obtidos dos pacientes com a doença foram significativamente maiores quando comparado com pacientes sem a doença. O antígeno, polissacarídeo pertencente à parede celular do fungo MMHC82 (patogênico), cultivado no meio MM, foi o que obteve melhor resposta antigênica quando comparado aos demais antígenos que representam ser menos antigênicos. Sabe-se que a concentração dos polissacarídeos pode variar dependendo do meio de cultura, das condições ambientais e do tipo de linhagem, sugerindo que a linhagem patogênica de procedência clínica representou ser mais imunogênica.

Estudos utilizando como modelo outra espécie também associada a cromoblastomicose, o *F. pedrosoi*, comprovou que as frações da parede celular têm a capacidade de estimular a migração de diferentes células do sistema imune, como linfócitos e macrófagos em camundongos, induzindo também a produção de citocinas por essas células após serem estimuladas (NÓBREGA, 2007).

BOCCA E COLABORADORES (2006) demonstraram que indivíduos infectados têm uma resposta imune celular e humoral contra um grande número de antígenos fúngicos, incluindo os anticorpos contra a melanina do fungo *F. pedrosoi*. O *H. capsulatum* utiliza os polissacarídeos de sua parede celular para se vincular e colonizar seu hospedeiro, bem como para ativar a resposta imune inata. Além disso, estes açúcares parecem fornecer a capacidade de sobrevivência deste patógeno no macrófago (GOROCICA *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos apresentam ainda que a parede celular de fungos como o *F. pedrosoi*, *H. capsulatum* e a *Candida albicans* é formada principalmente de β -1,6-glucana, que possui atividade imunomodulatória e quimioatraente para neutrófilos e macrófagos (SATO *et al.*, 2006).

Nestes resultados foram utilizados os polissacarídeos de parede do fungo inativado e outras pesquisas sugerem que a inoculação do *F. pedrosoi* inativado induziu uma migração de linfócitos B e baixa expressão de linfócitos TCD4+ e TCD8+. A integridade da resposta imune celular está diretamente relacionada com a severidade da infecção induzida pelo fungo e a depleção de TCD8+ não altera o curso da infecção (TEIXEIRA DE SOUZA *et al.*, 2006). Sabe-se também que os pacientes com cromoblastomicose apresentam níveis aumentados de anticorpos como IgG, IgM e IgA (ESTERRE *et al.*, 2006).

Pode-se sugerir ainda que o polissacarídeo da parede fúngica de *F. monophora*, que foi utilizado como antígeno neste trabalho, serviria como uma barreira prévia, e outros compostos tais como a melanina anteriormente descritos com um maior potencial de antigenicidade, poderiam então representar uma segunda barreira. Sendo assim pode-se considerar a probabilidade de uma associação destes compostos, protegendo o fungo contra os mecanismos de defesa, o que permitiria o crescimento destes agentes nos tecidos do hospedeiro, justificando a evolução clínica da infecção.

Os testes de ELISA apresentam uma alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico desta doença, inclusive em pacientes que estão sendo submetidos à

terapia com medicamentos, indicando que as reações sorológicas podem ser bastante úteis no auxílio do diagnóstico desta infecção (ESTERRE *et al.*, 2000). Porém para uma eventual conclusão mais qualitativa também é necessário produzir, purificar e isolar todos os polissacarídeos presentes nas frações de parede da espécie testada.

5. CONSIDERAÇÕES

O fungo *F. monophora* produziu EPS, biomassa e polissacarídeos de parede frente aos diferentes meios de cultivo e o estudo da produção destes polímeros revelou que os EPS podem passar a ser consumidos quando níveis dos açúcares diminuem nos meios cultivados, indicando um mecanismo de reserva e consequentemente, uma estratégia de sobrevivência para este microrganismo.

A caracterização bioquímica de isolados clínicos e ambientais pode revelar fatores associados aos mecanismos de virulência e ainda esclarecer possíveis rotas de infecção contribuindo desta forma para a elucidação do nicho ambiental de linhagens patogênicas.

