

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Exophiala spinifera: POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR,
EXOPOLISSACARÍDEOS E ANTÍGENOS

CURITIBA
2007

HIGOR GUERIM

***Exophiala spinifera*: POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR,
EXOPOLISSACARÍDEOS E ANTÍGENOS**

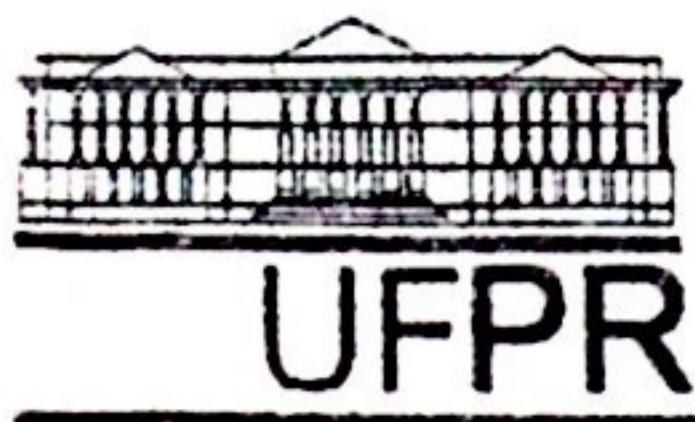
*Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de mestre em Microbiologia, ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia do setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.*

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki.

Co-orientadora: Prof. Dra. Vânia Aparecida Vicente.

CURITIBA

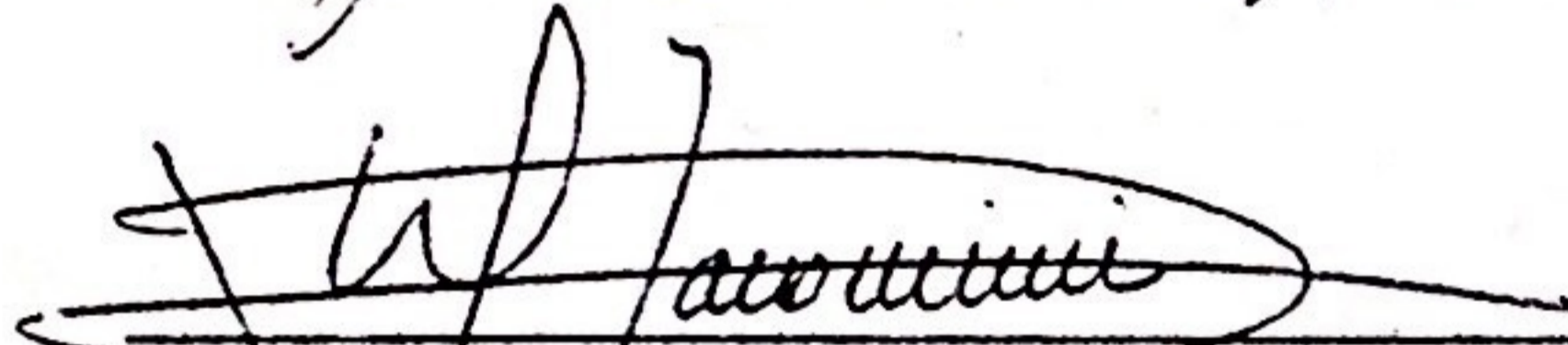
2007

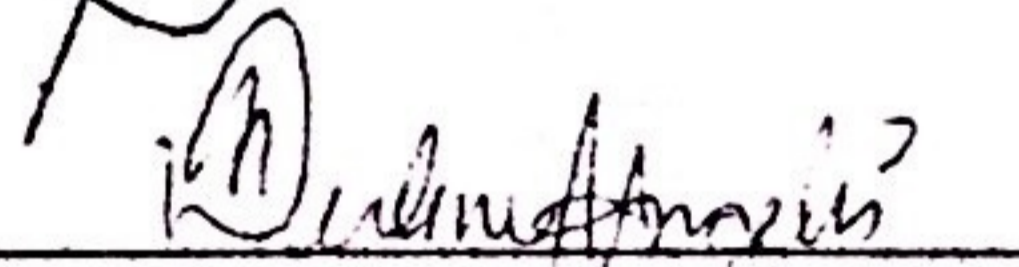


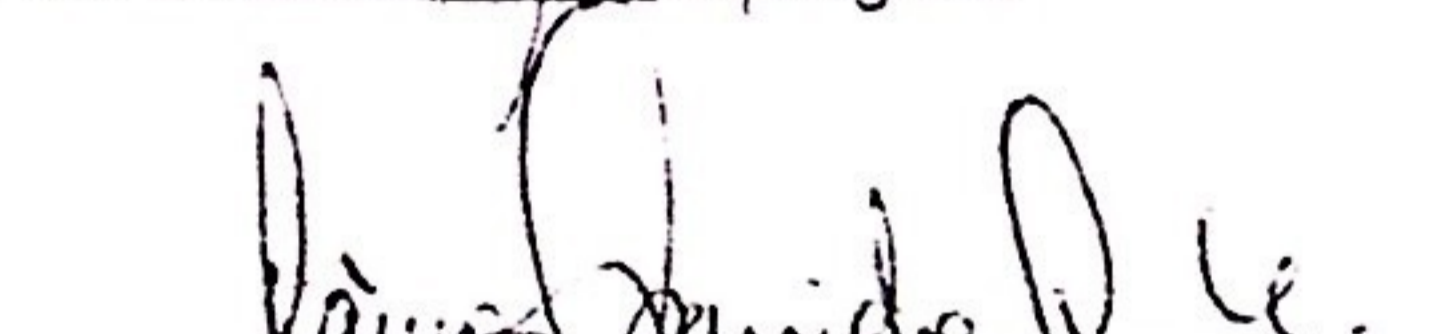
ATA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e sete, às quatorze horas, na sala 129 do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado de autoria do Pós-Graduando em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, HIGOR GUERIM, intitulada "Exophiala spinifera: polissacarídeos, exopolissacarídeos e antígenos", sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki e a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr. Guilherme Lanzi Sassaki - Departamento de Bioquímica/UFPR (presidente), Dr. Marcello Iacomini - Departamento de Bioquímica/UFPR, Dr^a Derlene Attili de Angelis - Unesp Rio Claro/SP, Dr^a Vânia Aparecida Vicente - Departamento de Patologia Básica/UFPR (suplente) e Dr. Silvio Marques Zanata - Departamento de Patologia Básica/UFPR (suplente). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. O candidato teve 60 (sessenta) minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüido durante 30 (trinta) minutos por cada um dos membros da Banca Examinadora, e tendo 30 (trinta) minutos para responder a cada uma das argüições. No final o candidato foi aprovado, segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação. Para a devida publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que será assinada pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 27 de fevereiro de 2007.


Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki - presidente


Prof. Dr. Marcello Iacomini


Prof^a. Dr^a Derlene Attili de Angelis

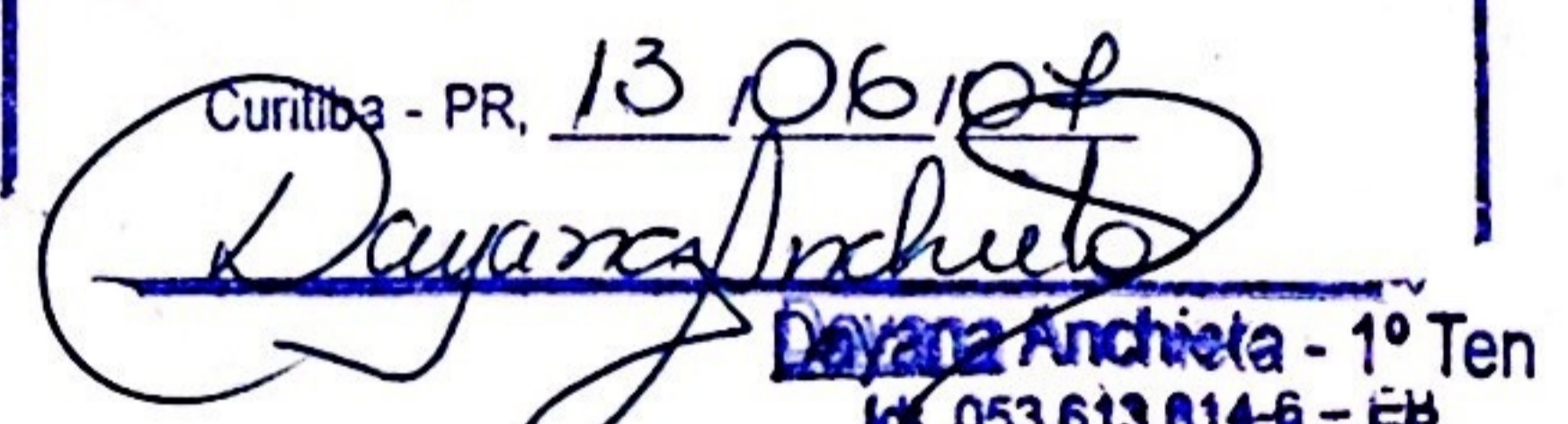

Prof^a. Dr^a Vânia Aparecida Vicente - suplente

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata - suplente

MINISTÉRIO DA DEFESA
CMS - 5.ª RM/DE
Hospital Geral de Curitiba

De acordo com o art. 1º, parágrafo único, do decreto nr. 83.936, de 10 de set. 79, certifico que esta cópia é reprodução fiel do original.

Curitiba - PR, 13/06/07


Dayana Anchieta - 1º Ten
Id 053.613.814-6 = EB
CH DIV PES

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos profissionais que me guiaram durante esta pesquisa, professores Guilherme L. Sasaki e Vânia Aparecida Vicente.

Aos Meus pais Gidião e Dóris, meus eternos orientadores a quem devo tudo que conquistei.

A todos que acreditaram na minha capacidade de concluir esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo de bom que aconteceu nestes dois anos de mestrado, e por ter me dado forças para superar e aprender com as dificuldades e tornar tudo possível.

Aos meus pais, Gidião e Dóris e meus irmãos Hildegardo e Hilston, pelo amor, dedicação, apoio incondicional e torcida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki, pela amizade, incentivo e por sempre estar disposto a ajudar. Agradeço pelos ensinamentos, inclusive nos momentos de descontração. Agradeço principalmente pela sua competência em conduzir minha orientação.

Agradeço à minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente, pela sua conduta científica oferecendo toda sua experiência a qualquer hora e lugar, pelo rigor com que conduzia as pesquisas, e pela sua amizade, o que me enriqueceu muito.

Ao professor Dr. Silvio Marques Zanata juntamente com a equipe de seu laboratório, em especial a Bia e João Gabriel que sempre se mostraram dispostos a me ajudar com os ensaios imunológicos.

À Sarah com sua paciência e competência, sempre companheira e prestativa me auxiliando nos experimentos e análises moleculares.

Aos companheiros de laboratório Lauro, Thales, Vassoler e Ricardo que sempre me auxiliaram esclarecendo todas minhas dúvidas e sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos colegas de trabalho do Hospital Geral de Curitiba, que tornaram possível a flexibilidade dos horários de trabalho, à Alessandra pela ajuda, carinho, apoio e palavras de incentivo.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Patologia, Microbiologia e Parasitologia.

A todos que por ventura esqueci de mencionar, mas me ajudaram nessa caminhada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELASix
LISTA DE ABREVIATURASx
RESUMOxii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.1.1 Objetivo Geral.....	2
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 FUNGOS DEMATIÁCEOS	4
2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO.....	7
2.3 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR FÚNGICA	11
2.4 EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS).....	12
2.5 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO E TAXONOMIA DE FUNGOS DEMATIÁCEOS	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	17
3.2.1 Czapeck-Dox (CD).....	17
3.2.2 Butterfield (BF).....	17
3.2.3 Meio Mínimo (MM)	17
3.2.4 Sabouraud Dextrosado	18
3.2.5 DNA Polimerase	18
3.2.6 dNTP.....	18
3.2.7 Gel de Agarose (0,8%)	18
3.2.8 Gel de Agarose (1,6%)	18
3.2.9 <i>Primers</i>	19
3.2.10 Tampão CTAB.....	19

3.2.11	Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X) – pH 8,0.....	19
3.2.12	Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TEB 1X)	20
3.2.13	Tampão Tris-EDTA (TE)	20
3.2.14	Brometo de Etídio	20
3.2.15	Solução PBS-BSA (salina tamponada - soroalbumina bovina) 1%	20
3.2.16	Solução PBS-BSA (salina tamponada - soroalbumina bovina) 0,1%.....	20
3.2.17	Solução PBST (salina tamponada - Tween 20) 0,05%.....	20
3.3	ESTERILIZAÇÃO.....	21
3.4	MANUTENÇÃO E REPIQUE DOS ISOLADOS	21
3.5	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	21
3.6	PCR – RIBOTIPAGEM	22
3.6.1	Purificação dos Produtos da PCR	22
3.6.2	Reação de Seqüenciamento.....	22
3.6.3	Precipitação do DNA Para ser Seqüenciado	23
3.6.4	Seqüenciamento	23
3.6.5	Edição e Análise das Seqüências.....	23
3.7	ÁRVORE FILOGENÉTICA	23
3.8	CURVAS DE CRESCIMENTO	24
3.9	EXTRAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS.....	25
3.10	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE MICÉLIO.....	25
3.11	ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS	25
3.11.1	Hidrólise Ácida Total.....	25
3.11.2	Redução e Acetilação	26
3.11.3	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	26
3.11.4	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	27
3.11.5	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	27
3.11.6	Metilação	27
3.12	PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS.....	28
3.12.1	Preparação da Placa de ELISA	28

3.12.2	Reação Imunoenzimática	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA LINHAGEM HC <i>E. ml.</i> DE <i>Exophiala</i> sp.	30
4.2	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO.....	35
4.3	ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS	41
4.4	ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR E EPS NOS MEIOS CZAPECK-DOX (CD) E MEIO MÍNIMO (MM).....	42
5	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXOS	57
	ANEXO I - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO DE <i>E. spinifera</i> POR MEIO DE SEQÜÊNCIAS ITS	58
	FIGURA 1 -ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,6%, PRODUTOS DA PCR	58
	FIGURA 2 -SEQÜÊNCIA CONSENSO DAS REGIÕES ITS1 E ITS2 DO ISOLADO DE <i>E. spinifera</i>	58
	FIGURA 3 -SEQÜÊNCIA CONSENSO	59
	ANEXO II - ESPECTROS DE MASSAS	60
	FIGURA 1 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA EPS CD.....	60
	FIGURA 2 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA E PS MM.....	61
	FIGURA 3 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA PAREDE CD	62
	FIGURA 4 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA PAREDE MM	63
	APÊNCICE	64
	Artigo submetido à revista Studies in Micology previsto para publicação em janeiro de 2008.....	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FIGURA 1 – ASPECTOS MICROMORFOLOGICOS DA LINHAGEM HCEML DE <i>Exophiala spinifera</i>	30
FIGURA 2 - FIGURA 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO AS RELAÇÕES ENTRE A LINHAGEM HCEML DE <i>Exophiala spinifa</i> E LINHAGENS REFERÊNCIA DE ESPÉCIES DO GENERO. MÁXIMA PARCIMÔNIA (PESAGEM MAIOR PARA TRANSVERSÕES2:1).....	33
FIGURA 3 - FIGURA 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO AS RELAÇÕES ENTRE A LINHAGEM HCEML DE <i>Exophiala spinifa</i> E LINHAGENS REFERÊNCIA DE ESPÉCIES DO GENERO. MÁXIMA PARCIMÔNIA (DADOS NÃO PESADOS).....	34
FIGURA 4 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Exophiala spinifera</i> NOS MEIOS MÍNIMO E CZAPECK-DOX.....	36
FIGURA 5 - CONSUMO DE GLUCOSE/DIA.....	37
FIGURA 6 - CURVA PADRÃO DE SACAROSE OBTIDA POR DENSITOMETRIA.....	38
FIGURA 7 - CONSUMO DE SACAROSE/DIA.....	38
FIGURA 8 - EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>Exophiala spinifera</i> NOS MEIOS MINIMO E CZAPECK-DOX.....	39
FIGURA 9 - GRÁFICO INDICANDO O CONSUMO DE GLUCOSE, PRODUÇÃO DE EPS E BIOMASSA NO MEIO MÍNIMO.....	40
FIGURA 10 - GRÁFICO INDICANDO O CONSUMO DE SACAROSE, PRODUÇÃO DE EPS E BIOMASSA NO MEIO DE CULTIVO CZAPECK-DOX.....	40
FIGURA 11 - ESPECTROS DE RMN DAS AMOSTRAS MM-PAREDE (A), CD-PAREDE (B), CD-EPS (C) E MM-EPS (D).....	44
FIGURA 12 - RESPOSTA DO ANTICORPO FRENTE A DIFERENTES AMOSTRAS.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQÜÊNCIA E POSIÇÕES ESPECÍFICAS DOS <i>PRIMERS</i> PARA AMPLIFICAÇÃO DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DO DNAr.....	19
TABELA 2 - LINHAGENS REFERENCIAS UTILIZADAS NA RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA E NÚMERO DE ACESSO NO <i>GENBANK</i>	32
TABELA 3 - BIOMASSA E EPS OBTIDO APÓS 8 DIAS DE CRESCIMENTO	35
TABELA 4 - ACETATOS DE ALDITOL OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE, SEGUIDO DE SUCESSIVA REDUÇÃO E ACETILAÇÃO E ANÁLISE POR GC-MS (COLUNA DB-225)	42
TABELA 5 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR E EPS OBTIDAS A PARTIR DO CULTIVO DE <i>Exophiala</i> sp. NOS MEIOS CZAPECK-DOX (CD) E MEIO MÍNIMO (MM)	45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α -	Alfa
β -	Beta
μL -	Microlitro
~ -	Aproximadamente
^{13}C -	Carbono treze
3-O-MeGal -	3-O-metil-galactopirranose
Ac ₂ O -	Anidrido acético
AcOH -	Ácido acético
AGluc -	Ácido glucurônico
BaCO ₃ -	Carbonato de bário
BF -	Butterfield
CCD -	Cromatografia em camada delgada
CD -	Czapeck-Dox
CH ₃ I -	Iodeto de metila
CHCl ₃ -	Clorofórmio
CuSO ₄ -	Sulfato de cobre
D ₂ O -	Óxido de deutério
dNTP -	Desoxirribonucleotídeos
ELISA -	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPS -	Exopolissacarídeos
Gal -	Galactose
Glc -	Glucose
GC-MS -	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
HCEML -	Isolado de <i>Exophiala spinifera</i>
H ₂ O -	Água
H ₂ SO ₄ -	Ácido sulfúrico
ITS -	<i>Internal transcribed spacer</i>
KOH -	Hidróxido de potássio
kDa -	Kilodaltons
MEV -	Microscopia eletrônica de varredura
Man -	Manose
Me ₂ SO-d ₆ -	Dimetilsulfóxido deuterado

MM -	Meio Mínimo
MgCl ₂ -	Cloreto de magnésio
M -	Molar
Mg -	Miligrama
min -	Minuto
mL -	Mililitros
NaBH ₄ -	Borohidreto de sódio
NaOH -	Hidróxido de sódio
NaB ₂ H ₄ -	Boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄ -	Boroidreto de sódio
NaBD ₄ -	Borohidreto de sódio deuterado
H ₂ O ₂ -	Peróxido de hidrogênio
PBS-BSA -	Salina tamponada - soroalbumina bovina
PBST -	Salina tamponada - Tween 20
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
p -	Piranosídico
p/v -	Peso/volume
pH -	Potencial hidrogeniônico
ppm -	Partes por milhão
Ran -	Ramnose
RMN -	Ressonância Magnética Nuclear
rpm -	Rotações por minuto
TFA -	Ácido trifluoracético
v/v -	Volume/volume
Xil -	Xilose

RESUMO

Os fungos dematiáceos constituem um grupo grande e heterogêneo, caracterizado por possuírem um pigmento escuro, dihidroxinaftaleno melanina, na parede celular de suas células. Esses fungos estão reunidos na família Herpotrichiellaceae e podem ser patogênicos em hospedeiros vertebrados. Entre as principais doenças causadas por estes agentes, destacam-se a cromoblastomicose, ocorrida após implantação traumática destes agentes no tecido subcutâneo com formação de corpos muriformes e a feohifomicose com verificação de elementos fúngicos não diferenciados no tecido do hospedeiro. O presente trabalho objetivou caracterizar o fungo *Exophiala spinifera*, agente de feohifomicose, por meio de morfologia e seqüências ITS e caracterizar os polissacarídeos sintetizados por este agente visando determinar o potencial patogênico desta linhagem através de imunoenaios. O fungo foi cultivado sob agitação constante por sete dias à temperatura de 36°C em meio mínimo (MM), que tem como fonte de carbono a glucose e em meio Czapeck-Dox (CD) cuja fonte de carbono é a sacarose. O EPS foi recuperado do meio de cultivo por centrifugação a 12.000 G e o sobrenadante foi submetido à precipitação etanólica (3:1, v/v). Esta suspensão foi mantida a -20°C *overnight* e após centrifugação resultou no EPS nativo. Da biomassa foram obtidos polissacarídeos através de extração aquosa. Para caracterizar os polissacarídeos foi determinada a composição monossacarídica (Man:Gal:Glc), avaliado espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³C e de GC-MS, sugerindo moléculas complexas. Objetivando a obtenção de anticorpos para testes imunológicos utilizou-se o fungo *E. spinifera* inativado para imunização via intraperitoneal de camundongos isogênicos balb c. Os anticorpos foram testados contra os exopolissacarídeos produzidos e os polissacarídeos obtidos da parede celular, dentre as amostras a que apresentou maior atividade imunogênica foi o EPS produzido no cultivo em meio mínimo seguido do EPS produzido no meio czapeck-dox, as amostras obtidas da parede celular do fungo *E. spinifera* apresentaram baixa atividade imunogênica.