Sendo assim, para estes isolados seria de fundamental importância a continuidade das análises visando decifrar os glicoconjugados obtidos e então realizar um estudo comparativo destes polímeros entre as linhagens de *F. monophora*. Contribuindo assim, para a determinação de estruturas diferenciadas e entender o seu papel nos mecanismos de virulência e patogenicidade destes agentes.

Pesquisas com estes polímeros na área clínica com fungos patogênicos ainda não são muito realizadas, principalmente utilizando técnicas como cromatografia e RMN, sendo relevantes novos dados disponíveis para estudos futuros, com perspectiva da produção de testes rápidos e imunogênicos entre outros estudos que colaborem com o auxílio no diagnóstico e tratamento da cromoblastomicose caracterizada por uma diversidade de quadros clínicos. Ressaltando assim, a importância destes resultados.

Sabe-se que estes polímeros ainda podem influenciar no reconhecimento do fungo pelas células do sistema imune do hospedeiro e nos mecanismos imunogênicos. Portanto para melhor entendimento destas estruturas e suas funções seria necessário fazer sua purificação e isolamento.

6. CONCLUSÕES

-O fungo *F. monophora* produziu EPS em meio MM e CD contendo manose, galactose e glucose em proporções variáveis dependendo do meio e linhagem. O meio MM foi o melhor meio de cultivo para a produção destes polímeros e também de biomassa.

-Os polissacarídeos da parede celular das duas linhagens também apresentaram açúcares como glucose, manose e galactose em sua composição.

-A análise de metilação e de RMN mostrou unidades de Galf (1→5) e (1→6) ligada, indicando uma possível galactofuranana, e a presença de α -glucana (1→4) ramificada em O-6 "glycogen like", semelhante a estrutura do glicogênio, e β -glucana (1→3), (1→6), além de α -mananas 1→6) substituída em O-2 e O-4.

-A análise quimiométrica dos resultados de ^1H RMN e de metilação mostrou que a linhagem MMHC82 em meio CD apresentou uma maior variação no perfil fisiológico relacionado aos carboidratos da parede celular.

-O antígeno, polissacarídeo pertencente à parede celular do fungo MMHC82 (patogênico), cultivado no meio MM, foi o que obteve melhor resposta antigênica quando comparado aos demais antígenos que representam ser menos antigênicos.

7. REFERÊNCIAS

ALVIANO, S. C.; FARBIARZ, R. S.; SOUZA de W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, R. L. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Journal of General Microbiology**. v. 137, p. 837-844, 1991.

ALVIANO, D. S.; KENLIPP, L. F.; LOPES, A. H.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNANDES, J. R.; RODRIGUES, M. L. ALVIANO, C. S. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells in induced by platelet-activating factor. **Res. Microbiology**, v. 154, p. 689-695, 2003.

ALVIANO, D. S.; FRAZEN, J. A.; TRAVASSOS, L.R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBEG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, L. M. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of Phagocytes. **Infection and Immunity**. v. 72, p. 229-237, 2009.

BAE, J. T.; SINHA, J.; PARK, J. P.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. **Journal of Microbiology and Biotechnonology**. v. 10, p. 482-487, 2000.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T. D da; PIGATTO, M. M.; CORRADI da SILVA, M. D. L. Production and Applications of Fungal Exopolysaccharídeos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BARRETO-BERGNER, E.; SASSAKI, G. L.; WAGNER, R.; SOUZA, L. M.; SOUZA, M. V. A. R.; PINTO, M. R.; SILVA da, M. I. D.; GORIN, P. A. J. The opportunistic fungal pathogen *Scedosporium prolificans*: Carbohydrate of its glycoproteins. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 42, p. 93-102, 2008.

BEEBE, K.; PELL, R.; SEAHOLTS, N. B. **Chemometric: A practical guide**. New York: John Wiley & Sons, 1998.