Palavras-Chave: *Exophiala spinifera*, exopolissacarídeos, antígenos, parede celular

ABSTRACT

The dematiaceous fungi constitute a large and heterogeneous group, characterized by having a dark pigment, dihydroxynaphthalene melanine, on their cell wall. In nature they are found mostly in the soil and organic matter in decomposition. Many of them are fast growing saprobic, however some of them have tendency to pathogenicity in vertebrate hosts integrating the Herpotrichiellaceae family. Among the main diseases caused by these agents stand out the phaeohyphomycosis and Chromomycosis usually occurred after trauma implantation in the host tissue. The fungus *Exophiala sp.* is considered one of the phaeohyphomycosis and Chromomycosis agents. The present work aimed at characterizing the *Exophiala spinifera* fungus by means of morphology and molecule markers, which have been studied through its sequences. Aiming at achieving Exopolysaccharide (EPS) and biomass for further studies on these Macromolecules and obtaining out for immunology tests the fungus was cultivated in minimum environments (MM) and in Czapeck-dox (CD) environments under constant agitation for seven days at 36°C. The EPS was recovered out for the environment by 12.000 G centrifugation and the supernatant was submitted to Ethanol precipitation. This suspension was kept at -20°C overnight and after centrifugation it results in native EPS. Polysaccharides were obtained from the biomass through watery extraction. In order to characterize the EPS the EPS-MM and EPS-CD composition was determined. Isogenics Balb C mice were immunized intraperitoneal with the EPS fungus aiming at producing antibodies for immunologic tests against the EPS and wall cells of the fungus.

Key Words: *Exophiala spinifera*, exopolysaccharides, antigens, cell wall

INTRODUÇÃO

Exophiala spinifera é um microrganismo com potencial patogênico em pacientes imunodeprimidos, pertence à família Herpotrichiellaceae e também é conhecido como fungo negro devido à pigmentação encontrada em sua parede celular.

Infecções micóticas causadas por *Exophiala* sp. têm sido relatadas, e em muitos casos podem levar a óbito. A identificação e o estudo dos agentes causadores da infecção podem dar subsídios para o entendimento dos diversos quadros clínicos causados por estes agentes e nortear testes diagnósticos.

A família Herpotrichiellaceae reúne a maioria dos fungos dematiáceos, os quais são responsáveis por uma diversidade de quadros clínicos, tais como, cromoblastomicose e feohifomicose.

Espécies de *Exophiala* são fungos ambientais comuns associados freqüentemente com a madeira e ao solo deteriorado enriquecidos com resíduos orgânicos e, também, são considerados os agentes etiológicos de feohifomicose e eventualmente considerados os responsáveis por casos de cromoblastomicose.

A cromoblastomicose caracteriza-se por uma infecção normalmente limitada à região subcutânea, onde o fungo *Fonsecaea pedrosoi* é o principal agente etiológico. O termo feohifomicose abrange um amplo espectro de micoses oportunistas causadas por fungos dematiáceos, que ocorrem desde forma superficial, cutânea, subcutânea até sistêmica. Nesses tipos de infecções a produção de anticorpos no hospedeiro pode ser consequência da sensibilização por estruturas complexas presentes na camada externa da parede celular dos fungos, como os lipídios e polissacarídeos os quais podem estar envolvidos nesse processo e aparentemente exercem uma função significativa nas formações tumorais provocadas por fungos dematiáceos. Estruturas como exopolissacarídeos (EPS) também podem ser considerados como um fator de virulência com um importante papel na patogenicidade (GUTIÉRREZ et al., 1996). Deste modo, a caracterização desses polímeros vem sendo amplamente

realizada com o objetivo de esclarecer o papel destas estruturas durante o processo infeccioso (ALVIANO et al., 1992; YURLOVA e HOOG 2002).

Existe uma diversidade de relatos de infecções a partir de inoculações por estes fungos (HOOG E GUARRO, 1995) e um grande aumento no número de casos em pacientes imunodeprimidos, tais como vítimas do câncer, AIDS e transplantados.

O conhecimento das estruturas da superfície do fungo, bem como EPS contribuem para ampliar o entendimento da patogênese auxiliando assim no diagnóstico e tratamento das doenças caracterizadas por uma diversidade de quadros clínicos, envolvendo desde aspectos crônicos de difícil tratamento até as infecções de evolução rápida e muitas vezes fatal no caso dos pacientes imunodeprimidos.

É importante ressaltar que devido à grande plasticidade morfológica destes fungos, sua classificação taxonômica não se encontra totalmente definida. Sendo assim, a utilização de métodos de Biologia Molecular pode proporcionar além da comparação entre isolados patogênicos, uma caracterização mais refinada da taxonomia destes fungos, auxiliando as limitações morfológicas.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visou realizar a caracterização molecular dos isolados por meio de seqüências das regiões interespaçadoras (ITS) do gene que codifica o RNA ribossomal e caracterizar parcialmente a estrutura dos polissacarídeos produzidos pelo fungo *Exophiala spinifera* isolado de paciente com feohifomicose e utilizá-los para a produção de anticorpos policlonais em camundongos, visando estudos imunológicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar o isolado HCEML de *Exophiala* sp. por meio de morfologia e seqüências ITS e caracterizar os polissacarídeos sintetizados por este agente visando determinar a antigenicidade destes componentes através de imunoenaios.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificação do isolado por macro e micromorfologia e seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal.
- Avaliar o crescimento do isolado em meios de cultura diferentes.
- Cultivo do isolado e obtenção de EPS.
- Caracterização parcial das estruturas presentes nos EPS e nos polissacarídeos da parede celular através da espectroscopia de RMN de ^{13}C e análise de metilação.
- Produção de anticorpos e determinação de imunogenicidade dos polissacarídeos isolados de *Exophiala* sp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS DEMATIÁCEOS

Fungos dematiáceos constituem um grupo grande e heterogêneo, cuja principal característica é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas (AL-DOORY, 1983; BAYLES, 1989; DIXON E POLAK-WISS, 1991).

Estes fungos estão amplamente distribuídos entre as divisões Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (HOOG e HAASE, 1993). Estruturas morfológicas associadas a características do crescimento são critérios importantes, possibilitando o agrupamento de alguns generos.

O desenvolvimento filamentoso 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 (HOOG e GUARRO, 1995).

Entre os dematiáceos de crescimento rápido alguns grupos são caracterizados por possuírem conídios multicelulares, septados transversal e longitudinalmente (dictioporos) tais como *Altemaria*, *Stemphylium*, *Epicoccum*, *Ulocladium*. Enquanto outros gêneros como *Curvularia* e *Drecheslera*, apresentam conídios multicelulares septados apenas transversalmente. Conídios unicelulares são característicos dos gêneros sapróbios *Cladosporium*, *Nigrospora* e *Aerobasidium*.

Os fungos dematiáceos que durante parte do seu ciclo de vida apresentam desenvolvimento leveduriforme, são denominados de leveduras negras. A primeira descrição deste grupo foi feita por Marpmann em 1986, designada *Saccharomyces niger* Marpmann. Posteriormente, foram descritas leveduras negras de importância industrial nos gêneros *Moniella* e *Trichosporonoides*, divisão Basidiomicota. Esses fungos são caracterizados pela fermentação da glicose e outros açúcares, ausência de crescimento na presença de trealose,

presença do sistema decoenzima Q-9 ubiquinona, ocorrendo principalmente em substratos ácidos e gordurosos (HOOG, 1979).

As leveduras negras, Ascomycetes, compreendem dois principais grupos, anamórficos da ordem Dothideales (família Dothideaceae) e Chaetothyriales (família Herpotrichiellaceae), os quais são relacionados distantes um do outro a partir de conexões teleomórficas, morfologia de colônia e dados de filogenia baseados em seqüências do gene 18s do RNA ribossômico (UIJTHOF e HOOG 1995).

Os dematiáceos de crescimento lento produzem conídios por fiálides com ou sem colaretes em cadeia ou simpodialmente, formando uma pequena família, a Herpotrichiellaceae, a qual reúne especificamente agentes patógenos de humanos pertencentes aos gêneros *Phialophora*, *Ramichloridium*, *Rinocladiella*, *Sarcinomyces*, *Cladophialophora*, *Exophiala* e *Fonsecaeeae*.

A família Herpotrichiellaceae reúne a maioria dos fungos dematiáceos, os quais são responsáveis por uma diversidade de quadros clínicos, tais como: Cromoblastomicose, micetomas e feohifomicose. Fungos pertencentes a esta família como os gêneros *Exophiala* e *Cladophialofora* são conhecidos agentes causadores de infecções com manifestações clínicas variadas em humanos e animais (HOOG, 1993).

Frequentemente, o pigmento acumulado é a melanina, especificamente dihidroxinaftaleno melanina (DHN) (DIXON e POLAK-WISS, 1991), pigmentos carotenoides também podem ser encontrados. Esses pigmentos podem atuar na proteção do organismo contra estresses, como desidratação e radiação UV (GEIS e SZANISZLO, 1984). A melanina pode atuar também na proteção contra enzimas líticas como quitinase e glucanases (TAYLOR et al., 1987; POLAK,1989; DIXON e POLAK-WISS 1991). Linhagens que contém melanina na parede celular são mais virulentas que mutantes não melanizadas (DIXON e SHADOMY 1980a). Em fungos dematiáceos a melanina, presente na parede celular, tem função antioxidante. Isto permite que estes fungos possam infectar organismos humanos (JACOBSON et al., 1995).

A elucidação de fontes de fungos patogênicos na natureza é importante para o diagnóstico de infecções fúngicas, sendo que o conhecimento de uma

determinada área geográfica endêmica pode facilitar no diagnóstico diferencial (DIXON et al., 1980). Fungos dematiáceos patogênicos parecem estar limitados a áreas tropicais e subtropicais (MCGINNIS, 1992).

As espécies *E. dermatitidis* e *E. jeanselmei* são conhecidas por causarem a cromoblastomicose e feohifomicose (MCGINNIS, 1983; NAKA et al., 1986). *E. spinifera* também é relatada como agente causal destas infecções. (McGINNIS, 1983; PADHYE et al., 1999). Estima-se que mais de 100 espécies de fungos dematiáceos possam causar doenças, inclusive *Bipolaris*, *Exserohilum*, (que cresce na grama) e *Exophiala*, os quais podem se apresentar nos tecidos lesionados como células leveduriformes, pseudohifas, hifas verdadeiras ou qualquer combinação destas formas, sem a formação de corpos muriformes (MCGINNIS, 1992). Existem diversos relatos de casos de micoses provocados por fungos dematiáceos em pacientes imunodebilitados, tais como pacientes de AIDS (VICENTE, 2000).

A taxonomia destes grupos é baseada em caracteres morfológicos, os quais são extremamente variáveis. Sendo assim, outros métodos vêm sendo incorporados, tais como métodos fisiológicos (STEADHAM et al., 1986; HOOG e HAASE, 1993; HOOG et al., 1998, UNTEREINER e NAVEAU 1999) e moleculares, os quais permitem a comparação de anamórficos com teleomórficos (HAASE et al., 1999; UNTEREINER, 1997; UNTEREINER e NAVEAU, 1999).

Poucos grupos de fungos podem causar uma diversidade de quadros clínicos diferentes como os dematiáceos. Especialmente as leveduras negras da família Herpotrichiellaceae as quais causam micoses em humanos sem serem dependentemente parasitas animais (HOOG, 1993).

Uma hipótese supõe que os fatores de virulência podem ter sido adquiridos durante um episódio da evolução de um antepassado em comum na forma de um ramo monofilético dentro da família Herpotrichiellaceae (HOOG et al., 1999).

Sendo assim, a classificação de leveduras negras por métodos morfológicos é muito dificultada, justamente por esses fungos apresentarem ciclo de vida variado, denominado anamórfico na fase assexuada, teleomórfica na fase sexuada, o termo holomórfico é empregado quando se conhece as fases sexuada e assexuada do fungo (McGINNIS e SHELL, 1980; HOOG e GUARRO, 1995).

Métodos moleculares vêm sendo usados como auxiliares e complementares no estabelecimento de populações, variedades e espécies em fungos dematiáceos. (HOOG et al., 1999; UNTEREINER, 1997).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) vem sendo utilizada na identificação de anéis de crescimento, cicatrizes e na identificação de *Exophiala* spp. (DIXON e SHADOMY, 1980a).

Os patógenos dos gêneros *Exophiala* e *Cladophialophora* parecem ser membros anamórficos da família Herpotrichiellaceae dos Ascomicetos (MASCLAUX et al., 1995; UNTEREINER, 1997).

Uma análise filogenética de 55 linhagens, todas membros da família Herpotrichiellaceae (Ordem Chaetothyriales), incluindo 11 teleomórficos do gênero *Capronia*, foi realizada a partir do seqüenciamento do gene DNA ribossomal 18S. Neste estudo foram encontradas novas combinações para espécies de *Exophiala* e *Cladophialophora*. A partir dos dados obtidos os autores concluíram que a família Herpotrichiellaceae surgiu durante um período evolucionário relativamente curto, a qual se encontra num processo ativo de evolução, principalmente para os agentes patogênicos humanos (HAASE et al., 1999).

A presença de íntrons em linhagens originárias de diversos continentes sugere uma rápida adaptação para hospedeiros humanos (GERRITS VAN DEN ENDE e HOOG, 1999). De acordo com Hoog et al. (1998), a evolução da família Herpotrichiellaceae pode ter sido dirigida pelas preferências ecológicas, refletindo um padrão de adaptação destes agentes para humanos, onde provavelmente a patogenicidade seria um processo evolutivo de múltiplos passos, cuja pressão evolutiva seria a adaptação para a condição especial de sobrevivência no corpo humano.

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO

Em geral, a infecção por estes fungos ocorre devido à implantação traumática destes no hospedeiro (MCGINNIS, 1983; MONTERO-GEI, 1970; RIPPON, 1988). Diversos desses agentes são considerados oportunistas (HOOG e GUARRO, 1995), pois habitam nichos ecológicos não animais e estão presentes em tecidos humanos por acaso.

A maioria dos fungos dematiáceos causadores de micoses humanas encontra-se agrupada na família Herpotrichiellaceae, ordem Chaetothyriales, mas algumas espécies estão classificadas na ordem Dothideales. Existem diversos relatos de infecções a partir de traumas (HOOG e GUARRO, 1995). Entre as infecções micóticas causadas por estes fungos, inclui-se micetomas eumicóticos, feohifomicoses e cromoblastomicose, as quais podem afetar simplesmente a região de inoculação, interiorizar-se ou disseminar-se (MONTERO-GEI, 1970; MCGINNIS, 1983; RIPPON, 1988).

A cromoblastomicose é uma infecção caracterizada pela formação de nódulos cutâneos verrucosos de desenvolvimento lento, esta moléstia se localiza de preferência na pele e tecido subcutâneo, propagando-se, às vezes, à rede linfática da região afetada (HOOG e GUARRO, 1995). Entre os agentes etiológicos mais comuns estão: *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala spinifera*. A cromoblastomicose pode ser considerada uma doença ocupacional e sua principal ocorrência se dá em regiões de clima tropical como Madagascar, norte da Venezuela, e região amazônica do Brasil, (ESTERRE e QUEIROZ-TELLES, 2006).

Apesar de ser relatada como infecção de ocorrência tropical, há estudos que relatam casos na região sul do Brasil. No estado do Paraná, um estudo com 71 pacientes diagnosticados como portadores da doença, o agente etiológico mais freqüente foi *Fonsecaea pedrosoi*, isolado em 95,5% dos casos; porém, em três ocasiões, detectou-se a presença de agentes incomuns: *Fonsecaea monophora*, *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala castellanii*. A separação clínico-patológica entre alguns tipos de lesões de cromoblastomicose e da feohifomicose subcutânea é imprecisa, sugerindo tratar-se de uma doença espectral (QUEIROZ, 1997).

A feohifomicose é uma infecção que se manifesta como um processo crônico e destrutivo. (MCGINNIS, 1983; MONTERO GEI, 1970; RIPPON, 1988), Todos estes fungos aparecem semelhantes nos tecido, logo para seu diagnóstico etiológico devem ser cultivados e examinados ao microscópio a partir de sua cultura.

A feohifomicose abrange as micoses oportunistas causadas por fungos dematiáceos, que ocorrem desde as formas superficial, cutânea, subcutânea e

até sistêmica. Os pacientes imunodeprimidos são os que apresentam maior risco. A forma subcutânea ocorre em países de clima tropical, subtropical e temperado, sendo *Exophiala jeanselmei* o agente mais freqüente (KNOW-CHUNG e BENETT, 1992); porém Padhye et al. (1999) relataram um caso clínico de feohifomicose subcutânea causada por *Cladophialophora devriseii*.

Feohifomicose causada por espécies de *Exophiala* têm sido relatada em pacientes normais e imunodeprimidos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

A feohifomicose cerebral apresenta ampla distribuição geográfica, sendo causada principalmente por *Cladophialophora bantiana*, *Exophiala dermatitidis*, *Ramichloridium mackenziei* (WALZ et al., 1997; HORRÉ e HOOG, 1999). Há relatos de que *Cladophialophora arxii* e *Fonsecaea pedrosoi*, agente conhecido da cromoblastomicose, são agentes causais desta doença (TINTELNOT et al., 1995; KRAVOLIC et al., 1998),

Os leucócitos, para protegerem o organismo de infecções ocasionadas por microrganismos, secretam substâncias altamente oxidantes. Para que estes fungos possam sobreviver a este ataque, eles necessitam de alguma substância que neutralize estes agentes oxidantes. Em fungos dematiáceos, a melanina, presente na parede celular, tem função antioxidante. Isto permite que estes fungos possam infectar organismos humanos (FARBIARZ et al., 1990).

As infecções causadas por estes fungos normalmente são curáveis com ressecção cirúrgica da lesão e terapia antifúngica. Os antifúngicos mais utilizados são Anfotericina B, Fluorocitosina e Itraconazol isolados ou associados (MATTE, et al., 1997), Cetoconazol e Fluconazol também são utilizados em infecções fúngicas.

A Anfotericina B se liga ao ergosterol da membrana celular dos fungos, provocando a desintegração das mesmas e extravasamento do conteúdo celular, destruindo a célula. A droga de primeira escolha nos casos de infecções fúngicas graves e de infecções fúngicas em pacientes leucopênicos é a anfotericina B já que a resistência a esse antibiótico é rara. Este antifúngico tem amplo espectro de ação incluindo: *Aspergillus*, *Candida*, *Blastomices*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*, *Rhizopus*, entre outros. É administrado por via endovenosa sob a forma de dispersão coloidal e liposomal, encapsulada em liposomos. Náuseas,

vômitos, cefaléia, febre e tremores são os efeitos colaterais mais comuns que se tornam mais brandos ao longo do tratamento. Esses efeitos adversos também podem ser minimizados diminuindo a velocidade de infusão do soro, pela adição de hidrocortisona 50 mg durante a infusão colocada no soro que corre em Y ou ainda administração por via parenteral de clorfeniramina (12,5 mg a 25 mg). Podem ser detectados sinais de toxicidade renal, com elevação da concentração sérica de creatinina e hipopotassemia (NETO e FIGUEREDO 1996).

A fluorocitosina é uma pirimidina fluorinada sintética que, ao ligar-se à célula fúngica, causa alterações na síntese protéica e na inibição da síntese de DNA do microorganismo. Seu espectro de ação limita-se a espécies de: *Candida*, *Cryptococcus*, *Cladosporium*, *Fonsecae* e *Phialophora*. Sua principal indicação é como coadjuvante no tratamento da neurocriptococose, em associação com a anfotericina B (NETO e FIGUEREDO 1996).

O cetoconazol é um imidazólico sintético que interfere com a biosíntese do ergosterol, causando alterações na estrutura e função da membrana celular do fungo. É um antifúngico de amplo espectro de ação, incluindo espécies de *Candida*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (NETO e FIGUEREDO 1996).

O Itraconazol é um composto triazólico sintético que interfere na 14-alfa demetilação, dependente do citocromo P 450, da síntese do ergosterol, alterando a estrutura e função da membrana celular do fungo. Tem amplo espectro de ação, incluindo espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*. O fluconazol é um composto bi-triazólico sintético, com mecanismo e espectro de ação semelhante ao itraconazol (NETO e FIGUEREDO 1996).

Roizenblatt (1999) descreveu dois casos de pacientes com endoftalmite micótica tardia após facectomia com implante intraocular o fungo identificado foi o dematiáceo *Exophiala jeanselmei*. A anfotericina B intravítrea e em câmara anterior foi utilizada no tratamento destes pacientes, a resolução clínica aparente foi atingida, embora após três meses em um caso e seis meses em outro houve recidiva do processo infeccioso de forma mais agressiva que a manifestação inicial, evoluindo para endoftalmite severa e atrofia do globo ocular.

Infecção ocular por *Exophiala jeanselmei* é muito rara e grave, sendo o isolamento e a identificação do agente de grande importância na orientação

correta de uma possível conduta clínica e cirúrgica. Após a remissão do quadro infeccioso, recomenda-se acompanhamento prolongado e cuidadoso, para a detecção precoce e reintrodução imediata do tratamento (ROIZENBLATT, 1999).

2.3 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR FÚNGICA

Além dos pigmentos carotenóides e a melanina (GEIS e SZANISZLO, 1984; TAYLOR et al., 1987; POLAK, 1989; DIXON et al., 1991) que são prováveis responsáveis pela proteção contra alguns estresses, a parede celular pode conter proteínas, glicoproteínas e carboidratos, entre outros componentes.

Os carboidratos podem ser divididos em homopolissacarídeos, que são polissacarídeos contendo apenas um tipo de unidade monomérica e podem ser distinguidos por seus locais de síntese de substrato (SUTHERLAND, 1982) onde os dextrans e levanos são sintetizados a partir de um substrato específico, como a sacarose, por processo essencialmente extracelular, e os heteropolissacarídeos que contém dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas e são sintetizados intracelularmente a partir de várias fontes de carbono e então excretados. Essas unidades monoméricas são conhecidas como monossacarídeos, que apresentam grupos aldeídos ou cetonas contendo grupos hidroxilas ligados à molécula. Os polissacarídeos são polímeros que ligam centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos (SUTHERLAND, 1982).

Homopolissacarídeos como glicogênio, uma α glucana consistindo de uma cadeia linear de α -(1 \rightarrow 4)-D-Glcp com ramificações compostas por α -(1 \rightarrow 6)-D-Glcp, agem como reserva de monossacarídeos utilizados na obtenção de energia ou como elementos estruturais de paredes celulares. Foi determinado que uma α -glucana semelhante ao glicogênio isolada da parede celular de *Pseudallescheria boydii* está envolvida na ativação de receptores do tipo Toll (TLRs -*Toll-like receptors*) com respectiva indução da resposta imune inata (BITTENCOURT. et al 2006). TLRs são uma família de proteínas transmembranas do tipo I homólogas a receptores Toll encontradas em *Drosophila* (MEDZHITOV et al., 1997; ROCK et al., 1998). TLRs estão envolvidos na indução à resposta a uma infecção, essas proteínas são mediadoras da ligação de moléculas presentes nos patógenos e conseqüente

indução da resposta imune adaptativa promovendo atividade antimicrobiana através da produção de citocinas (TAKEDA et al., 2003, IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

Lipídeos de superfície e proteínas influenciam na aderência dos fungos com as células a serem infectadas. Souza et al., 1986, estudaram a interação de resíduos de manose e de *N*-acetilglucosamina no processo de conexão e invasão em *Fonsecaea pedrosoi*. Ainda, em células de *F. pedrosoi* foram detectados polissacarídeos compostos de glucose, manose galactofuranose, ramnose e glucosamina; e os seguintes ácidos graxos: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico e ácido aracdônico (ALVIANO et al., 1995).

Carboidratos de forma geral exercem um papel importante no reconhecimento celular, podem ainda funcionar como sítios de ligação para toxinas (GRIFFITTS et al., 2005). Desempenham funções como transferência e armazenamento de energia e são os principais componentes da parede celular. São classificados em carboidratos estruturais, compondo a membrana celular e mantendo a função de sustentação das plantas, e carboidratos não estruturais, atuando em processos bioquímicos diversos, que necessitam da parte de carboidratos que é armazenada em estruturas de reservas.

Açúcares são considerados responsáveis por desencadear a resposta imune, porém os mecanismos ainda são desconhecidos (DISSANAYAKE, 2004).

2.4 EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

A superfície celular microbiana é uma fonte rica em moléculas contendo carboidratos. Os fungos produzem grande variedade de estruturas polissacarídicas. Os polissacarídeos constituem grande parte da biomassa do fungo na qual a parede das hifas geralmente contém mais de 75% de carboidratos (GUTIÉRREZ et al., 1996).

Os polissacarídeos dos fungos podem ser encontrados no meio extracelular (EPS), no meio intracelular ou podem estar associados às paredes ou membranas. São encontrados na forma de homopolímeros, heteropolímeros, glicoproteínas ou peptideopolissacarídeos (GUTIÉRREZ et al., 1996). É possível a visualização de EPS através de microscopia ótica por coloração negativa ou

utilizando corantes especializados (SUTHERLAND, 1988).

Hifas estão sujeitas a alteração das condições nutricionais, isto provoca mudanças nas características morfológicas durante o crescimento, é possível que os polissacarídeos de parede tenham o mesmo comportamento nessas condições (BARDALAYE e NORDIN, 1976).

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma importante ferramenta na pesquisa biológica, é utilizada na elucidação de estruturas ou no estudo de mecanismos biológicos (WAGNER, 1997). É usualmente utilizada na determinação estrutural de oligossacarídeos e polissacarídeos (AGRAWAL, 1992; VAN HALBEEK, 1994), pois é útil na determinação da configuração glicosídica, posição das ligações, seqüência de ligação, e da conformação espacial de oligossacarídeos ou partes específicas de carboidratos complexos (EVANS, 1996).

Os EPS são compostos primariamente de carboidratos, esses carboidratos são extremamente variados, a maioria dos açúcares são aqueles mais comumente encontrados nos polissacarídeos de animais e plantas. D-glucose, D-galactose e D-manose estão presentes em muitos EPS na forma piranosídica (SUTHERLAND, 1990).

Polissacarídeos são antigenicamente importantes, como antígenos e também estão envolvidos em mecanismo de reconhecimento célula-célula ou célula-hospedeiro (AHRAZEM et al., 1997).

Os fungos da família Herpotrichiellaceae utilizam resíduos de polissacarídeos para aderirem e entrarem em células a serem parasitadas. No processo de adesão o fungo invasor conecta-se com resíduos de manose presentes na membrana plasmática da célula e utiliza resíduos de *N*-acetilglucosamina no processo de ingestão (LIMONJI et al., 1997). A presença de polissacarídeos contendo glucose, manose, ramnose e glucosamina em suas estruturas, foi observada nos componentes do micélio da membrana externa de *F. pedrosoi*.

2.5 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO E TAXONOMIA DE FUNGOS DEMATIÁCEOS

A variabilidade genética em microrganismos pode ser evidenciada por técnicas clássicas ou moleculares. As técnicas clássicas baseiam-se na análise a partir da caracterização morfológica ou bioquímica, já as técnicas moleculares são utilizadas em grande escala no estudo da biodiversidade de fungos e oferecem ferramentas para análise da identidade e características do microrganismo através dos ácidos nucleicos.

Dentre as várias técnicas de biologia molecular utilizadas para a detecção da variabilidade genética está análise do DNA ribossômico através de seqüências ITS. O uso do DNA ribossomal (rDNA) como marcador molecular, também pode ser empregado na análise da variabilidade genética, para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. As seqüências codificantes do rDNA evoluem lentamente e são altamente conservadas, possibilitando, assim, estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Ao contrário do rDNA, as regiões espaçadoras internas destes genes, conhecidas como ITS evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo desta forma, de grande interesse nos estudos filogenéticos de gêneros, espécies e populações (WHITE et al., 1990).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, foi possível a produção, *in vitro*, de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA, sem que estes segmentos fossem clonados (ALBERTS et al., 1994). A técnica baseia-se na desnaturação do DNA submetendo-o a altas temperaturas, permitindo que as duas fitas simples formadas sejam duplicadas. É necessário um par de oligonucleotídeos utilizado como iniciador (*primers*), que irá se anelar às fitas simples do DNA em suas extremidades 3' OH.

Os *primers* são produzidos artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares à seqüência específica. SAIKI et al. (1985) isolaram uma DNA polimerase (*Taq* polimerase) de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que vive em fontes térmicas, e cuja enzima polimeriza a 72°C,

mantendo assim a atividade por algumas horas a 95°C. Isso possibilitou a completa automatização do processo de PCR (WATSON et al., 1992).

Um estudo feito por ABLIZ et al. (2003) objetivou investigar a eficácia das análises de seqüências de domínios D1/D2 de DNAr na identificação de fungos dematiáceos. HAYNES et al. (1995), propuseram a identificação e detecção de diversos fungos patogênicos de humanos utilizando PCR específica a partir de *primers* de seqüência de DNAr. Os produtos de seqüenciamento para cada fungo analisado eram bandas de tamanhos diferentes, possibilitando a padronização para cada espécie em questão.

O uso de seqüências específicas de RNAr para a identificação das relações filogenéticas, tem representados um grande avanço no estudo de fungos dematiáceos de importância clínica. Anamórficos de *Exophiala* (leveduras negras) foram acomodados como ascomicetos a partir de seqüências 18s e ITS de DNAr (HOOG et al., 1998). Untereiner et al. (1995), desenvolveram um estudo baseado na seqüência SSU (subunidade menor) região 18s do DNAr, demonstrando a correlação existente entre espécies de *Exophiala* e leveduras negras anamórficas.

Exophiala e *Phialophora* foram relacionados próximos através de seqüências ITS1, onde *Phialophora verrucosa* agrupou-se entre *Exophiala* sp. (YAN et al., 1995 HOOG et al., 1999).

A levedura negra *Exophiala dermatitidis* é um patógeno humano em potencial (HORRÉ e HOOG, 1999). Na Europa o fungo tem sido caracterizado como um colonizador subclínico de pacientes com fribrose cística (HAASE et al., 1995). Em contraste, casos neurológicos fatais têm sido relatados no Japão em pacientes aparentemente saudáveis e imunologicamente normais (HIRUMA et al., 1993). Biologicamente, esta espécie apresenta um alto grau de polimorfismo desde formas leveduriformes, pseudomicélio, micélio, corpos multicelulares, além da variação na forma dos conídios (HOOG et al., 1994) com nenhum teleomórfico descrito. Entretanto, diversas espécies de Ascomicetos do gênero *Capronia* da família Herpotrichiellaceae apresentam anamórficos do tipo *Exophiala* em cultura (UNTEREINER et al., 1995; 1997). Estudos taxonômicos realizados a partir de seqüência da região 18s do gene DNAr possibilitaram a reunião de *E. dermatitidis* e espécies do gênero *Capronia* (HAASE et al., 1999).

Exophiala spinifera é morfologicamente diferenciada dentro do gênero *Exophiala*, apresentando conidióforos multicelulares é uma das espécies de maior virulência dentro do grupo (WANG et al., 1987). Haase et al. (1999), demonstraram que *E. spinifera* e *E. jeanselmei* constituem um grupo filogeneticamente delimitado dentro da família Herpotrichiellaceae e distinto de outras espécies de *Exophiala*. Hoog et al. (1997), verificaram tal correlação analisando seqüências ITS e caracteres fisiológicos. Neste estudo foi verificado a relação entre o sinanamórfico *Phaecoccomyces exophiale* com *Exophiala spinifera*, reunidos no mesmo grupo baseados nas distâncias do domínio completo das regiões interespadoras (ITS) e a região 5.8s do gene DNAr.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foi utilizado um isolado *Exophiala* sp. HCEML gentilmente cedida pelo setor de micologia do Hospital de Clinicas de Curitiba. A amostra foi isolada de paciente imunodeprimido.

3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.2.1 Czapeck-Dox (CD)

Sacarose	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L

3.2.2 Butterfield (BF)

Glicerol	5 mL
MgSO ₄	1,5 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L

3.2.3 Meio Mínimo (MM)

NaNO ₃	6g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄	0,01g
Zn SO ₄	0,01g
Glucose	10g
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L

3.2.4 Sabouraud Dextrosado

Dextrose	40g
Neopeptona	10g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

pH foi ajustado para 7 e a solução mantida em geladeira.

3.2.5 DNA Polimerase

Para as reações de amplificação foi utilizado Taq polimerase da marca Invitrogen com concentração de 5 U/ μ L.

3.2.6 dNTP

Os desoxirribonucleotídeos dATP, dTTP, dGTP, dCTP foram diluídos em água ultra pura a 2,5 Mm. Foi utilizada a concentração final de 0,2 mM para cada dNTP nas reações de amplificação.

3.2.7 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TBE 1X	100 mL

3.2.8 Gel de Agarose (1,6%)

Agarose	1,6 g
Tampão TBE 1X	100 mL

3.2.9 Primers

TABELA 1 - SEQÜÊNCIA E POSIÇÕES ESPECÍFICAS DOS *PRIMERS* PARA AMPLIFICAÇÃO DOS DIFERENTES DOMÍNIOS DO DNAr

<i>Primer</i>	Seqüência 3'→ 5'	Posição*	Referências
1. V9D	TA AgT CCC TgC CCT TTg TA	SSU 1610-1629	Hoog e Gerrits van den Ende (1998)
2. LS266	gCA TTC CCA AAC AAC TCg ACT C	LSU 287-266	Masclaux et al. (1995)
3. ITS1	TCC Gta ggT gAA CCT gCg G	SSU 1768-1787	White et al. (1990)
4. ITS4	TCC TCC Gct TAT TgA TAT gC	LSU 69-50	White et al. (1990)

* A posição do *primer* é relativa à *Saccharomyces cerevisiae*

Os *primers* foram diluídos água ultra-pura usando o peso molecular do *primer* individual dado pelo fornecedor. Os *primers* diluídos foram mantidos a -20°C.

3.2.10 Tampão CTAB

Tris-base	2,42 g
Cloreto de sódio	8,2 g
Na-EDTA	0,74 g
CTAB	2 g
Água ultra pura	80 mL
pH 7,5	

3.2.11 Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X) – Ph 8,0

Tris-base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5M	20 mL
Água ultra pura	q.s.p. 500 mL

3.2.12 Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TEB 1X)

TEB 10X	100 mL
Água ultra pura	900 mL

3.2.13 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl (Ph 8,0)	20 mM
EDTA	20 mM

3.2.14 Brometo de Etídio

O brometo de etídio 1,0% (p/v) foi dissolvido em água destilada, agitando-se por 2 horas (SAMBROOK; FRITSCH e MANIATIS, 1989). A solução foi estocada a temperatura ambiente. Para a revelação, foram diluídos em 3 μ l de água destilada.

3.2.15 Solução PBS-BSA (salina tamponada - soroalbumina bovina) 1%

PBS	100 mL
BSA	1g

3.2.16 Solução PBS-BSA (salina tamponada - soroalbumina bovina) 0,1%

PBS	100 mL
BSA	0,1 g

3.2.17 Solução PBST (salina tamponada - Tween 20) 0,05%

PBS 1x	1000 mL
Tween 20	500 μ L

3.3 ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura e o material utilizado para biologia molecular foram esterilizados em autoclave com pressão atmosférica de 1 atm durante trinta minutos. Com o material contaminado seguiu-se o mesmo procedimento por quarenta minutos para depois ser descartado.

3.4 MANUTENÇÃO E REPIQUE DOS ISOLADOS

Para ser estocado o fungo isolado foi repicado em frascos com ágar Sabouraud e incubados a 36°C. Após o crescimento estes frascos foram mantidos a 4°C. Os repiques eram repetidos cada quarenta dias.

3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A amostra foi cultivada em ágar Sabouraud por sete dias a 28°C. Em seguida foi coletado 1 cm² do micélio, que foi macerado em uma mistura esterilizada com 300 µL de tampão CTAB e sílica gel/celite 2:1 por cinco minutos. Adicionou-se 200 µL de tampão CTAB, misturando bem em agitador de tubos e incubado por dez minutos a 65 °C. Após a incubação foram adicionados 500 µL de clorofórmio seguida de centrifugação por cinco minutos a 20500 G. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo “ependorf”, ao qual foram adicionados 800 µL de etanol 96% gelado e colocado no freezer (-20°C) por trinta minutos, para precipitação do DNA. Foi feita nova centrifugação a 20500 G por cinco minutos seguida da retirada do sobrenadante. O precipitado de DNA foi lavado com 500 µL de álcool 70% gelado e misturado cuidadosamente. Em seguida foi realizado nova centrifugação a 20500 G por cinco minutos, retirada do sobrenadante e o DNA foi deixado desidratando a temperatura ambiente por 15 minutos (com o tubo aberto e vertido). O *pellet* foi ressuscitado em solução contendo 97,5 µL de tampão TE e a mistura incubada a 37°C por cinco minutos. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% e os DNAs armazenados à temperatura de -20°C.

3.6 PCR – RIBOTIPAGEM

Fragmentos de DNA ribossômico foram amplificados usando os pares de *primers* V9D e LS266 (Tabela 1). Para a reação de PCR foi utilizado um volume de 50,3 µL contendo 25 µL de água ultra pura; 10 mM tris-HCl; 1,5 mM MgCl₂ 6H₂O; 200 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado; 50 pmol de cada *primer*; 0,5 U de Taq DNA polimerase, 2 µL de DMSO e entre 10 - 100 ng de DNA total. O programa de amplificação utilizado consistia de 30 ciclos (30s de desnaturação a 99°C; 60s de anelamento a 55°C; 60s de síntese a 72°C), utilizando dois minutos para a desnaturação inicial e três minutos de extensão final. Os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,6% (utilizando 7 µL de amostra e 3 µL de tampão de amostra). O gel foi corado em solução de Brometo de etídio e os fragmentos de amplificação obtidos foram visualizados em foto-documentador de gel. O marcador de peso molecular utilizado foi de 1 Kb.

3.6.1 Purificação dos Produtos da PCR

Ao tubo da amplificação foi adicionado 2/3 do volume já existente de acetato de amônia 7,5 M e 2,5 vezes o volume de amplificação com etanol 96°, foi incubado por 5 minutos. Em seguida realizou-se centrifugação a 20500 G por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foi acrescido 100 µL de etanol 70% e nova centrifugação a 20500 G por 15 minutos foi realizada. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA secado a vácuo e em seguida suspenso em 15 µL de água ultra-pura. Os produtos da purificação foram visualizados em gel de agarose 1,6% utilizando fago lambda ($\lambda\emptyset$) digerido como marcador de peso molecular referencial para a determinação da concentração do DNA.

3.6.2 Reação de Seqüenciamento

Na PCR realizada para o seqüenciamento foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4 (Tabela 1). Para cada reação foram usados 2 µL do mix “Bigdye terminator” (*Terminator Ready Reaction* da *Perkin-Elmer Applied Biosystem*), 30

ng do produto de PCR purificado, 0,5 μ L do *primer* (ITS1 ou ITS4) e água ultra pura a completar 10 μ L de reação. O programa de amplificação consistiu de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C; 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após 25 ciclos foi realizada refrigeração a 4°C.

3.6.3 Precipitação do DNA Para ser Seqüenciado

Para o volume de 10 μ L de reação foram adicionados 1 μ L de solução de acetato de amônio 7,5M, 10 μ L de água ultra pura, 65 μ L de etanol a 96°C. A mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 20500 G por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* de DNA lavado com 100 μ L de etanol 70% e centrifugado a 20500 G por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado e o *pellet* secado a vácuo por 15 minutos na ausência de luz.

3.6.4 Seqüenciamento

Após o tratamento descrito no item 3.6.2 os tubos foram embalados em papel alumínio, protegendo-os da luminosidade. Cada amostra foi suspensa em 5 μ L de água ultra pura e submetida à eletroforese no seqüenciador automático de DNA modelo “Prism ABI” (377) da “Perkin-Elmer”.

3.6.5 Edição e Análise das Seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1977), analisadas e comparadas com outras seqüências existentes no banco de dados do NCBI (2004) pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

3.7 ÁRVORE FILOGENÉTICA

Uma tentativa de alocação da espécie patogênica dentro de uma unidade taxonômica (táxon) mais limitada foi realizada através de análises filogenéticas das seqüências obtidas no *GenBank* de subunidades (táxons) do grupo mais

inclusivo e outros grupos irmãos. As seqüências de nucleotídeos foram processadas com o auxílio do programa BIOEDIT (HALL, 1999) e alinhadas através do uso do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994), sendo que as áreas de alinhamento ambíguo foram excluídas.

A reconstrução filogenética com dados moleculares foi executada utilizando o método de máxima parcimônia (HILLIS et al., 1996) (utilizando dados não pesados e pesagem maior para transversões - 2:1). Os programas Paup*4.0 b10 (SWOFFORD, 2003) foram usados, de acordo com os métodos de reconstrução empregados. A busca da árvore mais parcimoniosa em cada análise foi realizada através da comparação de resultados de dez adições aleatórias de táxons. Suporte de ramos das hipóteses filogenéticas resultantes obtidas através das análises de parcimônia foi determinado através de reamostragem por Bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Um total de cem réplicas foi utilizado para cada análise.

3.8 CURVAS DE CRESCIMENTO

Amostras do isolado HCEML de *Exophiala* sp. foram inoculadas em 250 mL dos meios de cultura, Czapeck-Dox (CD) à base de sacarose, Butterfield (BF) com glicerol e Meio Mínimo (MM) composto por glucose, contidos em frascos Erlenmeyer, estes foram incubados a uma temperatura de 37°C sob agitação durante 24 horas. Após 24 horas de incubação foi retirado, de cada meio de cultura, uma alíquota de 10 mL utilizando pipeta de vidro esterilizada. Do volume retirado, 1 mL foi separado para dosagens dos açúcares, os outros 9 mL restantes foram filtrados a vácuo e realizou-se precipitação etanólica como descrito no item 3.9. Todo esse processo foi repetido a cada 24 horas de incubação durante oito dias.

As curvas de crescimento e de produção de EPS foram elaboradas utilizando o peso da biomassa retida na filtração, após a liofilização, e com o precipitado de EPS dialisado e liofilizado.

Além das curvas de crescimento e produção de EPS foi analisado o consumo de sacarose no meio CD e glucose no meio de MM. A metodologia empregada na quantificação de glucose procedeu-se com o uso do kit de glucose oxidase, por espectrofotometria. Para a dosagem de sacarose o método utilizado

foi CCD, como padrões foram utilizadas soluções de sacarose em diferentes concentrações. Os resultados observados com a revelação (com orcinol) da placa de cromatografia foram transmitidos e analisados com o auxílio do programa *Scion Image*, onde procedeu-se a digitalização da imagem para realizar a densitometria da curva padrão de sacarose e as amostras obtidas nos diferentes dias de crescimento. Após a densitometria das áreas, os dados foram plotados em gráficos no programa Microsoft Excel 2000.