BITTENCOURT, V. C.; FIGUEIREDO, R. T.; Da SILVA, R. B.; MOURÃO-SÁ, D. S.; FERNANDEZ, P. L.; SASSAKI, G. L.; MULLOY, B.; BOZZA, M. T.; BARRETO-BERGTER, E. An alpha-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activation. **J. Biol. Chem**. v. 281, p. 22614-23, 2006.

BOCCA, L. M.; BRITO, S. M. P. P.; FIGUEIREDO, F.; TOSTA, C. E. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in cromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia**. v. 161, p. 195-203, 2006.

CARBONERO, A. R.; TISCHER, C. A., CONSENTINO, C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Strucural characterization of a galactomannan from the cyanolichen *Leptogonium azureum*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 53, n.4, p. 469-473, 2003.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984

CHAKRABARTI, A. Microbiology of systemic fungal infections. **J. Postgrad Med.** v. 51(1), 2005.

CHAPLIN, M. F. Monosaccharides. **Carbohydrate Research.** v. 10, p. 35-40, 1994.

CORBELLINI, V. A., SCROFERNEKER, M. L., CARISSIMI, M., SANTOLIN, L. D. Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grown in different culture media. **Mycopathologia.** v. 162, p. 51-55, 2006.

CORRADI da SILVA, M. D. L.; IACOMINI, M.; JABLONSKI, E.; GORIN, P. A. J. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta* sp. And effect of storage. **Phytochemistry.** v. 33, n. 3, p. 547-552, 1993.

CORRADI da SILVA, M. D. L.; IZELI, N. L. MARTINEZ, P. F.; SILVA I. R.; CONSTANTINO C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M. DEKKER, R. F. H.; SILVA, G.V.J. da. Purification and structural characterisation of (1→3; 1→6) β-d-glucans (botryosphaerans) from *Botryphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon source: a comparative study. **Carbohydrate Polymers.** v.61, p. 10-17, 2005.

CORRADI da SILVA, M. D. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. de S. Chemical characterization and biotechnology applications of fungal glucans. **Quim. Nova.** v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

DEEP, G. S. Jr.; WOODS, J. P. *Histoplasma capsulatum* strain variation both H antigen production and beta-glucosidase activity and overexpression of HAG1 from a telomeric linear plasmid. **Infect. Immun.** v. 67, p. 3312-3316, 1999.

DUEÑAS, M.; MUNDUATE, A.; PEREA, A.; IRASTORZA, A. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. **International Journal of Food Microbiology.** v. 87, n. 1, p. 113-120, 2003.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 19, p. 148-152, 2006.

ESTERRE, P.; JAHEVITRA, M.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** v. 7, n.3, p. 497-500, 2000.

FERREIRO, L.; SPANAMBERG, A.; BORBA, M. R.; SANCHES, E. M. C.; ROEHE, C.; SANTURIO, J. M.; CHERMETTE, R. Phaeohyphomycosis: an emerging animal fungal infection. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 35 (2), p. 239-241, 2007.

FUCKS, J.; PECHER, S. Partial Suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. **Mycopathologia**. v. 119 (2), p. 73-76, 1992.

FUKUDA, K. E.; VASCONCELOS, D. F. A.; MATIAS, C. A.; BARBOSA, de M. A.; DEKKER, H. F. R.; CORRADI da SILVA, M. D. L. Fungal cell polysaccharides: purification and characterization. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GIMENES, F. M. V.; SOUZA, M da G.; Ferreira, S. K.; MARQUES, G. S.; GONÇALVES, G. A.; SANTOS.; S. L. de C. V. D. SILVA.; P. M. da C.; ALMEIDA, R. S. Cytokines and lymphocytes proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes and infection**, v. 7, p. 708-713, 2005a.

GIMENES, V. M. F.; CRIADO, P. R.; MARTINS, J. E. C.; ALMEIDA, S. R. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. **Mycopathologia**, v. 162, p. 97-101, 2006.

GLAZER, A.; NIKAIIDO, H.; Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology. **W. H. Freeman**. p. 50, 1995.