3.9 EXTRAÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Após o cultivo da linhagem 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 vinte minutos, deixado a -20 °C *overnight*. Após este período, a solução resultante foi centrifugada a 8.400 G por dez minutos. A purificação dos polissacarídeos foi realizada por diálise aberta, através de membranas com limite de exclusão de 16 kDa por 48 horas, o produto da diálise foi, então, liofilizado e pesado para o cálculo de rendimento de cada amostra coletada.

3.10 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE MICÉLIO

A extração aquosa foi realizada em autoclave sob pressão de 1atm a 120°C por quarenta minutos. O polissacarídeo foi obtido por precipitação etanólica (3:1v/v) da solução obtida após centrifugação do micélio, como descrito no item 3.9.

3.11 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

3.11.1 Hidrólise Ácida Total

Alíquotas de polissacarídeos (~ 1 mg) foram tratadas com 1 mL de TFA (ácido trifluoracético) 2 M, durante oito horas a 100°C (SASSAKI et al., 1999; 2001; SASSAKI 2001). Após este tempo o ácido foi eliminado por evaporação até

secura. Os monossacarídeos formados foram submetidos ao processo de redução e acetilação, conforme descrito no item 3.10.2.

3.11.2 Redução e Acetilação

Os monossacarídeos obtidos pela hidrólise foram reduzidos com NaBH_4 (borohidreto de sódio) (WOLFROM; THOMPSON, 1963a) em temperatura ambiente, pH 9-10, por 16 horas. Após este período, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica, até pH 7, para remoção do sódio, as amostras foram então filtradas e levadas à secura sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol (4x), na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com mistura de anidrido acético (Ac_2O)/piridina 1:1 (v/v) *overnight* (WOLFROM; THOMPSON, 1963b), a temperatura ambiente. O processo foi interrompido por adição de gelo e o material acetilado foi extraído 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 os acetatos de alditóis foram analisados por CG-EM.

3.11.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foram realizadas em cromatógrafo a gás, marca VARIAN, modelo SATURN 2000R, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. As análises foram realizadas com temperatura inicial do cromatógrafo de 50°C (mantida por um minuto), seguindo-se um 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 mantida isotermicamente até o final da análise por quarenta minutos. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹.

3.11.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram adicionados 100 μ L de água destilada ao hidrolizado e com este foi feito CCD (TLC). O solvente utilizado como fase móvel foi o formado pelas seguintes substâncias: acetato de etila, ácido acético, propanol e água, nas proporções de (4:2:2:1). Os padrões utilizados foram xilose, ramnose, ac. glucurônico, manose, galactose e glucose, e revelados com o reativo orcinol- H_2SO_4 (SKIPSKI, 1975).

3.11.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de ^{13}C foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400 com transformador de Fourier, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram analisadas em “probe” de 5mm de diâmetro, à temperatura de 50°C, utilizando como solventes água deuterada (D_2O) ou dimetilsulfóxido deuterado (Me_2SO-d_6), foram utilizados acetona ou Me_2SO-d_6 como padrões internos e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em PPM.

3.11.6 Metilação

Uma alíquota (1 mg) do EPS foi solubilizada em 1 mL de DMSO, a esta solução foi colocado excesso de NaOH e 1 mL de iodeto de metila, agitado vigorosamente em vortex por 40 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 ambiente. Os polissacarídeos *per-O*-metilados foram hidrolisados com 0,5 mL de H_2SO_4 72% em banho de gelo, após uma hora, foram adicionados 4 mL de água e o material mantido em estufa a 100°C por 21 horas. A solução foi neutralizada com carbonato de bário e centrifugada, o sobrenadante foi filtrado e os monossacarídeos *per-O*-metilados foram reduzidos ($NaBD_4$) acetilados conforme item 3.11.2 e analisados por CG-EM.

3.12 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS

Camundongos isogênicos (balb c) foram imunizados via intraperitoneal com emulsão contendo a biomassa do fungo *E. spinifera* previamente autoclavada e congelada com o objetivo de esterilizar a amostra. Em seguida testava-se a viabilidade da amostra através de repique em ágar Sabouraud e posterior incubação à 36°C durante dez dias. Na ausência de crescimento as amostras eram, então, utilizadas para aplicação nos animais. Uma aplicação era realizada a cada 15 dias, foram feitas três aplicações, passados noventa dias da primeira aplicação o animal foi sangrado, e o sangue foi centrifugado para obtenção do soro contendo os anticorpos, os quais foram utilizados nos testes de imunogenicidade.

3.12.1 Preparação da Placa de ELISA

O experimento de ELISA foi realizado com o antígeno contendo carboidrato, para isto, a placa de reação foi tratada para se formar uma matriz de sílica Gel G na superfície de cada poço (o carboidrato não adsorve em plástico) para que o carboidrato fosse imobilizado.

A matriz de Sílica Gel G da superfície de cada poço foi feita com uma solução de Bálsamo do Canadá na concentração de 20 mg/mL de xilol (xileno) e como subsequente adição de 100 µL de sílica a 250 mg/mL em xilol, em cada poço da placa de ELISA. A placa foi seca a temperatura ambiente, estando pronta para o uso após três dias de secagem.

3.12.2 Reação Imunoenzimática

Para adsorção do antígeno na placa foi feito uma diluição da solução estoque de carboidrato na concentração de 50 µg por poço da placa que foi seca à temperatura ambiente.

Em seguida foi realizado o bloqueio da placa (esta etapa é necessária para que os lugares onde não houve adsorção de antígeno sejam bloqueados com

uma solução inerte, para que o anticorpo não venha se ligar nesses espaços) com 100 μL de albumina bovina em PBS 1% por uma hora à temperatura ambiente, então os poços foram lavados 5x com PBST

Para ligação do anticorpo primário na placa foi utilizada uma diluição seriada do anticorpo nos poços e após três horas de incubação os poços foram lavados 5x com PBST.

A ligação do anticorpo secundário foi feita com adição de 100 μL de solução de anticorpo anti mouse em diluição 1:4000 em cada poço da placa, incubou-se por uma hora à temperatura ambiente na ausência de luz em seguida os poços foram lavados 5x com PBST.

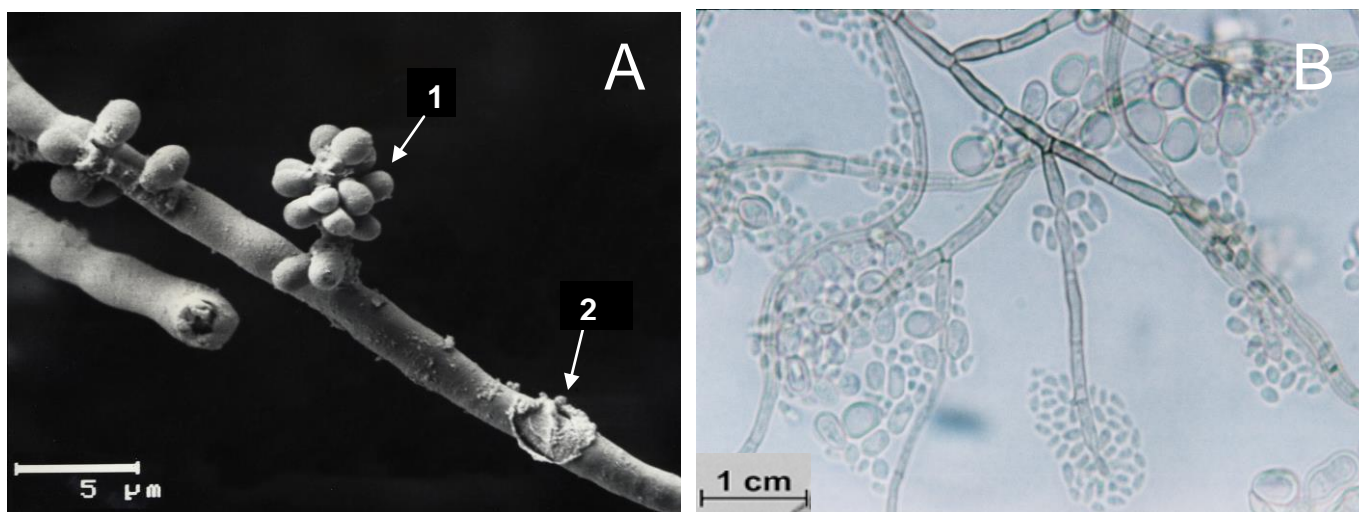
Na revelação para visualização da reação foi utilizado OPD (*O-phenylenediamine dihydrochloride*) na concentração de 0,2 mg/mL de tampão citrato e 2 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a reação foi bloqueada com 100 μL de H_2SO_4 2N (1M). A placa foi lida em espectrofotômetro com absorvância em 490 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA LINHAGEM HCEML DE *Exophiala* sp.

De acordo com a macromorfologia e micromorfologia o isolado de HCEML de *Exophiala* sp. foi caracterizado como *Exophiala spinifera*. Segundo Hoog et al. (2004) esta espécie apresenta colônias bem definidas de coloração esverdeada a negras, microscopicamente revelaram conidióforos eretos, acastanhados, cilíndricos e multicelulares. Tais características foram observadas neste isolado através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. Detalhes do conidióforo deste isolado podem ser observados na Figura 1.

FIGURA 1 – ASPECTOS MICROMORFOLOGICOS DA LINHAGEM HCEML DE *Exophiala spinifera*



(A) microscopia eletrônica de varredura, aumento 3300X, seta 1 indica conídios cilíndricos dispostos à superfície do conidióforo e a seta 2 indica a presença de cicatriz; (B) microscopia óptica, aumento 1000X, seta indicando conidióforos eretos, cilíndricos e multicelulares.

O seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS2 foram parâmetros utilizados na confirmação da identificação realizada por meio da morfologia. A Figura 1 do Anexo I mostra a eletroforese em gel de agarose 1,6% dos produtos da PCR.

A seqüência consenso obtida (Figura 2 do Anexo I), foi comparada com dados de seqüências ITS de rDNA de outros isolados depositados no banco de dados do *GenBank* e utilizando o programa Blast foi realizado o alinhamento destas seqüências (ALTSCHUL et al., 1997).

Para análise foram comparados 474pb em que a linhagem HCEML apresentou 99% de identidade com *Exophiala spinifera* do banco de dados *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information of the National Institutes of Health*) (Figura 3 do Anexo I).

Na Tabela 2 pode-se verificar as espécies cujas seqüências (com respectivo número de acesso no *GenBank*) foram usadas nas reconstruções filogenéticas e posição taxonomica da linhagem.

TABELA 2 - LINHAGENS REFERENCIAS UTILIZADAS NA RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA E NÚMERO DE ACESSO NO *GENBANK*

Linhagens	Genbank
<i>Exophiala spinif</i> HCEML_consensus	-
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 899.68T	gi 27764589 gb AY156976.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 671.76	gi 27764588 gb AY156975.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 669.76	gi 27764587 gb AY156974.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 668.76	gi 27764586 gb AY156973.1
<i>Exophiala spinifera</i> BMU 00045	gi 45476713 gb AY484985.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 356.83	gi 4808212 emb AJ244246.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 101533	gi 27764585 gb AY156971.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 101537	gi 27764584 gb AY156970.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 101539	gi 27764583 gb AY156969.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 101542	gi 27764581 gb AY156967.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 116.86	gi 27764579 gb AY156965.1
<i>Exophiala spinifera</i> CBS 667.76	gi 27764578 gb AY156964.1
<i>Exophiala jeanselmei</i> CBS 116.86	gi 37725771 gb AY163556.1
<i>Exophiala jeanselmei</i> CBS 677,76	gi 37725768 gb AY163553.1
<i>Exophiala dermatitidis</i> AFTOL 668	gi 110951115 gb DQ826738.1
<i>Exophiala dermatitidis</i> CBS 116726	gi 61676681 gb AY857526.1
<i>Exophiala dermatitidis</i> CBS 109154	gi 61676680 gb AY857525.1
<i>Exophiala dermatitidis</i> YN55-151205	gi 86371147 gb DQ355936.1
<i>Exophiala dermatitidis</i> CBS 115663	gi 50345962 gb AY663828.1

De acordo com a análise filogenética realizada utilizando a máxima parcimônia, obteve-se duas árvores semelhantes utilizando dados pesados (figura 2) e não pesados (figura 3).

FIGURA 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO AS RELAÇÕES ENTRE A LINHAGEM HCEML DE *Exophiala spinifa* E LINHAGENS REFERÊNCIA DE ESPÉCIES DO GENERO. MÁXIMA PARCIMÔNIA (PESAGEM MAIOR PARA TRANSVERSÕES - 2:1)

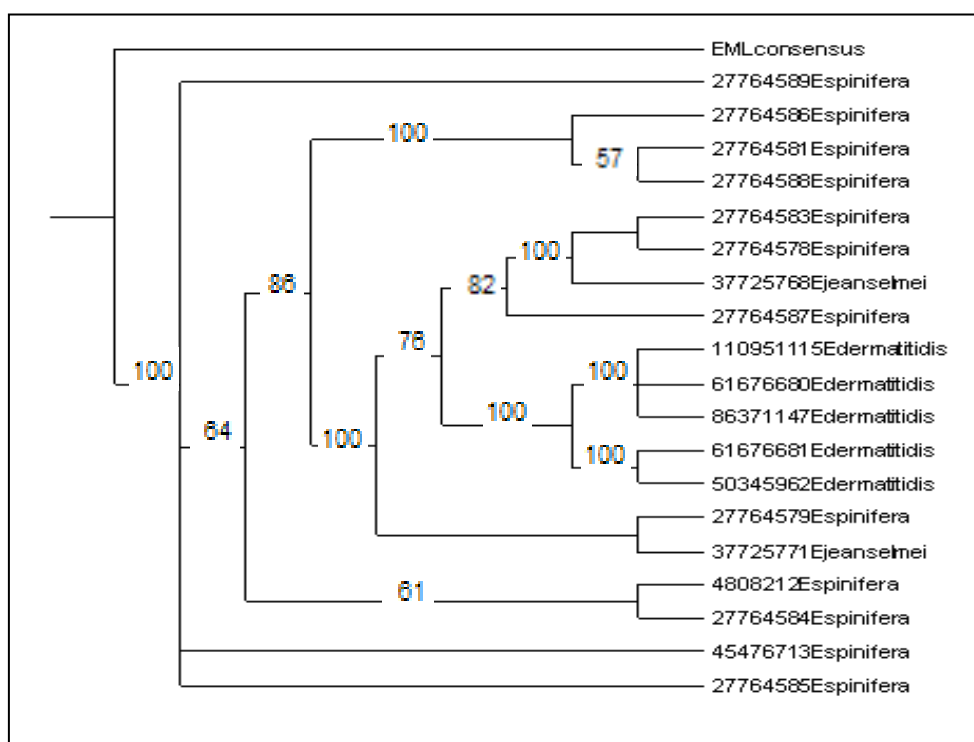
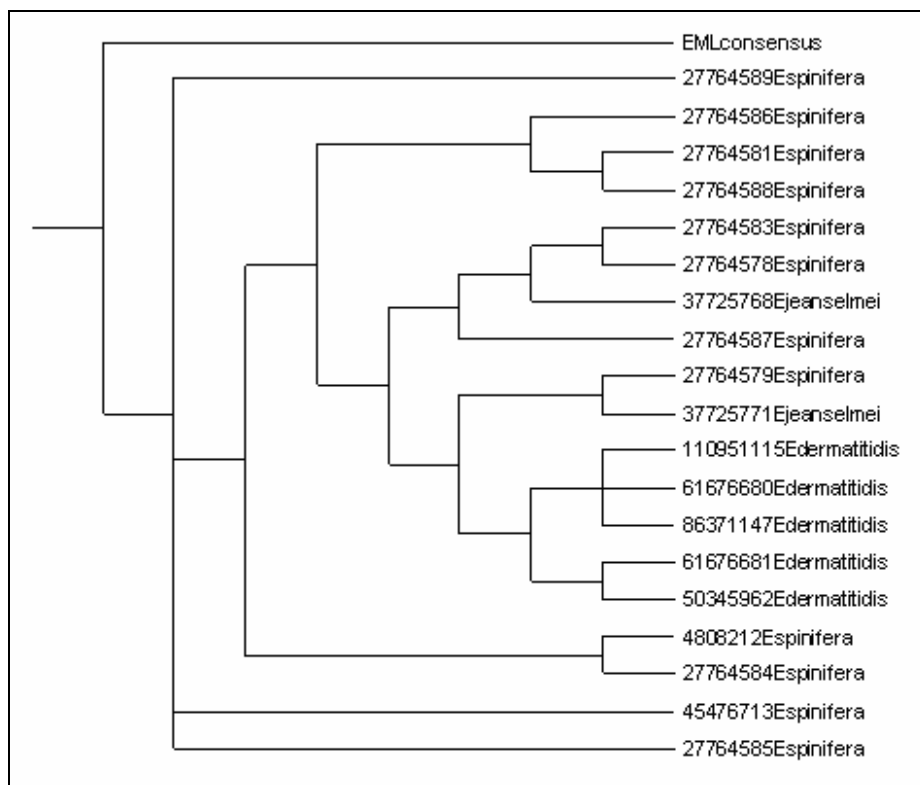


FIGURA 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO AS RELAÇÕES ENTRE A LINHAGEM HCEML DE *Exophiala spinifa* E LINHAGENS REFERÊNCIA DE ESPÉCIES DO GENERO. MÁXIMA PARCIMÔNIA (DADOS NÃO PESADOS)



Diante das diferentes análises, (Figura 2 e 3) foram observados resultados semelhantes, verificando-se vários nós que oferecem grande suporte, indicando claramente que as árvores filogenéticas obtidas nesta análise revelaram que a linhagem HCEML de *Exophiala* sp. agrupou-se com as linhagens referência de *E. spinifera* confirmando a identificação taxonômica baseada em parâmetros morfológicos.

Haase et al. (1999), demonstraram que *E. spinifera* e *E. jeanselmei* constituem um grupo filogeneticamente delimitado dentro da família Herpotrichiellaceae e distinto de outras espécies de *Exophiala*, sendo a *E. spinifera* uma das espécies de maior virulência dentro do gênero e com morfologia diferenciada dentro do grupo (WANG et al., 1987).

Há diversos relatos de infecções a partir de inoculações por estes fungos (HOOG e GUARRO, 1995) e um grande aumento no número de casos em

pacientes imunodeprimidos, tais como vítimas do câncer, AIDS e transplantados, *E. spinifera* é um microrganismo com potencial patogênico para esses pacientes.

Sendo assim, o conhecimento dos fatores de virulência é de fundamental importância para o esclarecimento da patogenicidade deste agente e conseqüentemente fornecer parâmetros para entendimento da evolução clínica da doença.

4.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

Para avaliar o crescimento do isolado de *E. spinifera* frente a algumas fontes de carbono, foram testados três diferentes meios de cultura, o meio Mínimo (MM) contendo glucose como fonte de energia, meio Czapeck-dox (CD) a base de sacarose, e o meio Butterfield (BF) constituído por glicerol.

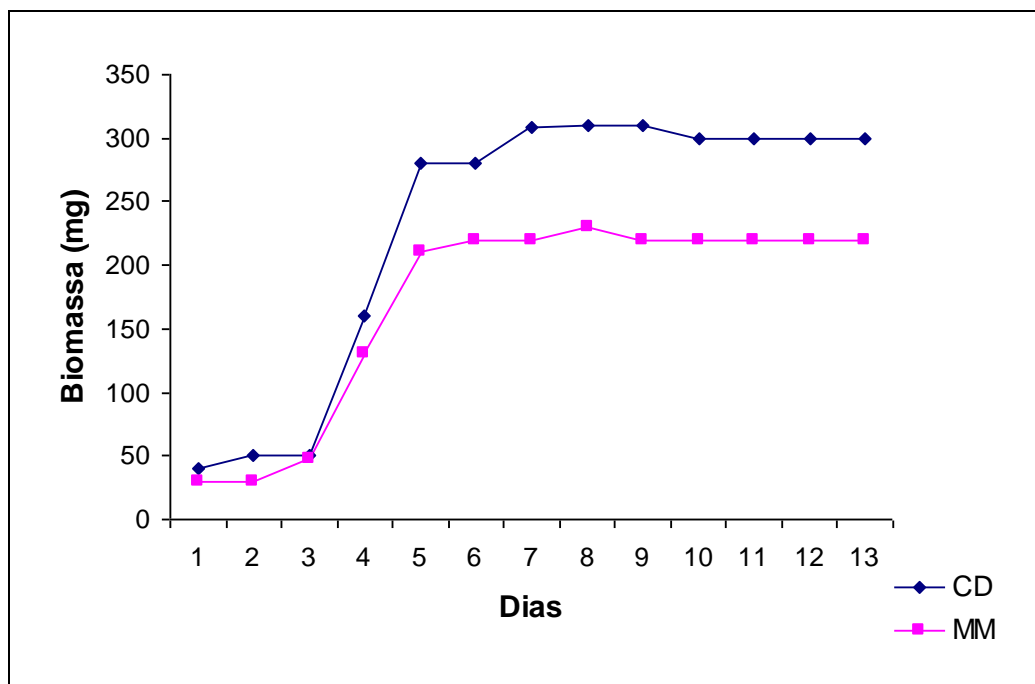
No meio de cultura BF houve pouco crescimento do isolado de *E. spinifera* em relação aos meios MM e CD (Tabela 3) por isso não foi dado continuidade a estudos de crescimento, análises dos polissacarídeos e testes de imunogenicidade. Os meios de cultivo CD e MM mostraram resultados semelhantes quanto a produção de EPS e biomassa durante o período de experimento.

TABELA 3 - BIOMASSA E EPS OBTIDO APÓS 8 DIAS DE CRESCIMENTO

Meio de cultura (500 mL)	Biomassa (g)	EPS (mg)
Czapeck-dox (CD)	8,6	44
Mínimo (MM)	8,4	42
Butterfield (BF)	1,0	9

Através do monitoramento diário do crescimento (pesagem da biomassa) durante 13 dias foi possível elaborar a curva de crescimento (Figura 4).

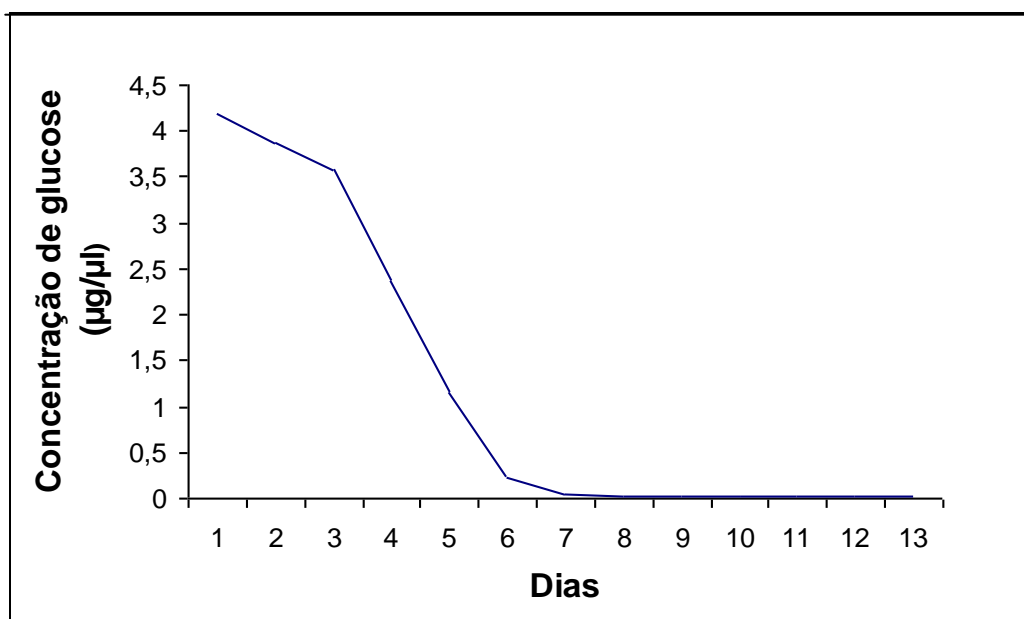
FIGURA 4 - CURVA DE CRESCIMENTO DE *Exophiala spinifera* NOS MEIOS MÍNIMO E CZAPECK-DOX.



Em ambos os meios de cultivo foi observada a estabilização do crescimento entre o sexto e o sétimo dia, porém obteve-se um peso maior de biomassa produzida no meio CD, quando comparado à biomassa produzida no MM, indicando o meio CD como melhor meio de cultivo para obtenção de biomassa.

A partir das alíquotas retiradas diariamente do meio de cultura MM cuja fonte de açúcar é a glucose, foi dosada a concentração de deste açúcar a cada dia de crescimento, para verificar o consumo diário deste açúcar. A dosagem foi realizada através da reação da enzima glucose oxidase (Figura 5).

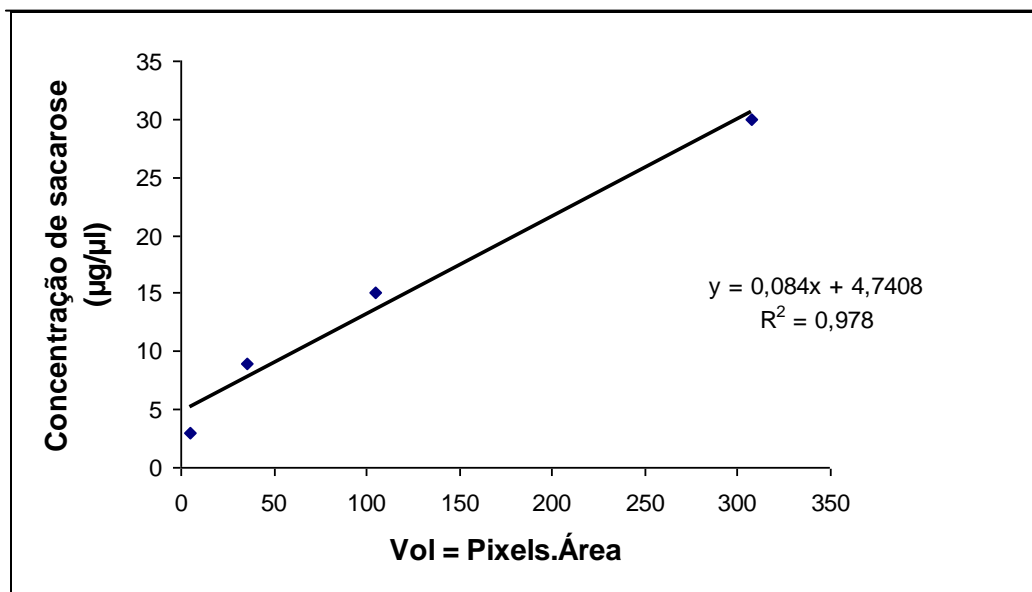
FIGURA 5 - CONSUMO DE GLUCOSE/DIA



Esta curva foi elaborada a fim de avaliar o comportamento do fungo *E. spinifera* diante desta fonte de carbono. Pode-se observar que os níveis de glicose do meio de cultura MM diminuem ao longo dos dias, indicando que a glicose é totalmente consumida por volta do sétimo dia.

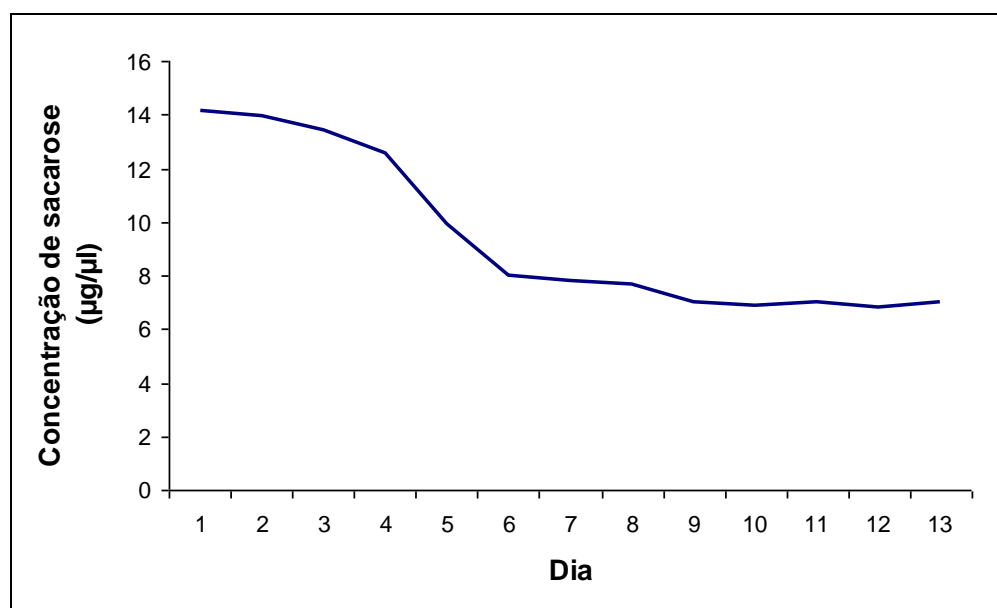
Para determinar a concentração de sacarose no meio CD foi desenvolvida uma equação a partir da curva padrão (Figura 6) obtida a partir de padrões com concentrações conhecidas de sacarose, como descrito no item 3.8.

FIGURA 6 - CURVA PADRÃO DE SACAROSE OBTIDA POR DENSITOMETRIA



Utilizando as alíquotas retiradas diariamente do meio de cultura CD cuja fonte de açúcar é a sacarose, foi determinado o consumo deste açúcar a cada dia. As concentrações foram obtidas utilizando a equação da curva padrão (Figura 6) e os valores das alíquotas diárias foram determinados por densitometria em CCD com auxílio do programa *Scion Image*, o perfil do consumo de sacarose do fungo *E. spinifera* no meio de cultivo CD pode ser observado na Figura 7.

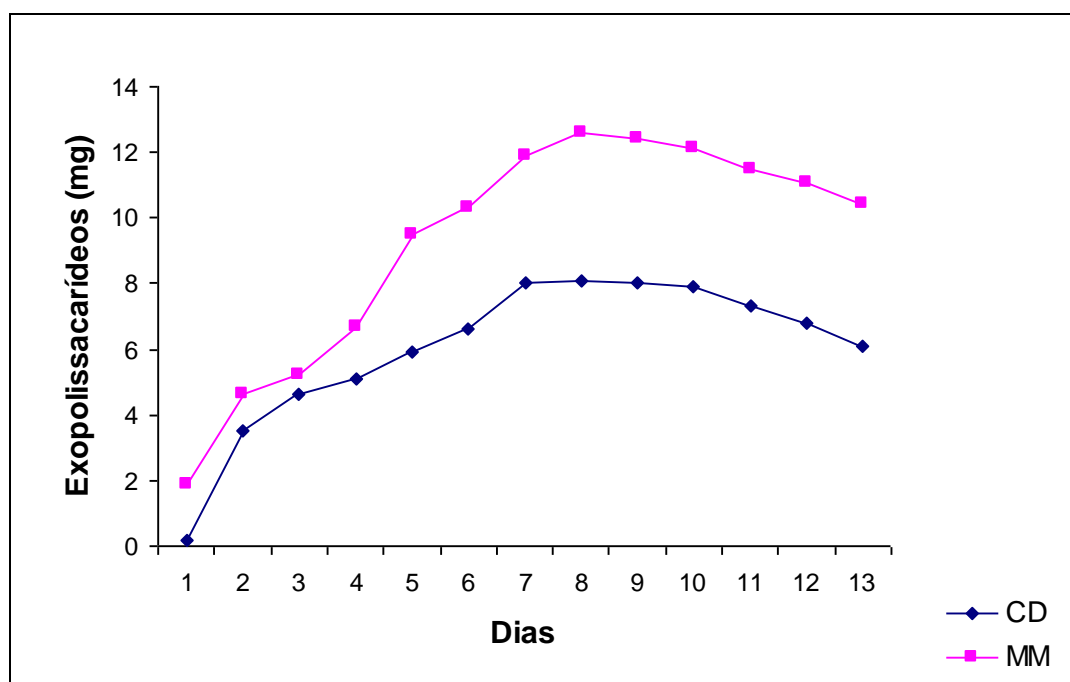
FIGURA 7 - CONSUMO DE SACAROSE/DIA



A concentração de sacarose no meio de cultivo CD foi monitorada durante 13 dias, pode-se observar que os níveis de sacarose diminuem ao longo dos dias e houve a estabilização dos níveis a partir do oitavo dia indicando a parada do consumo deste açúcar (Figura 7).

Em seguida foi estudado o perfil de produção de EPS pelo isolado de *E. spinifera* nos meios Mínimo e Czapeck-DOX (Figura 7). A curva de produção de EPS (Figura 8) foi construída com o monitoramento da produção destes polissacarídeos. Amostras de meio de cultivo retiradas diariamente foram submetidas à precipitação etanólica (3:1v/v) para obtenção do EPS, foi realizada a purificação por diálise em membrana e pesagem após liofilização. O peso do material seco foi fonte dos dados para a elaboração desta curva.

FIGURA 8 - EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR *Exophiala spinifera* NOS MEIOS MINIMO E CZAPECK-DOX.



No meio Mínimo a produção de EPS foi maior em relação ao meio Czapeck-dox. A partir do sétimo dia os isolados param de produzir EPS e os níveis começam a baixar indicando que o fungo inicia o consumo do exopolissacarídeo produzido por ele a partir do momento em que as concentrações da sua fonte de carbono (açúcar) acabam. A comparação pode ser visualizada nas Figuras 9 e 10.

FIGURA 9 - GRÁFICO INDICANDO O CONSUMO DE GLUCOSE, PRODUÇÃO DE EPS E BIOMASSA NO MEIO MÍNIMO

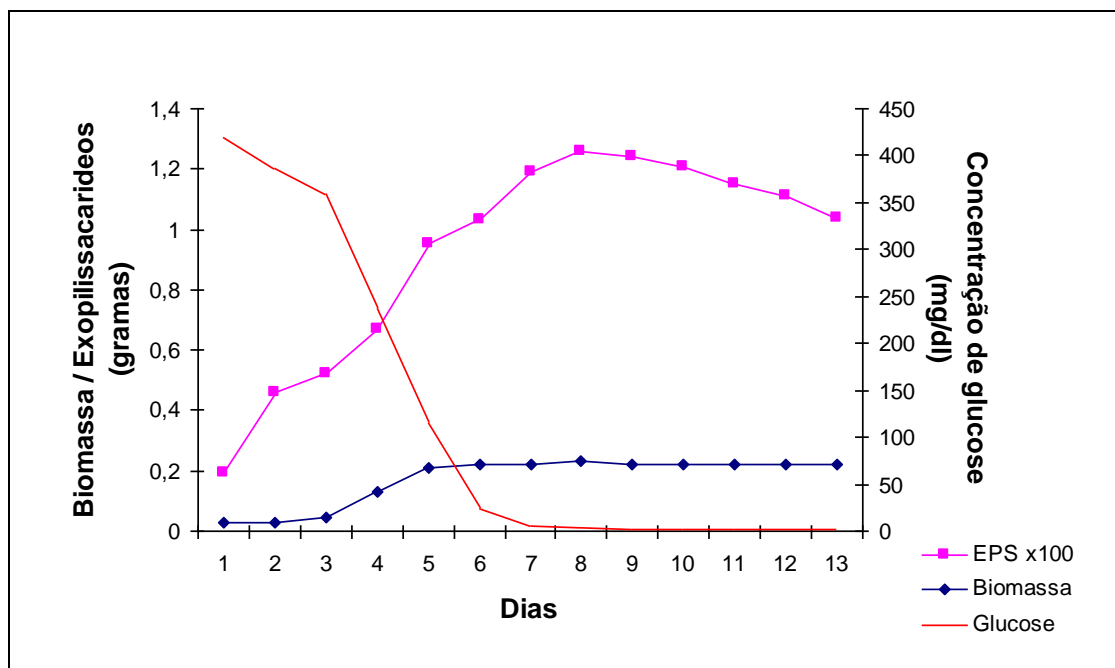
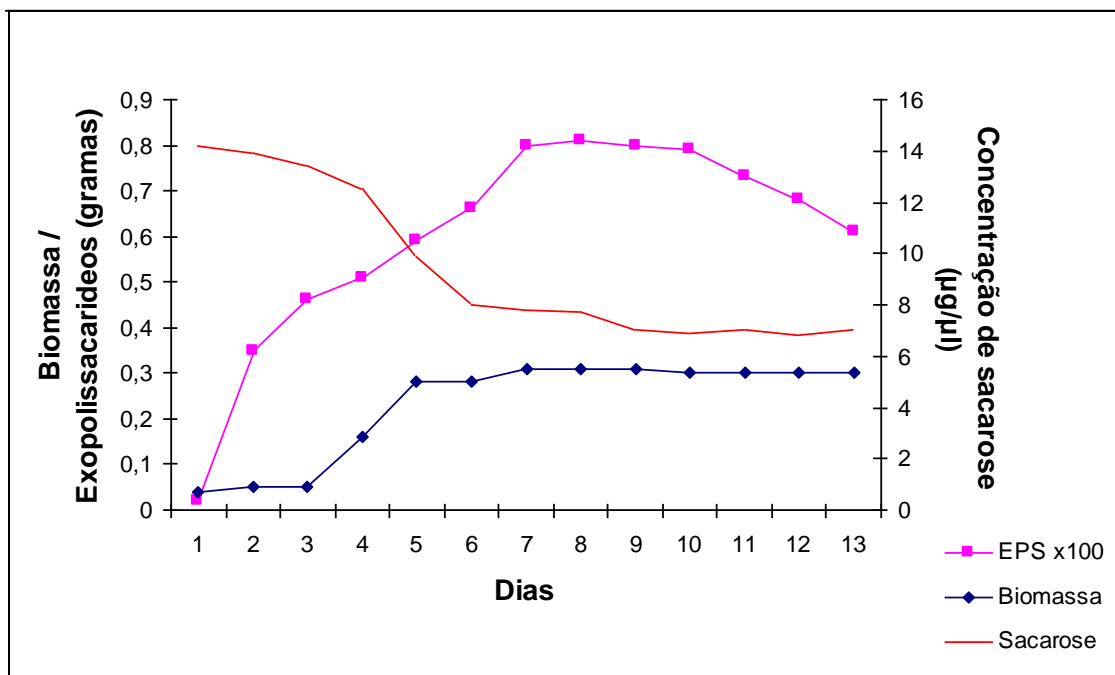


FIGURA 10 - GRÁFICO INDICANDO O CONSUMO DE SACAROSE, PRODUÇÃO DE EPS E BIOMASSA NO MEIO DE CULTIVO CZAPECK-DOX



Esse comportamento pode ser encarado como uma estratégia de sobrevivência para este microrganismo. No estudo realizado por Yurlova e Hoog, (2002) resultados semelhantes foram obtidos, diferentes quantidades de EPS foram detectados em variados meios de cultura, porém neste estudo a produção de EPS foi quantificada somente ao final do quinto dia não sendo feito o controle diário.

4.3 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS

Os EPS foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), como padrões foram utilizados, xilose ramnose, ácido glucurônico, manose, galactose e glucose.

Os EPS obtidos das culturas nos meios de cultivo Czapeck-Dox, Meio Mínimo e Butterfield foram hidrolisadas com TFA 2M por 8 horas a 100°C, evaporadas até secura e analisadas por CCD utilizando EtOAc-*n*-PrOH-HOAc-H₂O (4:2:2:1 v/v) como solvente e os carboidratos visualizados com orcinol-H₂SO₄, onde foi possível detectar bandas correspondentes a manose, galactose e glucose, não sendo evidenciados a presença de ácidos urônicos e aminoaçúcares, essas informações foram confirmadas por CG-EM.

Os EPS foram analisados quanto a sua composição em monossacarídeos na forma de acetatos de alditóis em CG-EM, através desta análise foi possível confirmar os dados obtidos com a CCD e determinar o percentual de cada açúcar presente nas amostras obtidas dos diferentes meios utilizados para o cultivo do isolado de *E. spinifera* (Tabela 4). Os EPS produzidos apresentaram manose em maior proporção seguido de galactose e glucose respectivamente, o meio Mínimo apresentou o percentual de glucose maior em relação à galactose. A determinação da composição monossacarídica em conjunto com as análises de espectros de RMN-¹³C e de metilação auxiliou na visualização das estruturas presentes nos exopolissacarídeos obtidos nos meios de cultivo utilizados.

TABELA 4 - ACETATOS DE ALDITOL OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE, SEGUIDO DE SUCESSIVA REDUÇÃO E ACETILAÇÃO E ANÁLISE POR GC-MS (COLUNA DB-225)

Meios de cultura	Monossacarídeos (%)		
	MANOSE	GLUCOSE	GALACTOSE
Meio mínimo (MM)	53	23	24
Czapeck-Dox (CD)	61	23	16
Butterfield (BF)	43,3	31,4	25,3

4.4 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR E EPS NOS MEIOS CZAPECK-DOX (CD) E MEIO MÍNIMO (MM)

Analisando em conjunto os espectros de RMN de ^{13}C (Figuras 11 A e B) da parede do fungo nos meios CD e MM pode-se observar que ambos apresentam algumas semelhanças.

A região anomérica apresenta uma menor complexidade de sinais quando comparados aos espectros de RMN de ^{13}C dos EPS obtidos para os meios CD e MM. A alteração mais evidente é a ausência do sinal de $\beta\text{-Gal}f$ em δ 107,7, entretanto, deve-se ressaltar que existe uma grande variedade de sinais de unidades de $\alpha\text{-Man}p$ 2,6-di-O-substituídas, unidades terminais de $\alpha\text{-Gal}p$ ligadas em C-2 em δ 102,6. O sinal em δ 101,2 foi atribuído a unidades de $\alpha\text{-Man}p$ (1 \rightarrow 6) ligadas e esta atribuição pode ser suportada pela presença dos sinais em δ 65,9 e δ 66,1. Outras atribuições de assinalamento não foram realizadas devido a falta de congruência com os dados de metilação.

O espectro de ^{13}C -RMN (Figura 10 C) do EPS obtido no meio CD mostra-se extremamente complexo pela grande quantidade de sinais na região de carbono anomérico onde observamos pelo menos 15 sinais majoritários. Comparando-se com os dados de literatura pode-se destacar a presença de unidades terminais e substituídas em C-6 de $\beta\text{-Gal}f$ em δ 107,7 e δ 107,5 respectivamente. O sinal em δ 100,5 foi atribuído a unidades de $\alpha\text{-Man}p$ (1 \rightarrow 2) ligadas e o sinal em δ 98,7 foram atribuídas a unidades de $\alpha\text{-Man}p$ 2,6-di-O-substituídas, que podem ser sugeridas através da presença de sinais na região de

78,3 a 78,7 PPM e pelos sinais em δ 66,8 e δ 66,9. O sinal em δ 99,9 corresponde unidades terminais de α -Glc p e o sinal em δ 97,6 foi atribuído a unidades de α -Glc p substituído em C-6, sendo sustentada pela presença do sinal em δ 68,5.

O espectro de ^{13}C -RMN (Figura 10 D) do EPS obtido no meio MM também é extremamente complexo, entretanto não apresenta grandes quantidades de terminais de β -Gal f . Pode-se atribuir o sinal em 102,4 à unidades terminais de α -Man p . Como observado aos espectros anteriores, o sinal em δ 101,2 foi atribuído a unidades de α -Man p (1 \rightarrow 6) substiuídas e confirmadas pelos sinais em δ 65,9 e δ 66,1. A presença do sinal em δ 100,3 foi atribuída as unidades de α -Man p 2,6-di-O-substituidas, e que podem ser confirmadas através da presença dos sinais na região de 78,3 a 78,7 PPM. O sinal em δ 99,9 corresponde unidades terminais de α -Glc p , o sinal em δ 97,6 foi atribuído a unidades de α -Glc p substituídas em C-6, sendo sustentada pela presença do sinal em δ 68,5.