GOPAL, P. K.; SHEPHER, M. G.; SULLIVAN, P. A. Analysis of wall glucans from yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.** v. 130, p. 3295-301, 1984.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, London, v. 53, p. 1212-1222, 1975.

GORIN, P. A. J. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biotechnology. **New York: Academic**. v. 38, p. 13-97, 1980.

GORIN, P. A. J.; da Silva, M. I. D.; SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M. WAGNER, R.; BITTENCOURT, V. C. B.; SIMAS-TOSIN, F. F.; NOSEDA, M. D.; BARRETO-BERGTER, E. Carbohydrates present in the glycoprotein from conidia of opportunistic pathogen *Scedosporium prolificans*. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, p. 927-932, 2010.

GOROCICA, P.; TAYLOR, M. L.; ALVARADO-VÁQUEZ N.; PÉREZ-TORRES, A.; LASCURAIN, R.; ZENTENO, E. The interaction between *Histoplasma capsulatum* cell wall carbohydrates and host components: relevance in the immunomodulatory role of histoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104(3), p. 492-496, 2009

GUERIM, H. *Exophiala spinifera*: Polissacarídeos de parede celular, exopolissacarídeos e antígenos. **Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Paraná**. 2007.

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTINÉZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**. v. 281, p. 143-141, 1996.

HESS, D. S.; SILVA, L. A.; GERN, R. M. M. Avaliação da produção de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DMS 1833 cultivados em meio contendo lipídeos. **Quim. Nova**. p. 21-26, 2006.

HOOG, G. S. Evolution of black yeast: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.63, p.105-109, 1993.

HOOG, G. S.; GUARRO. **Atlas of clinical fungi**. Baar: **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, p. 720, 1995.

HOOG, G. S, ATILLI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. A.; VAN DEN END, H. A.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Med. Mycol.** v. 42, p. 405-416, 2004.

LEAL, J. A.; BARBERO-JIMÉNEZ, J.; BERNABÉ, M.; PRIETO, ALICIA. Structural elucidation of a cell wall fungal polysaccharide isolated from *Ustilagoidea virens*, a pathogenic fungus of *Oriza sativa* and *Zea mays*. **Carbohydrate Research**. v. 343, p. 2980-2984, 2008.

MARTINEZ, R. L.; TOVAR, L. J. M. **Chromoblastomycosis**. *Clinics in Dermatology*. v. 25, p. 188-194, 2007.

KAWAI, A. L.; PINOTT, P. H. M.; CELLIGOI, C. P. M. A. Exopolysaccharide production by the cyanobacteria *Nostoc sp* in different concentration of nitrogen and glucose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 27, n. 1, p. 33-39, 2006.

KEN-ICHIRO, I.; HIROHISA, T.; EIKO K.; RIE, Y.; TOSHIO, O.; HIROSHI, T.; YOSHIYUKI, A.; KEN-ICHI, I NAOHITO O. *Candida* soluble cell wall β -glucan facilitates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice: Possible role of antigen-presenting cells. **Respiratory Research**, p. 63-68, 2009.

KOMURA, D. L. *Pleurotus eryngii*: Isolamento, cultivo e exopolissacarídeos. **Monografia de conclusão de curso de Ciências Biológicas, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná**, 2006.

MOMIN, A. Y.; RAGHUVANSHI, SR.; LANJEWAR, DN. Cutaneous chromoblastomycosis. **Bombay Hospital Journal**, v. 50, n. 2, 2008.

MONTREUIL, J. Spatial conformation of glycans and glycoproteins. **Biol Cel**. v. 51, p. 115-132, 1994.

NAJAFZADEH, M. J. ; J. SUN⁴, V. VICENTE, L. XI, A. H. G. GERRITS VAN DEN ENDE & G. S. DE HOOG *Fonsecaea nubica*, a new species of agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. , *Medical Mycology*, 2009

NÓBREGA, Y M. K. H. Influência das frações da parede celular do fungo *Fonsecaea pedrosoi* sobre a ativação de células peritoneais de camundongo in vitro. **Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília**. 2007.