FIGURA 11 - ESPECTROS DE RMN DAS AMOSTRAS MM-PAREDE (A), CD-PAREDE (B), CD-EPS (C) E MM-EPS (D)

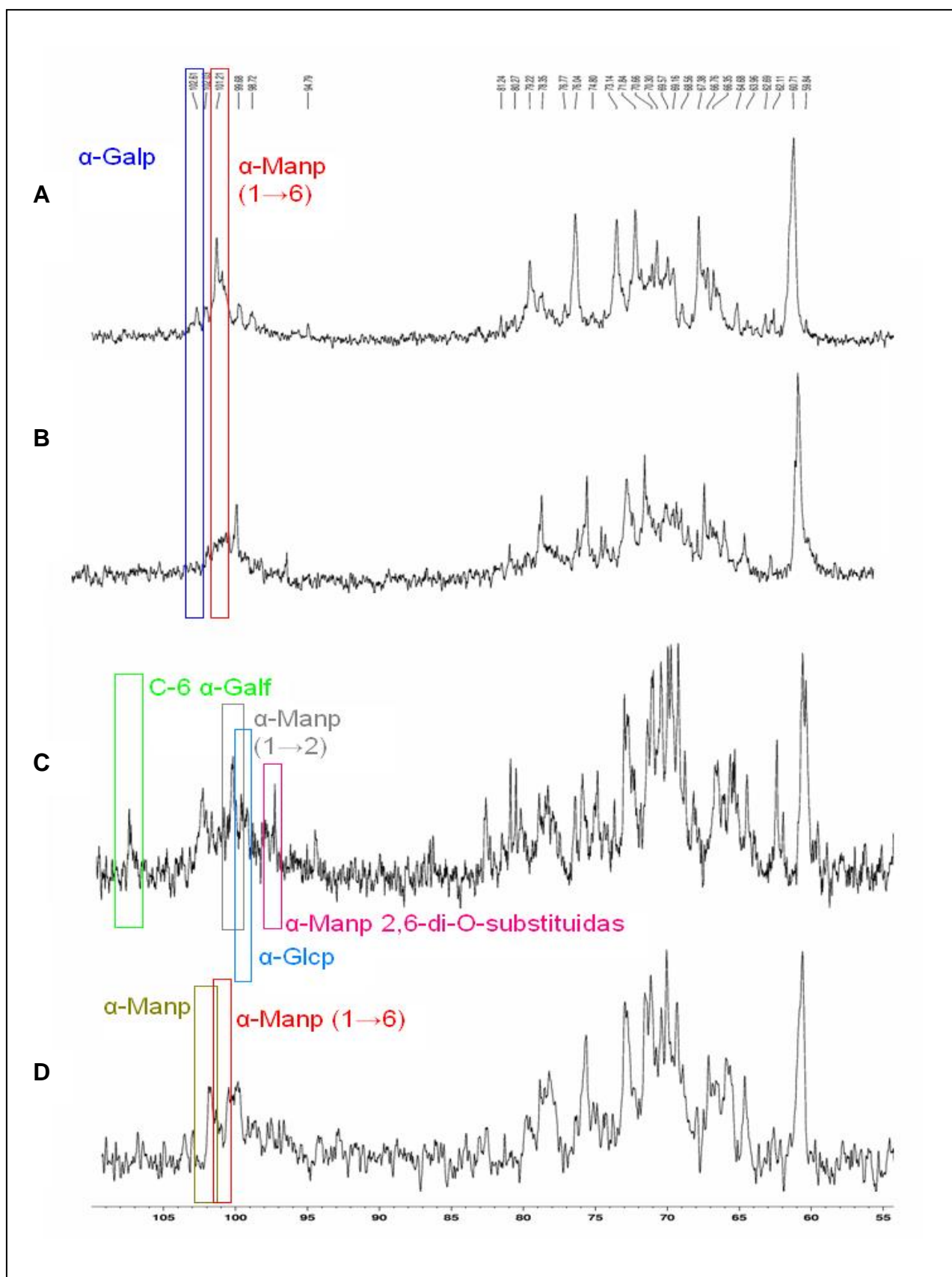


TABELA 5 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR E EPS OBTIDAS A PARTIR DO CULTIVO DE *Exophiala spinifera* NOS MEIOS CZAPECK-DOX (CD) E MEIO MÍNIMO (MM)

Acetatos alditóis parcialmente O-metilados ⁽¹⁾	Fração (mol %)				Tipo de ligação ⁽²⁾
	MM PAREDE ⁽⁺⁾	CD PAREDE ⁽⁺⁾	CD EPS ⁽⁺⁺⁾	MM EPS ⁽⁺⁺⁺⁾	
2,3,4,6-O-Me ₄ Man	10,3	9,1	6,2	10,9	Manp(1→
2,3,4,6-O-Me ₄ Glc	7,1	5,4	4,9	6,5	GlcP(1→
2,3,5,6-O-Me ₄ Gal	5,1	3,1	9,0	1,0	GalF(1→
2,3,4,6-O-Me ₄ Gal	13,7	5,1	5,3	15,9	GalP(1→
2,3,4-O-Me ₃ Gal	-	5,9	-	-	→6)GalP(1→
2,3,6-O-Me ₃ Gal	-	9,2	4,2	-	→4)GalP(1→
3,4,6-O-Me ₃ Gal	-	-	1,6	-	→2)GalP(1→
2,4,6-O-Me ₃ Man	-	-	1,8	-	→3)Manp(1→
3,5,6-O-Me ₃ Gal	-	-	1,7	-	→2)GalP(1→
2,3,6-O-Me ₃ Man	-	-	1,8	-	→4)Manp(1→
3,4,6-O-Me ₃ Man	3,0	5,1	17,6	25,6	→2)Manp(1→
2,4,6-O-Me ₃ Gal	2,4	3,3	-	-	→3)GalP(1→
2,3,4-O-Me ₃ Man	34,6	28,6	4,3	28,4	→6)Manp(1→
2,3,4-O-Me ₃ Glc	5,0	4,9	8,6	3,7	→6)GlcP(1→
2,3,6-O-Me ₃ Glc	2,7	-	-	-	→4)GlcP(1→
2,3,5-O-Me ₃ Gal	1,5	-	4,8	-	→4)GalF(1→
4,6-O-Me ₂ Gal	2,0	-	-	-	→2,3)GalP(1→
3,6-O-Me ₂ Man	0,2	-	1,3	-	→2,4)Manp(1→
2,4-O-Me ₂ Glc	1,0	-	-	-	→3,6)GlcP(1→
2,3-O-Me ₂ Glc	8,1	9,7	-	-	→4,6)GlcP(1→
3,4-O-Me ₂ Man	-	2,0	14,2	-	→2,6)Manp(1→
2,6-O-Me ₂ Gal	-	1,1	1,9	-	→3,4)Manp(1→
2,4-O-Me ₂ Man	-	1,8	3,2	-	→3,6)Manp(1→
4,6-O-Me ₂ Man	-	-	3,5	-	→2,3)Manp(1→
2,3-O-Me ₂ Gal	2,3	4,6	3,7	7,8	→4,6)GalP(1→
3-O-Me-Man	0,9	1,2	-	-	→2,4,6)Manp(1→

⁽¹⁾ Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

⁽²⁾ Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

⁽⁺⁾ Ação antigênica discreta

⁽⁺⁺⁾ Ação antigênica moderada

⁽⁺⁺⁺⁾ Ação antigênica forte

A análise de metilação (Tabela 5) das amostras de EPS (EPS CD e EPS MM) e dos polissacarídeos obtidos da parede celular do fungo cultivado no Meio Mínimo (Parede MM) e no meio Czapeck-Dox (Parede CD), respectivamente Figuras 1, 2, 3 e 4 do anexo II, mostraram grande diversidade de unidades de hexose tri-O-metil de manose, galactose e glucose, mostrando-se de acordo com os espectros de ^{13}C -RMN. Também, foi observado em todas as amostras quantidades superiores a 20% de terminais não redutores de manose, galactose e glucose e a presença considerável de quantidades variadas unidades di-O-metil dos mesmos açúcares exceto em EPS MM que apresenta apenas 2,3-Me₂Gal .

EPS CD e EPS MM mostraram o derivado 3,4,6-Me₃Man com percentual considerável, 17,61% e 25,6% respectivamente.

As amostras obtidas de parede celular apresentam grande quantidade (~30%) do derivado 2,3,4-Me₃Man, como era previsto através dos espectros de RMN e pequena quantidade de 3-O-Me-Man.

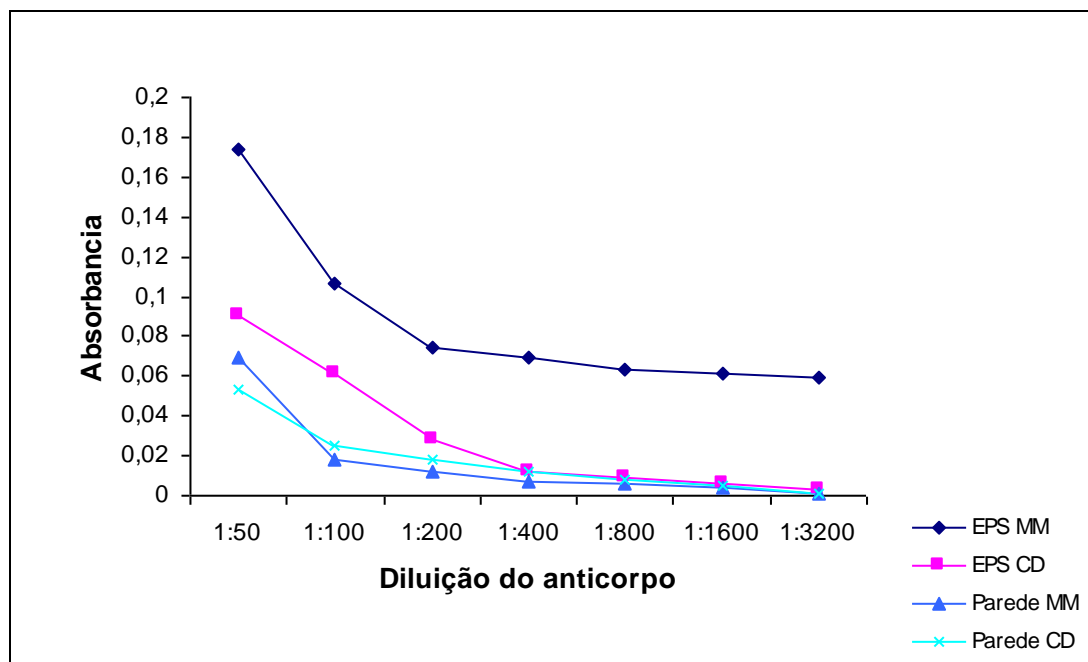
A presença de 2,3,4,6-O-Me₄Gal e 2,3-O-Me₂Gal em grandes quantidades em conjunto com percentual elevado de unidades 2,3,4-O-Me₃Man pode estar relacionada a maior atividade antigênica observada para a amostra EPS MM, pois esta contém estes derivados em maior proporção em relação as demais amostras. A ausência de unidades di-O-metil derivados, também pode estar envolvida no aspecto imunogênico, porém não se tem resultados suficientes para estas afirmações. Diferentemente do observado para *E. janselmei* (CZESLUNIAK, 2005) as unidades de β -Gal f não mostraram uma maior imunogenicidade.

Os testes de imunogenicidade foram realizados com as amostras: EPS MM, EPS CD, Parede MM e Parede CD. Estas amostras foram fixadas em placa de ELISA na concentração de 50 μg por poço, o anticorpo primário em teste foi utilizado em diluições seriadas, partindo da diluição 1:50.

Com os experimentos de ELISA foi observado que o soro contendo os anticorpos produzidos em camundongos reconhece as amostras de maneiras diferentes. O EPS obtido da cultura em Meio Mínimo foi o mais imunogênico, pois apresentou maior absorvância no método utilizado para avaliação da ligação dos antígenos com os anticorpos, seguido do EPS obtido do meio de cultivo Czapeck-Dox, as amostras obtidas de parede celular apresentaram baixas absorvâncias

indicando serem pouco imunogênicas (Figura 12).

FIGURA 12 - RESPOSTA DO ANTICORPO FRENTE A DIFERENTES AMOSTRAS



Através destas informações não é possível indicar a estrutura responsável pela propriedade de exercer maior imunogenicidade. Para uma eventual conclusão é necessário produzir e isolar todos os polissacarídeos presentes nas frações, além de determinar suas estruturas e suas massas moleculares. Estes resultados são extremamente interessantes, pois durante a imunização foi utilizado o fungo inativado e não os EPS obtidos no cultivo no meio MM e CD. Pode-se sugerir que o EPS serviria como uma barreira prévia e a melanina uma segunda barreira, e ambos estariam protegendo o fungo contra o sistema de defesa, o que permitiria o crescimento do fungo patogênico. Entretanto, estas suposições necessitam de mais experimentos para sua confirmação.

5 CONCLUSÕES

A linhagem HCEML de *Exophiala spinifera* caracterizada por meio de morfologia e seqüência ITS apresentou a produção dos polissacarídeos manose, galactose e glucose nas amostras cultivadas em meios de cultura pobres em fontes de carbono. O estudo da produção de polissacarídeos revelou que estes passam a ser consumidos quando os níveis dos açúcares diminuem, indicando um mecanismo de reserva e conseqüentemente uma estratégia de sobrevivência para este microrganismo.

A presença das diversas estruturas em quantidades variadas pode estar relacionada a maior ou menor atividade antigênica observada, pois diferentes quantidades e variedades estruturais de polissacarídeos de parede e EPS reagiram com intensidades diferentes aos imunoensaios. A alta atividade imunogênica dos exopolissacarídeos frente à baixa resposta contra os polissacarídeos de superfície observada sugere um mecanismo potencial de virulência da linhagem, o qual pode representar um meio de defesa à resposta do hospedeiro, uma vez que os anticorpos parecem reconhecer os EPS em vez dos antígenos da parede celular, o que pode ser um dos fatores que favorecem a sobrevivência deste agente no tecido do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NISHIMURA, K. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. **Immunology and Medical Microbiology** p. 41-49, 2004.

AGRAWAL, P.K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and Glycosides. **Phytochemistry(OXF)**, Oxford, v.31, n.10, p. 3307-3330, 1992.

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J.A.; MIRANDA, B.G.; DOMENECH, J.; BARBERO, J.J.; BERNABÉ, M. Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of genera *Cylindrocladium* and *Calonectria*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.303, p.67-72, 1997.

AL DOORY, Y. Chromomycosis in Di Salvo, A.F. **Occupational mycoses**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. p.95-121.

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 3^a ed. New York: Garland Publishing, 1994.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

ALVIANO, C. S. & SOUZA, W.; ANGLUSTER, J.; SOARES, R. M. A. Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. **Mycopathologia**, v.132, p.71-77, 1995.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J. ; DE SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanolol. **Mycopathologia**, v.119, p.17-23, 1992.

BARDALAYE, P.C.; NORDIN, J.H. Galactosaminogalactan from cell walls of *Aspergillus niger*. **J. Bacteriol.** Washington. v.125, n.2, p.655-669, 1976.

BAYLES, M.S.H. Chromoblastomycosis clinical tropical medicine and physiology and diseases. International Practice and Research. **Intropical Ingal Infections**, v.4, n.1, p.45-71, 1989.

BITTENCOURT, V.C.; FIGUEREDO, R.T.; DASILVA, R.B.; MOURÃO-SA, D.S.; FERNADEZ, 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** 22614-23. 2006.

DISSANAYAKE, S.; AMITH, R.S.; SHAHIN, A. Taenia crassiceps carbohydrates stimulate IL-6 expression in naive murine macrophages via Toll-like receptors (TLRs). **Mol Immunol.**, 2004 Jun;41(4):391-8.

DIXON, D.M.; POLAK-WISS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification, **Mycoses**, v.34, p.1-18, 1991.

DIXON, D.M.; SHADOMY, H.J. Taxonomy and morphology Dematiaceous isolated from nature. **Mycopathologia**, v.70, n.3, p.139-144, 1980a.

DIXON, D.M.; SHADOMY, H.J.; SHADOMY, S. Dematiaceous fungal pathogens isolated from nature. **Mycopathologia**, v.70, n.3, p.153-161, 1980b.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Curr Opin Infect Dis.** p.148-52, 2006.

EVANS, J.N.S. **Biomolecular NMR Spectroscopy**, Oxford University Press, New York, p. 381-386, 1996.

FARBIARZ, S.R., DE CARVALHO, T.U., ALVIANO, C. DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. **J Med Vet Mycol.** 373-383, 1990.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39: 83-791,1985.

GEIS, P.A.; SZANISZLO, P.J. Carotenoid pigments of the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. **Mycologia** 76, 268-273, 1984.

GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; HOOG, G.S. de. Variability and molecular diagnostic of neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**, v.43, p.151-162, 1999.

GRIFFITTS, J.S.; HASLAM, S.M.; YANG, T.; GARCZYNSKI, S.F.; MULLOY, B. MORRIS, H. CREMER, P.S. DELL, A.; ADANG, M.J. AROIAN, R.V. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science.** 2005 Feb 11;307(5711):922-5.

GUTIÉRREZ, A; PRIETO, A; MARTINEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *pleurotus*. **Carbohydr. Res.** Amsterdam, v. 281, p. 143-145, 1996.

HAAL, T.A. BioEdit 4.8. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); disponível em <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a user –friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.

HAASE, G.; SONNTAG, L.V.; DE PEER, Y.; UIJTHOF, J. M. J.; PODBIELSKI, A.; MELZER-KRICK, B. Phylogenetic analysis of ten black yeast species using nuclear small subunit rDNA gene sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, p.19-33, 1995.

HAASE, G.; SONNTORG, L.; MELXER-CRICK, B.; HOOG, G.S. de Phylogenetic inference by SSU-gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. **Studies in Mycology**, n.43: 80-97, 1999.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41: 95-98, 1999.

HAYNES, K.A.; WESTERNENG, T.J.; FELL, J.W.; MOENS, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.319-325, 1995.

HILLIS, D. M., MORITZ, C. E MARBLE, B.K. Molecular Systematics. **Sinauer Associates, Inc.**, 1996.

HIRUMA, M.; KAWADA, A.; OHATA, T.; OHNISHI, Y.; TAKAHASHI, H.; YAMAZAKI, M.; ISHIBASHI, A.; HATSUSE, K.; KAKIHARA, M.; YOSHIDA, M. Sistematic phaeohy phomycosis caused by *Exophiala dermatitidis*. **Mycoses**, v.36, p.1-7, 1993.

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

HOOG, G.S. de.; BEGUIN, H.; BATENBURG-VAN DE VEGTE, W. H.; Phaeotheca triangulatis, a new meristemetic black yeast from a humiditie. **Antonie van Leeuwenhoek**. V. 71 p.289-295, 1997.

HOOG, G.S. de.; TAKEO, K.; YOSHIDA, S.; GOTTLICH, E.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Pleoanamorphic life cycle of *Exophiala (wangiella) dermatitidis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.65, p.143-153, 1994.

HOOG, G.S. de; BOWMAN, B.; GRASER, Y.; HAASE, G.; ELFARI, M.; GARRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; MELZER-CRICK, B.; UNTEREINER, W.A. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. **Medical Mycology**, v.36, p.52-56, 1998, supplement 1.

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

HOOG, G.S. de; The black yeasts: possible adaptation to the human host. **Studies in Mycology**, v.19, p.1-36, 1979.

HOOG, G.S. de; ZALAR, P.; URZI, C.; LEO, F.; YURLOVA, N.A.; STERFLINGER, K. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2, rDNA sequence comparison. **Studies in Mycology**, v.43, p.31-37, 1999.

HOOG, G.S.; GUARRO, J. GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas of clinical fungi **Realization Computer Science II** University of Wurzburg, Germany Atlas version 2004.

HOOG, G.S.; GUERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; UIJTHOF, J.M.J.; UNTEREINER, W.A. Nutritional physiology of tipe isolates of currently accepted species of *Exophiala* and *Phacocacomycetes*. **Antonie van den Ende**, v.68, p. 43-49, 1995.

HOOG, G.S.de; HAASE, G. Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.64, p.17-26, 1993.

HORRÉ, R.; HOOG, G.S. de. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. **Studies in Mycology**, v.43, p.176-193, 1999.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**. 2004 Oct;5(10):987-95.

JACOBSON, E.S.; HOVE, E.; EMERY, H.S. Antioxidant function of melanin in black fungi. **Infect Immun**. 63(12): 4944–4945. 1995.

KNOW, K.J.; BENNET, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia. Lea e Febiger, 1992. 886p.

KRAVOLIC, S.M.; RHODES, J.C. Phaeohyphomycotic osteomyelitis due *fonsecaea pedrosoi* in a liver transplant recipient. In: **General Meeting of the American Society for Microbiology**. 98, Atlanta, 1998. p.17-21.

LIMONJI, C. L.; ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S. & SOUZA, W. The influence of surfaces carbohydrates on interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese Hamster Ovary glycosylation mutant cells. **Mycopathologia**, v.138, p.127-135. 1997.

MASCLAUX, F.; GUERO, E.; HOOG, G.S.de. Phylogenetic relationships of human pathogenic *Cladosporium (xylohypha)* species inferred from LSU rDNA sequences. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.327-338, 1995.

MATTE, S.M.; LOPES, J.O.; MELO, I.S. ESPADIM, L.E.; PINTO, M.S. Chromoblastomycosis in Rio Grande do Sul: a report of 12 cases **Rev Soc Bras Med Trop** p. 309-11, 1997.

McGINNIS, M.R. Black fungi. A model for understanding tropical mycosis. In: WALKER, D.H., ed. **Global Infectious diseases**. New York: Springer-Verlog, 1992.

McGINNIS, M.R. Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis: New concepts, diagnosis and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.8, p.1-16, 1983.

McGINNIS, M.R.; SCHELL, W. A. The genus *Fonsecaea* and its relationship to the genera *Cladosporium*, *Phialophora*, *Rharnicholoridium* and *Rhinoctadiella*. **Pan American Health Organization Scientific Publication**, v. 396, p.225-234, 1980.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature** jul p. 1997.

MONTERO-GEI, F. Ecology and epidemiology of chromomycosis. In: International Symposium on Mycoses. Washington, 1970. **Proceedings**. Washington: Pan American Health Organization Scientific Publication, p.182-184, 1970.

NAKA, W.; HARADA, T.; NISHIKAWA, T.; FUKUSHIRO, R. A case of chromoblastomycosis: with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. **Mykosen** p. 445-52, 1986.

NETO, M.M.; FIGUEREDO J.F.C. Terapêutica das micoses profundas em pacientes transplantados renais. **J. Bras. Nefrol.** Ribeirão Preto SP, p 369-374,1996.

PADHYE, A.A.; DUNKEL, J.D.; WIN, R.M.; WEBER, S.; EWING, E.P.Jr.; HOOG, G.S.de. Short communication: subcutaneous phaeohyphomycoses caused by an undescribed *Cladophialophora* species. **Studies in Mycology**, v.43, p.172-175, 1999.

POLAK, A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. **Mycoses** , 215-224, 1989.

QUEIROZ, T. F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 1997 Vol: 30.

RIPPON, J. W. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. In: **Medical Mycology** Philadelphia: WB Saunders,. p.276-296,1988.

ROCK, F.L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J.C.; KASTELEIN, R.A.; BAZAN, J.F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998 Jan 20;95(2):588-93.

ROIZENBLATT, R. *Exophiala jeanselmei* como causa de endoftalmite após facectomia com implante intra-ocular.. **Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM)** 1999. v. 62, p. 407.

SAIKI, R.K.; SCARF, S.; FALOONA, F.A.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science, Washington**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2.ed. CSH Press, vol I,II e III, 1989.

SASSAKI, G.L. Pustulan and branched β -galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guinardia citricarpa*, excreted from media containing glucose.. **Universidade Federal do Paraná** Curitiba, 2001.

SASSAKI, G.L.;GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. Characterization of lyso-galactolipid, C-2 or C-3 O-acyl trigalactosylglycerol isomers, obtained from the lichenized fungus *Dictyonema glabratum*. FEMS Lett. **Microbiology**, v. 194, p155-158, 2001.

SASSAKI, G.L.;MACHADO, M. J.; TISCHER, C. ^a GORIN, P. ^a; IACOMINI M. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichem *Dictyonema glabratum*. **J. Nat Prod.**, v. 62, p. 844-847, 1999.

SKIPSKI, V. P.,Thin layer chromatography of neutral glycolipids, **Meth. Enzymol.**, v. 35, p. 396-425, 1975.

SOUZA, E. T.; SILVA-FILHO, F.C.; DE SOUZA, W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L.R.Identification of sialic acids on the cell surface of hyphae and conidia of the human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. **J. Med. Vet. Mycol.**, p.145-54. 1986.

STEADHAM, J.F.; GEIS, P.A.; SIMMANK, J.L.. Use of carbohydrate and nitrate assimilation in the identification of dematiaceous fungi. **Diagnosis Mycobiology Infection Disease**, v.5, p.71-75, 1986.

SUTHERLAND, I.W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. **Int. Rev. Cytol.**, San Diego, v.231, p. 113-187, 1988.

SUTHERLAND, I.W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Adv. Microb. Physiol.**, New York, v. 23, p. 79-150, 1982.

SUTHERLAND, I.W. **Biotechnology of microbial Exopolysaccharides**. 1st. Cambridge: Cambridge University Press,1990.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Versão 4. **Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts, 2003.

TAKEDA, K.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. **J Endotoxin Res**. 2002;8(6):459-63.

TAYLOR, B.E., WHERLER, M.H., SZANISZLO, P.J. Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. **Mycology** 79, 320-322, 1987.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Research** 22, 4673-4680, 1994.

TINTELOT, K.; HUNNIUS, P.; HOOG, G.S.de; POLAK-WISS, A. GUEHO, E.; MASCLAUX, F. Systemic mycosis caused by new *Cladophialophora* species. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.349-354, 1995.

UIJTHOF, J.M.J.; HOOG, G.S.de. PCR – Ribotyping of type isolates as currently accepted *Exophiala* and *Phaeococcamyces* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.68, p.143-151, 1995.

UNTEREINER, W.A. Taxonomy of selected members of the ascomycete genus *Capronia* with notes on anamorph-teleomorph connections. **Mycologia**, v.89, p.120-131, 1997.

UNTEREINER, W.A.; NAVEAU, F.A. Molecular systematics of the *Herpotrichiellaceae* with an assessment of the phylogenetic positions of *Exophiala dermatitidis* and *Phialophora Americana*. **Mycologia**, v.91, n.1, p.67-83, 1999.

UNTEREINER, W.A.; STRAUS, N.A.; MALLOCH, D. A molecular-morphotaxonomic approach to the systematics of the *Herpotrichiellaceae* and allied black yeasts. **Mycology Research**, v.99, n.8, p. 897-913, 1995.

VAN HALBEEK, H. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbohydrate chains glycoproteins. **Methods Enzymol.**, v. 230, p.132-168, 1994.

VICENTE, V.A. Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose. Piracicaba, 2000, 181p. TESE DE DOUTORADO. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ/USP.**

WAGNER, G. An account of NMR in structural biology. **Nature Struct. Biol.**, London, v.4, p. 841-844, 1997.

WALZ, R.; BIANCHIN, M.; CHAVES, M.L.; CERSKI, M.R.; SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora bantiana* in a Brazilian drug abuser. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.35, p.427-431, 1997.

WANG, L.D.; LI, R.Y.; WANG, X.H. Observations on sporulation in *Fonsecaea* and *Phialophora* by scanning electron microscopy. **Mycopathologia**, v.98 p.105-109, 1987.

WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOSWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2^aed. New York: Freeman and Company, 1992.

WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 2, p. 65-68. 1963a.

WHITE Jr., J.F.; MORROW, A.C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, Lawrence, v. 82, p. 218-226, 1990.

WOLFROM, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.;

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In:

YAN, Z.H.; ROGERS, S.O.; WANG, C.J.K. Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. **Mycologia**, v.87, p. 72-83, 1995

YURLOVA, N.A.; HOOG, G.S. Exopolysaccharides and capsules in human pathogenic *Exophiala* species. **Mycoses** p. 443-448, 2002.

ANEXOS

ANEXO I - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO DE *E. spinifera* POR MEIO DE SEQÜÊNCIAS ITS

FIGURA 1 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,6%, PRODUTOS DA PCR

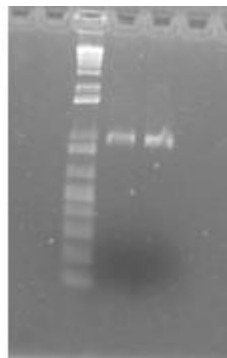


FIGURA 2 - SEQÜÊNCIA CONSENSO DAS REGIÕES ITS1 E ITS2 DO ISOLADO DE *E. spinifera*

```

CCCATTGTTTATGATACTCAGTGTGCTTCGGCAGGCTTGGTCTTTGYCCTGCCGGAGGG
CCGTAACACGCCCCCGGAGAGCGCCTGCCGMCGGCCCCAACTTCAAAAATTCTTAACTAA
ACATGTCTTTGTCTAAGTACAGTCTTTAATAAAAGCAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTGGCATTTCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGSGAATTGCAGAATT
CTCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGC
CTGTTTCGAGCGTCATTTTCACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTTGGACGGTTTGGTCCC
GGGACCCCCCTGGACCCCTCCCAAAGACAATGACGGCGGGCTGTCGGCACCCCCGGTACA
CTGAGCATCTTCACGGAGCACGTACCGGTCTCCAGGGTCGACGGCACCCGGTCTNACACT

```

Legenda:

ITS1

5.8s

ITS2

FIGURA 3 - SEQÜÊNCIA CONSENSO

Exophiala spinifera BMU 00045 internal transcribed spacer 1, partial sequence;
5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence;
and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=945

Score = 934 bits (471), Expect = 0.0, Identities = 473/474 (99%),

Gaps = 0/474 (0%) Strand=Plus/Plus

ATTGTTTATGATACTCAGTGTTCGTCCTCGGCAGGCCTGGTCTTTGACCTGCCGGAGGGCCG
ATTGTTTATGATACTCAGTGTTCGTCCTCGGCAGGCCTGGTCTTTGACCTGCCGGAGGGCCG
TAACACGCCCCCGGAGAGCGCCTGCCGACGGCCCCAACTTCAAATTCTTAACTAAACA
TAACACGCCCCCGGAGAGCGCCTGCCGACGGCCCCAACTTCAAATTCTTAACTAAACA
TGTCTTTGTCTAAGTACAGTCTTTAATAAAAAGCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TGTCTTTGTCTAAGTACAGTCTTTAATAAAAAGCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCTCG
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCTCG
TGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGT
TGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGT
TCGAGCGTCATTTTCACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTGGACGGTTTGGTCCCAGGA
TCGAGCGTCATTTTCACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTGGACGGTTTGGTCCCAGGA
CCCCCTGGACCCCTCCCAAAGACAATGACGGCGGGCTGTCGCACCCCGGTACTACTGAG
CCCCCTGGACCCCTCCCAAAGACAATGACGGCGGGCTGTCGCACCCCGGTACTACTGAG
CATCTTCACGGAGCACGTACCGGTCTCCAGGGTCGACGGCACCCGGTCTNACAC
CATCTTCACGGAGCACGTACCGGTCTCCAGGGTCGACGGCACCCGGTCTCACAC

ANEXO II - ESPECTROS DE MASSAS

FIGURA 1 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA EPS CD

Chromatogram Plot

File: c:\saturndata\higor-cdmet 26-09-06 11:13:25.sms
 Sample: HIGOR-CDMET
 Scan Range: 1 - 2407 Time Range: 0.00 - 39.97 min.

Operator: ROSANEb
 Date: 26/09/06 11:13

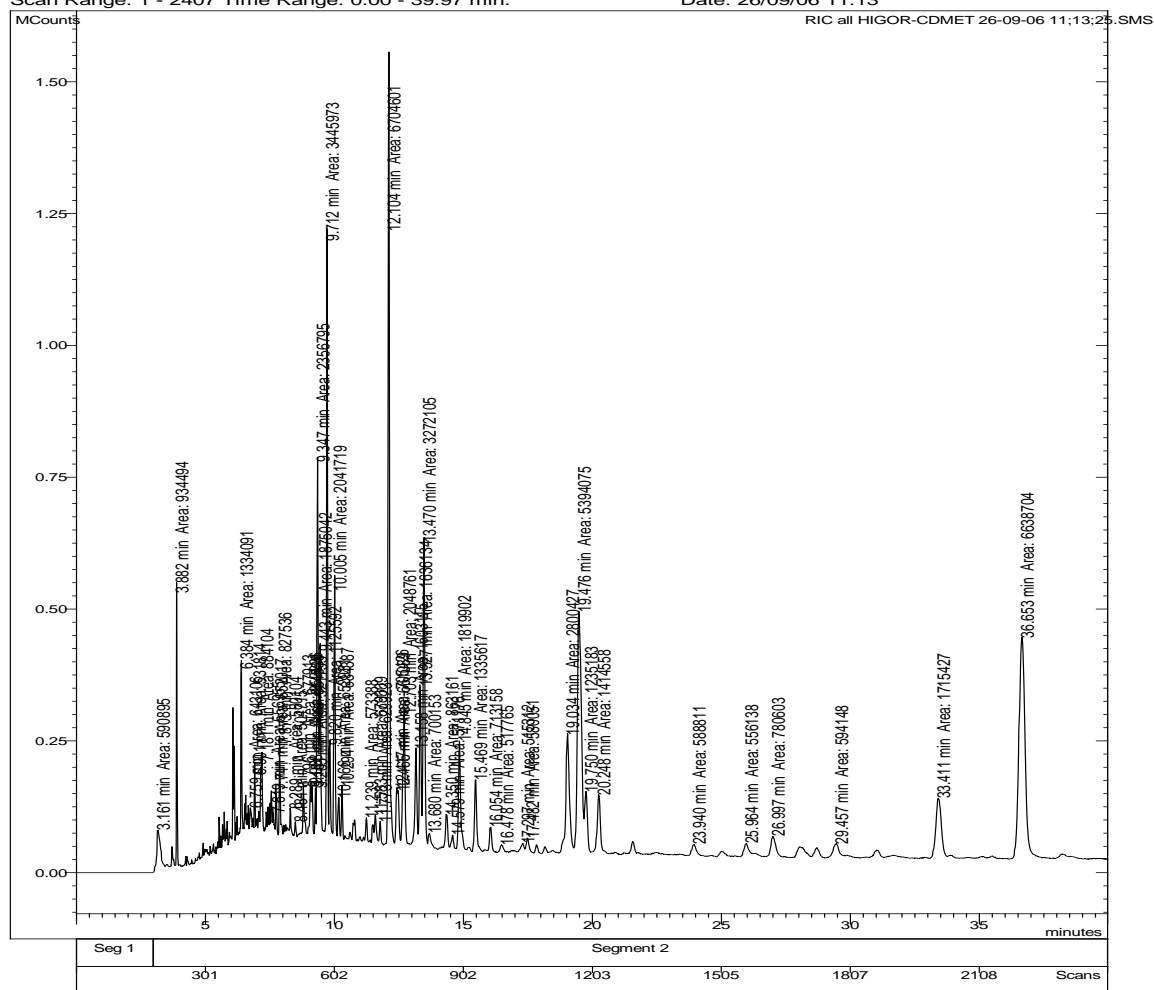


FIGURA 2 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA EPS MM

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\data\higor-mmmet 26-09-06 10:20:55.sms

Sample: HIGOR-MMMET

Scan Range: 1 - 2395 Time Range: 0.00 - 39.97 min.

Operator: ROSANEb

Date: 26/09/06 10:20

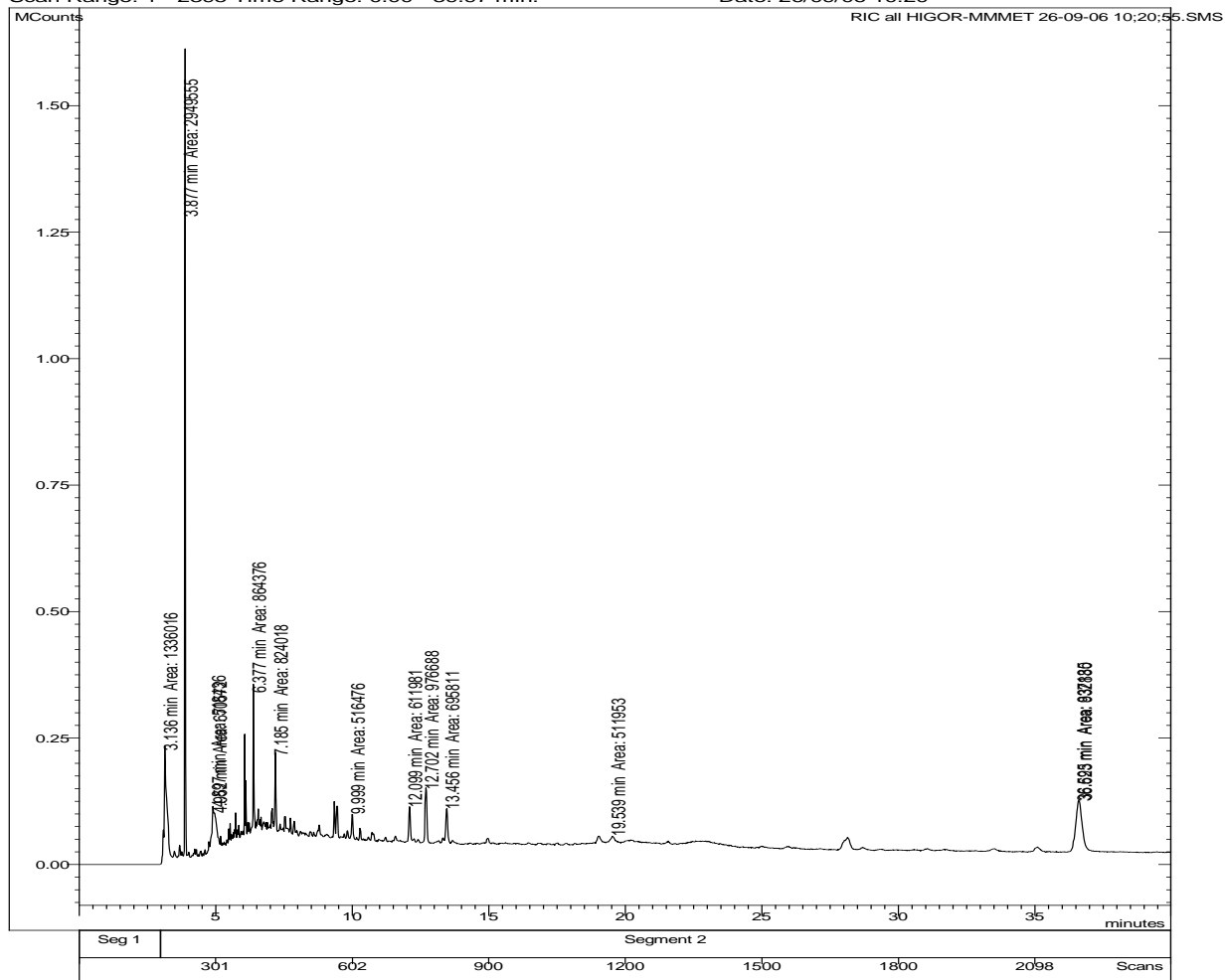


FIGURA 3 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA PAREDE CD

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\data\higor-cd-parede-met001.sms
Sample: HIGOR-CD-PAREDE-MET
Scan Range: 1 - 1514 Time Range: 0.00 - 24.97 min.