PINTO, M. R.; MULLOY, B.; HAIDO, R. M. T.; TRAVASSOS, L. R.; BARRETO-BERGTER, E. A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. **Microbiology**. v. 147, p. 1499-1506, 2001.

PINTO, M. R.; BARRETO-BERGTER, E.; TABORDA, C.P. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. **Brasilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 195-208, 2008.

PRIETO, A.; LEAL, J. A.; GÍMENES-ABIÁN, M. I.; CANALES, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Isolation and structural determination of a unique polysaccharide containing mannofurose from the cell wall of the fungus *Acrospermum compressum*. **Glycoconj**. v. 24, p. 421-428, 2007.

QUEIROZ FILHO F. A cromoblastomicose no estado do Paraná, etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. **Revista da Sociedade brasileira de Medicina Tropical**. v.143, p. 345-346, 1997.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, VITALE, R. G. SALGADO, C. G. BONITAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestation, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**. p. 1-13, 2009.

RASUL, E. S.; HAZARIKA, N. K.; SHARMA, A.; BORUA, P.C.; SEM, S.S. Chromoblastomycosis. **Japi**. v. 55, 2007.

REVANKAR, G. S.; PATTERSON, J. E.; SUTTON, D. A. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 34, p. 467-476, 2002.

REVANKAR, G. S.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M.G. Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 1010 cases. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38. p. 206-216, 2004.

REVANKAR, G. S. Dematiaceous fungi. **Mycoses**. v. 50, p. 91-101, 2007.

RIBEIRO, E. L.; SOARES, A. J.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; NAVES, P. L. F.; DIAS, S.M. S. Cromoblastomycosis: present disease in brazilian population reality. **RBAC**. v. 38 (3), p. 189-192, 2006.

SARFATI, J.; BOUCIAS, D. G.; LATGÉ, J. P. Antigens of *Aspergillus fumigatus* produced in vivo. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 33 (1), p. 9-14, 1995.

SÁ, V. C.; SILVA, T. A.; REIS, C. M. S.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F.; BOCCA, A. M.; The pattern immune cell infiltration in cromoblastomycosis: involvement of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 and fungi persistence. v. 49 (1), p. 49-53, 2007.

SÁ-NUNES, A.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; Interleukin-5 mediates peritoneal eosinophilia induced by the F1 cell wall fraction of *Histoplasma Capsulatum*. **Brazilian Journal Medical biological Research**. v. 37, p. 343-346, 2004.

SANTOS, S.; L.; A.; PALMEIRA, F.; V.; ROZENTAL, S.; KNEIPP, F.; L.; NIMRICHTER, L.; ALVIANO, S.; D.; RODRIGUES, L.; M.; ALVIANO, S.; C.; Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS Microbiol Rev**. v.31, p. 570-591, 2007.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. Characterization of lyso-galactolipid, C-2 and C-3 O- acyl trigalactosylglycerol isomers, obtained from lichenized fungus *Dictyonema glabratum*. **FEMS Lett. Microbiology**. v. 194, p. 155-158, 2001.

SATO, T.; TWABUCHI, K.; NAGAOKA, I.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; TAMURA, H.; SEYAMA, K.; FUKUCHI, Y.; NAKAYAMA, H.; YOSHIZAKI F.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. **Journal Leukocyte Biology**. v. 64, p. 204-211, 2006.

SCHMID, F.; STONE, A. B.; Mcdougall, M. B., BACIC, A.; MARTIN, K. I.; BROWNLEE, T. C. R.; CHAI, E.; SERVIOUR, R. J. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3;1→6)-β-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. **Carbohydrate Research**. v. 331, p. 163-171, 2001.

SERVIOUR, R. J.; S. J. STASINOPOULOS, S. J.; AUER, D. P. F.; GIBBS P.A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 12, p.279-298, 1992.

SIDRIM, J. J. C. & MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

SILVA, J. P.; SOUSA, W.; ROZENTAL, S. Cromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**. v. 143 (3), p. 171-175, 1998-1999.

SILVA, J. P.; ALVIANO, D. N.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, W.; TRAVASSOS, L. R.; DINIZ, J. A. P.; ROZENTAL, S. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo

and in vitro: ultrastructure and antigenicity. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. v. 33 (1), p. 63-69, 2002.

SILVA, I. R.; MONTEIRO, K. N.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. de S.; CORRADI da SILVA, M. D. L. Purification and characterization of a gentiohexaose from *Botryosphaeran* by partial acid hidrolisis. **Quim. Nova**. v. 31, n. 5, p. 1015-1019, 2008.

SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; MELLIGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**. v. 67, p. 2189-2196, 2006.

SINGH, N.; ARGARWAL, R.; GUPTA, D.; SHIRVAPRAKASH, M. R.; CHAKRABARTI, A. An unusual case de mediastinal mass due to *Fonsecaea pedrosoi*. **Eur. Respir**. v. 28, p. 662-664, 2006.

SOUSA, M. G. T.; AZEVEDO, C. de M. P. S.; NASCIMENTO, R. C.; GHOSN, E. E. B.; SANTIAGO, K. L.; NOAL, V.; BOMFIM, G. F.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A.G.; SANTOS, D. W. de C. I.; ALMEIDA, S. R. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chomoblastomycosis. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 84, p. 864-870, 2008.

STAHL, P. D.; EZEKOWITZ, R. A. The manose receptor is a pattern recognition receptor involved in hosp defense. **Curr. Opin. Immunol**. v. 10, p. 50-55, 1998.

STYNEN, D.; SARFATI, J.; GORIS, A.; PRÉVOST, M. C.; LESOURD, M.; KAMPHUIS, H.; DARRAS, V.; LATGÉ, J.P. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. **Infect. Immun**. v. 60, p. 2237-2245, 2006.

SUH, M. K.; Phaeohyphomycosis in Korea. **Jpn. Med. Mycol**. v. 46, p. 67-70, 2005.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.

SURASH, S.; TYAGI, A.; HOOG, S. G.; ZENG, J-S, BARTON, R. C.; HOBSON, R. P. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. **Medical Mycology**. v. 43, p. 465-472, 2005.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**. v. 16.p. 41-46, 1998.

TANG, W. K. Cromoblastomycosis. **Hong Kong Dermatology & Venereology Bulletin**, 2001.

TEIXEIRA de SOUSA M. G.; GHOSN, E. E.B.; ALMEIDA, S. R.; Absence of CD4+T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 64, p. 595-600, 2006.

VICENTE, V. A.; ANGELLIS, D. A.; QUEIRÓZ-TELLES FILHO, F.; PIZZIRANI, K.; APARECIDA, A. Isolation of Herpotrichiellaceae fungi from the environment. **Braz. J. Microbiol.** v. 32 (1), p. 47-51, 2001.

VICENTE, V. A.; ANGELLIS, D. A.; PIE, M. R.; QUEIRÓZ-TELLES F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, G. H.; HOOG de, G. S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environment isolation of Black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**. v. 61. p. 137-144, 2008.

VICCINI, G.; MARTINELLI, T. R., COGNIALLI, R. C. R.; de FARIA, R. O.; CABONERO, E. R.; SASSAKI, G. L., MITCHELL, D. A. Exopolysaccharide from surface-liquid culture of *Clonostachys rosea* originates from autolysis of the biomass. **Arch Microbiol.** v. 191. p. 369-378, 2009.

VIDAL, M. S. M.; CASTRO, L. G. M.; CAVALCANTE, S. C.; LACAZ, C. da S. Immunoprecipitation techniques and ELISA in the detection of ANTI - *Fonsecaea pedrosoi* antibodies in Cromoblastomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 45 (6), p. 315-318, 2003.

XI, L.; CHANGMIG, L.; JIUFENG, S.; XIQING, L.; HONFANG, L.; ZHANG, J.; HOOG, S. G. Cromoblastomycosis caused by a meristemic mutant of *Fonsecaea monophora*. **Medical Mycology**. v. 47, p. 77-80, 2009.