Operator: ROSANE
Date: 17/01/07 09:42

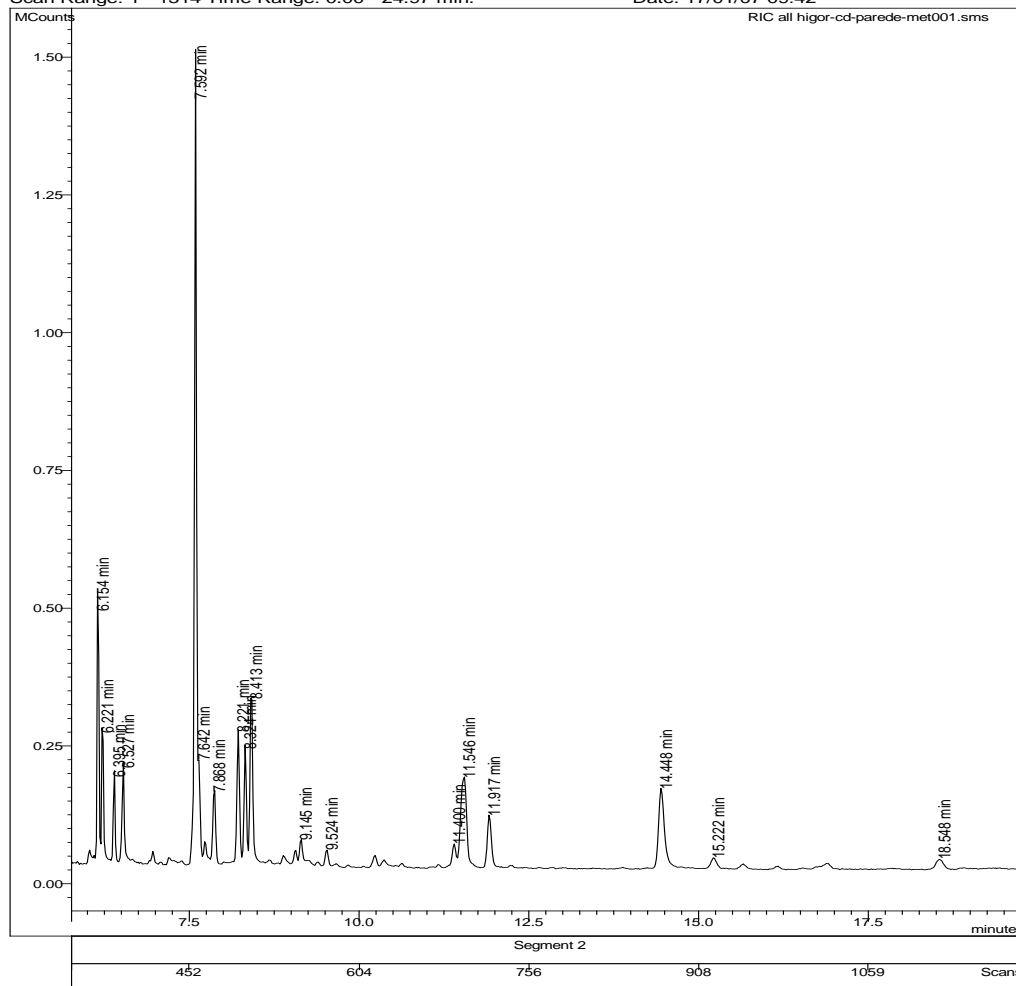
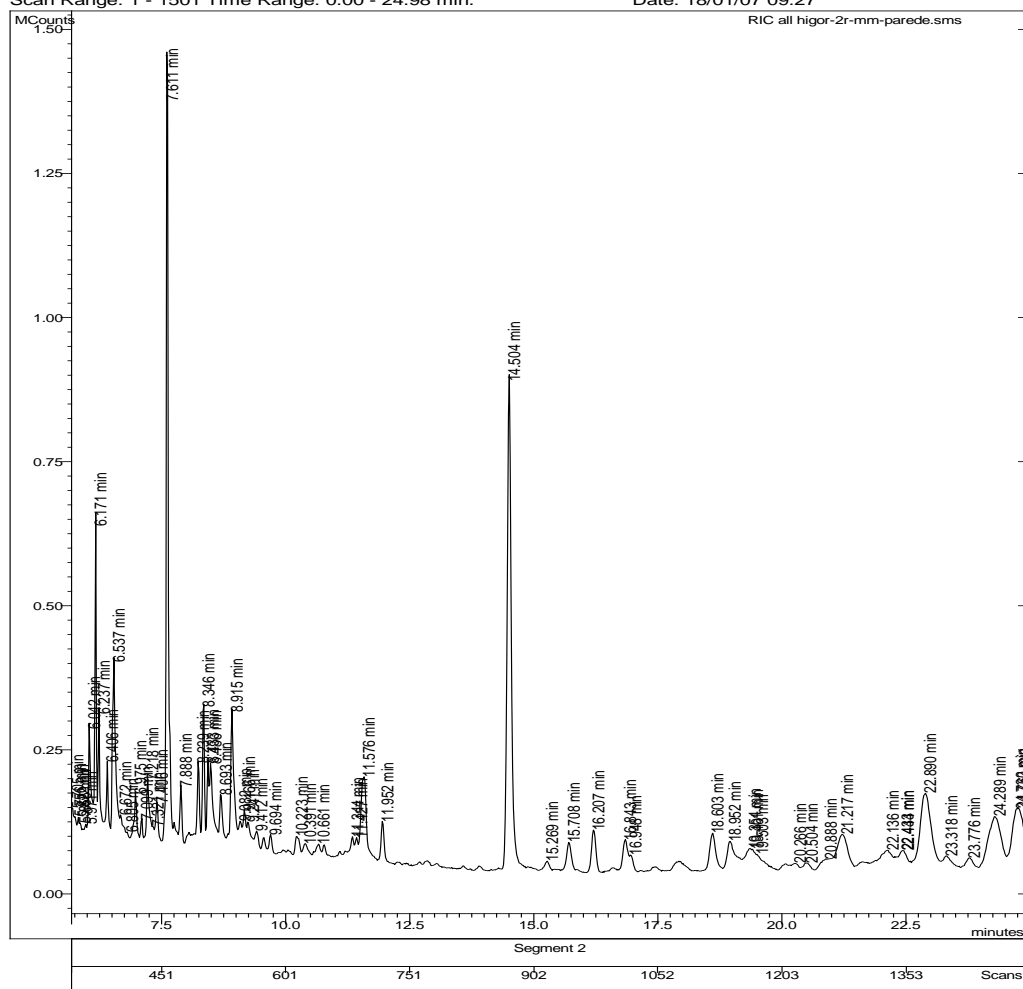


FIGURA 4 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA PAREDE MM

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\data\higor-2r-mm-parede.sms
Sample: HIGOR-2R-MM-PAREDE
Scan Range: 1 - 1501 Time Range: 0.00 - 24.98 min.

Operator: ROSANE
Date: 18/01/07 09:27



APÉNDICE

Immunogenic cell wall and polysaccharides of *Exophiala spinifera*

Guerim, H.², Vicente, V.A.²; Czelusniak, P.A.^{1,2}; Zanata, S. M.²; Atilli D.; Hoog S;
Sasaki, G.L.¹

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ² Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-990, Curitiba - PR, Brazil.
e-mail: sasaki@ufpr.br

Resumo

Os fungos dematiáceos constituem um grupo grande e heterogêneo, caracterizado por possuírem um pigmento escuro, dihidroxinaftaleno melanina, na parede celular de suas células. Esses fungos estão reunidos na família Herpotrichiellaceae e podem ser patogênicos em hospedeiros vertebrados. Entre as principais doenças causadas por estes agentes, destacam-se a cromoblastomicose, ocorrida após implantação traumática destes agentes no tecido subcutâneo com formação de corpos muriformes e a feohifomicose com verificação de elementos fúngicos não diferenciados no tecido do hospedeiro. O presente trabalho objetivou caracterizar o fungo *Exophiala spinifera*, agente de feohifomicose, por meio de morfologia e seqüências ITS e caracterizar os polissacarídeos sintetizados por este agente visando determinar o potencial patogênico desta linhagem através de imunoenaios. O fungo foi cultivado sob agitação constante por sete dias à temperatura de 36°C em meio mínimo (MM), que tem como fonte de carbono a glucose e em meio Czapeck-Dox (CD) cuja fonte de carbono é a sacarose. Exopolissacarídeos (EPS) foram recuperados do meio de cultivo por centrifugação e precipitação etanólica (3:1, v/v). Da biomassa foram obtidos polissacarídeos através de extração aquosa. Para caracterizar os polissacarídeos foi determinada a composição monossacarídica (Man:Gal:Glc), avaliando espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³C e de GC-MS, sugerindo moléculas complexas. Durante a obtenção de anticorpos para a realização dos testes imunológicos utilizou-se a linhagem *E. spinifera* inativada pelo calor. A imunização foi feita via intraperitonal utilizando camundongos isogênicos balbC. Os anticorpos produzidos foram testados contra os polissacarídeos obtidos da parede celular e EPS e o que apresentou maior atividade imunogênica foi o EPS extraído a partir do cultivo em meio mínimo, seguido do meio czapeck-dox. Quanto aos polissacarídeos de parede verificou-se baixa atividade imunogênica.

Palavras-Chave: *Exophiala spinifera*, exopolissacarídeos, antígenos, parede celular

Introdução

E. spinifera é fungo dematiáceo pertence à família Herpotrichiellaceae com potencial patogênico em pacientes imunodeprimidos, os quais são responsáveis por uma diversidade de quadros clínicos, tais como, cromoblastomicose e feohifomicose (MCGINNIS, 1983; DUGGAN et al, 1995, HOOG, 1997).

A cromoblastomicose caracteriza-se por uma infecção normalmente limitada a região subcutânea com a formação de corpos muriformes, sendo *Fonsecaea pedrosoi* seu principal agente etiológico. (SALGADO et al. 2004). O termo feohifomicose abrange um amplo espectro de micoses oportunistas causadas por fungos dematiáceos, que ocorrem desde forma superficial, cutânea, subcutânea até sistêmica (OHIRA et al, 2002; MATSUMOTO & NISHIMOTO, 2003).

Nas infecções causadas por fungos dematiáceos, a produção de anticorpos no hospedeiro é conseqüência da sensibilização por estruturas complexas presentes na parede celular, tais como a dihidroxinaftaleno melanina, os lipídios e polissacarídeos, os quais podem estar envolvidos na formação de tumores, característicos de alguns quadros clínicos, desencadeado por estes

agentes. (DIXON & POLAK-WYSS, 1991). Estruturas como EPS também podem ser consideradas como um fator de virulência com um importante papel na patogenicidade, participando nos processos de adesão, agregação e simbiose (PYROG 2001).

Polissacarídeos são antígenicamente importantes, como antígenos e também podem estar envolvidos em mecanismo de reconhecimento célula-célula ou célula-hospedeiro (AHRAZEM et al, 1997). No processo de adesão o fungo invasor conecta-se com resíduos de manose presentes na membrana plasmática da célula e utiliza resíduos de *N*-acetilglucosamina no processo de ingestão (LIMONJI et al., 1997). Os fungos da família Herpotrichiellaceae utilizam resíduos de polissacarídeos para aderirem e entrarem em células a serem parasitadas.

De acordo com (MATSUYAMA et al. 1999), *D*-glucose, *D*-galactose e *D*-manose estão presentes em muitos EPS na forma piranosídica. Yurlova e Hoog, (2002), observaram que a quantidade de EPS produzida é diferente quando se cultivam fungos dematiáceos em variados meios de cultura. A caracterização destes polímeros possibilita esclarecer o papel destas estruturas durante o processo infeccioso (ALVIANO et al, 1992).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a linhagem HCEML do fungo *Exophiala spinifera*, agente de feohifomicose sistêmica, por meios de marcadores morfológicos, moleculares e bioquímicos caracterizando os polissacarídeos sintetizados por este agente visando determinar o potencial patogênico desta linhagem através de imunoenaios.

Material e métodos

Extração e quantificação do DNA

A amostra foi cultivada em ágar Sabouraud por sete dias a 28°C. Em seguida 1 cm² do micélio foi macerado em uma mistura esterilizada com 300 µL de tampão CTAB e sílica gel/celite 2:1 por cinco minutos. Adicionou-se 200 µL de tampão CTAB, misturando bem em agitador de tubos e incubado por dez minutos a 65 °C. Após a incubação foram adicionados 500 µL de clorofórmio seguida de centrifugação por cinco minutos a 20500 G. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo "eppendorf", ao qual foram adicionados 800 µL de etanol 96% gelado e colocado no freezer (-20°C) por trinta minutos, para precipitação do DNA. Foi feita nova centrifugação a 20500 G por cinco minutos seguida da retirada do sobrenadante. O precipitado de DNA foi lavado com 500 µL de álcool 70% gelado e misturado cuidadosamente. Em seguida foi realizado nova centrifugação a 20500 G por cinco minutos, retirada do sobrenadante e o DNA foi deixado desidratando a temperatura ambiente por 15 minutos (com o tubo aberto e vertido). O *pellet* foi ressuspenso em solução contendo 97,5 µL de tampão TE e a mistura incubada a 37°C por cinco minutos. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% e os DNAs armazenados à temperatura de -20°C.

PCR – Ribotipagem e Purificação dos Produtos da PCR

Fragmentos de DNA ribossômico foram amplificados usando os pares de *primers* V9D e LS266. Para a reação de PCR foi utilizado um volume de 50,3 µL contendo 25 µL de água ultra pura; 10 mM tris-HCl; 1,5 mM MgCl₂ 6H₂O; 200 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado; 50 pmol de cada *primer*; 0,5 U de Taq DNA polimerase, 2 µL de DMSO e entre 10 - 100 ng de DNA total. O programa de amplificação utilizado consistia de 30 ciclos (30s de desnaturação a 99°C; 60s de anelamento a 55°C; 60s de síntese a 72°C), utilizando dois minutos para a desnaturação inicial e três minutos de extensão final. Os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,6% (utilizando 7 µL de amostra e 3 µL de tampão de amostra). O gel foi corado em solução de Brometo de etídio e os fragmentos de amplificação obtidos foram visualizados em foto-documentador de gel. O marcador de peso molecular utilizado foi de 1 Kb. Ao tubo da amplificação foi adicionado 2/3 do volume já existente de acetato de amônia 7,5 M e 2,5 vezes o volume de amplificação com etanol 96%, foi incubado por 5 minutos. Em seguida realizou-se centrifugação a 20500 G por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foi acrescido 100 µL de etanol 70% e nova centrifugação a 20500 G por 15 minutos foi realizada. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA secado a vácuo e em seguida suspenso em 15 µL de água ultra-pura. Os produtos da purificação foram visualizados em gel de agarose 1,6% utilizando fago lambda (λØ) digerido como marcador de peso molecular referencial para a determinação da concentração do DNA.

Reação de Seqüenciamento

Na PCR realizada para o seqüenciamento foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4. Para cada reação foram usados 2 µL do mix "Bigdie terminador" (*Terminator Ready Reaction* da *Perkin-Elmer Applied Biosystem*), 30 ng do produto de PCR purificado, 0,5 µL do *primer* (ITS1 ou ITS4) e água ultra pura a completar 10 µL de reação. O programa de amplificação consistiu de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C; 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após 25 ciclos foi realizada refrigeração a 4°C. Para o volume de 10 µL de reação foram adicionados 1 µL de solução de acetato de amônio 7,5M, 10 µL de água ultra pura, 65 µL de etanol a 96°C. A mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 20500 G por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* de DNA lavado com 100 µL de etanol 70% e centrifugado a 20500 G por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado e o *pellet* secado a vácuo por 15 minutos na ausência de luz. Cada amostra foi suspensa em 5 µL de água ultra pura e submetida à eletroforese no seqüenciador automático de DNA modelo "Prism ABI" (377) da "Perkin-Elmer".

Edição, Análise das Seqüências e construção das árvores filogenéticas

As seqüências obtidas foram alinhadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999), analisadas e comparadas com outras seqüências existentes no banco de dados do NCBI (2004) pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Uma tentativa de alocação da espécie patogênica dentro de uma unidade taxonômica (táxon) mais limitada foi realizada através de análises filogenéticas das seqüências obtidas no *GenBank* de subunidades (táxons) do grupo mais inclusivo e outros grupos irmãos. As seqüências de nucleotídeos foram processadas com o auxílio do programa BIOEDIT (HALL, 1999) e alinhadas através do uso do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994), sendo que as áreas de alinhamento ambíguo foram excluídas.

A reconstrução filogenética com dados moleculares foi executada utilizando o método de máxima parcimônia (HILLIS et al., 1996) (utilizando dados não pesados e pesagem maior para transversões - 2:1). Os programas Paup*4.0 b10 (SWOFFORD, 2003) foram usados, de acordo com os métodos de reconstrução empregados. A busca da árvore mais parcimoniosa em cada análise foi realizada através da comparação de resultados de dez adições aleatórias de táxons. Suporte de ramos das hipóteses filogenéticas resultantes obtidas através das análises de parcimônia foi determinado através de reamostragem por Bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Um total de cem réplicas foi utilizado para cada análise.

Curvas de Crescimento

Amostras do isolado HCEML de *Exophiala* sp. foram inoculadas em 250 mL dos meios de cultura, Czapeck-Dox (CD) à base de sacarose e Meio Mínimo (MM) composto por glucose, contidos em frascos erlenmeyer, estes foram incubados a uma temperatura de 37°C sob agitação durante 24 horas. Após 24 horas de incubação foi retirado, de cada meio de cultura, uma alíquota de 10 mL utilizando pipeta de vidro esterilizada. Do volume retirado, 1 mL foi separado para dosagens dos açúcares, os outros 9 mL restantes foram filtrados a vácuo e realizou-se precipitação etanólica. Todo esse processo foi repetido a cada 24 horas de incubação durante oito dias. As curvas de crescimento e de produção de EPS foram elaboradas utilizando o peso da biomassa retida na filtragem, após a liofilização, e com o precipitado de EPS dialisado e liofilizado.

Além das curvas de crescimento e produção de EPS foi analisado o consumo de sacarose no meio CD e glucose no meio de MM. A metodologia empregada na quantificação de glucose procedeu-se com o uso do kit de glucose oxidase, por espectrofotometria. Para a dosagem de sacarose o método utilizado foi CCD, como padrões foram utilizadas soluções de sacarose em diferentes concentrações. Os resultados observados com a revelação (com orcinol) da placa de cromatografia foram transmitidos e analisados com o auxílio do programa *Scion Image*, onde procedeu-se a digitalização da imagem para realizar a densitometria da curva padrão de sacarose e as amostras obtidas nos diferentes dias de crescimento. Após a desitometria das áreas, os dados foram plotados em gráficos no programa Microsoft Excel 2000.

Extração dos Exopolissacarídeos

Após o cultivo da linhagem 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 vinte minutos, deixado a -20 °C *overnight*. Após este período, a solução resultante foi centrifugada a 8.400 G por dez minutos. A purificação dos polissacarídeos foi realizada por diálise aberta, através de membranas com limite de exclusão de 16 kDa por 48 horas, o produto da diálise foi, então, liofilizado e pesado para o cálculo de rendimento de cada amostra coletada.

Extração dos Polissacarídeos de Micélio

A extração aquosa foi realizada em autoclave sob pressão de 1atm a 120°C por quarenta minutos. O polissacarídeo foi obtido por precipitação etanólica (3:1v/v) da solução obtida após centrifugação do micélio.

Hidrólise Ácida Total

Alíquotas de polissacarídeos (~ 1 mg) foram tratadas com 1 mL de TFA (ácido trifluoracético) 2 M, durante oito horas a 100°C (SASSAKI et al., 1999). Após este tempo o ácido foi eliminado por evaporação até *secura*. Os monossacarídeos formados foram submetidos ao processo de redução e acetilação.

Redução e Acetilação

Os monossacarídeos obtidos pela hidrólise foram reduzidos com NaBH₄ (borohidreto de sódio) (WOLFROM, 1963; THOMPSON, 1994) em temperatura ambiente, pH 9-10, por 16 horas. Após este período, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica, até pH 7, para remoção do sódio, as amostras foram então filtradas e levadas à *secura* sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol (4x), na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com mistura de anidrido acético (Ac₂O)/piridina 1:1 (v/v) *overnight* (WOLFROM, 1963; THOMPSON, 1994), a temperatura ambiente. O processo foi interrompido por adição de gelo e o material acetilado foi extraído 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 os acetatos de alditóis foram analisados por CG-EM.

Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foram realizadas em cromatógrafo a gás, marca VARIAN, modelo SATURN 2000R, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. As análises foram realizadas com temperatura inicial do cromatógrafo de 50°C (mantida por um minuto), seguindo-se um 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 mantida isotermicamente até o final da análise por quarenta minutos. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de ^{13}C foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400 com transformador de Fourier. As amostras foram analisadas em “probe” de 5mm de diâmetro, à temperatura de 50°C, utilizando como solventes água deuterada (D_2O) ou dimetilsulfóxido deuterado ($\text{Me}_2\text{SO-d}_6$), foram utilizados acetona ou $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ como padrões internos e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em PPM.

Metilação

Uma alíquota (1 mg) do EPS foi solubilizada em 1 mL de DMSO, a esta solução foi colocado excesso de NaOH e 1 mL de iodeto de metila, agitado vigorosamente em vortex por 40 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 ambiente. Os polissacarídeos *per-O*-metilados foram hidrolisados com 0,5 mL de H_2SO_4 72% em banho de gelo, após uma hora, foram adicionados 4 mL de água e o material mantido em estufa a 100° C por 21 horas. A solução foi neutralizada com carbonato de bário e centrifugada, o sobrenadante foi filtrado e os monossacarídeos *per-O*-metilados foram reduzidos (NaBD_4), acetilados e analisados por CG-EM.

Produção e Avaliação de Anticorpos

Camundongos isogênicos (balb c) foram imunizados via intraperitoneal com emulsão contendo a biomassa do fungo *E. spinifera* previamente autoclavada e congelada com o objetivo de esterilizar a amostra. Em seguida testava-se a viabilidade da amostra através de repique em ágar Sabouraud e posterior incubação à 36°C durante dez dias. Na ausência de crescimento as amostras eram, então, utilizadas para aplicação nos animais. Uma aplicação era realizada a cada 15 dias, foram feitas três aplicações, passados noventa dias da primeira aplicação o animal foi sangrado, e o sangue foi centrifugado para obtenção do soro contendo os anticorpos, os quais foram utilizados nos testes de imunogenicidade.

Preparação da Placa de ELISA

O experimento de ELISA foi realizado com o antígeno contendo carboidrato, para isto, a placa de reação foi tratada para se formar uma matriz de sílica Gel G na superfície de cada poço (o carboidrato não adsorve em plástico) para que o carboidrato fosse imobilizado.

A matriz de Sílica Gel G da superfície de cada poço foi feita com uma solução de Bálsamo do Canadá na concentração de 20 mg/mL de xilol (xileno) e como subseqüente adição de 100 μL de sílica a 250 mg/mL em xilol, em cada poço da placa de ELISA. A placa foi seca a temperatura ambiente, estando pronta para o uso após três dias de secagem.

Reação Imunoenzimática

Para adsorção do antígeno na placa foi feito uma diluição da solução estoque de carboidrato na concentração de 50 μg por poço da placa que foi seca à temperatura ambiente.

Em seguida foi realizado o bloqueio da placa (esta etapa é necessária para que os lugares onde não houve adsorção de antígeno sejam bloqueados com uma solução inerte, para que o anticorpo não venha se ligar nesses espaços) com 100 μL de albumina bovina em PBS 1% por uma hora à temperatura ambiente, então os poços foram lavados 5x com PBST

Para ligação do anticorpo primário na placa foi utilizada uma diluição seriada do anticorpo

nos poços e após três horas de incubação os poços foram lavados 5x com PBST.

A ligação do anticorpo secundário foi feita com adição de 100 μL de solução de anticorpo anti mouse em diluição 1:4000 em cada poço da placa, incubou-se por uma hora à temperatura ambiente na ausência de luz em seguida os poços foram lavados 5x com PBST.

Na revelação para visualização da reação foi utilizado OPD (*O-phenylenediamine dihydrochloride*) na concentração de 0,2 mg/mL de tampão citrato e 2 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a reação foi bloqueada com 100 μL de H_2SO_4 2N (1M). A placa foi lida em espectrofotômetro com absorbância em 490 nm.

Resultados e Discussão

De acordo com a macro e micromorfologia o isolado de HCEML de *Exophiala* sp. foi caracterizado como *Exophiala spinifera*. Segundo Hoog et al. (2004) esta espécie apresenta colônias bem definidas de coloração esverdeada a negras, microscopicamente revelaram conidióforos eretos, acastanhados, cilíndricos e multicelulares. Tais características foram observadas neste isolado, através de técnicas de microscopia ótica de eletrônica de varredura (Figura 1),

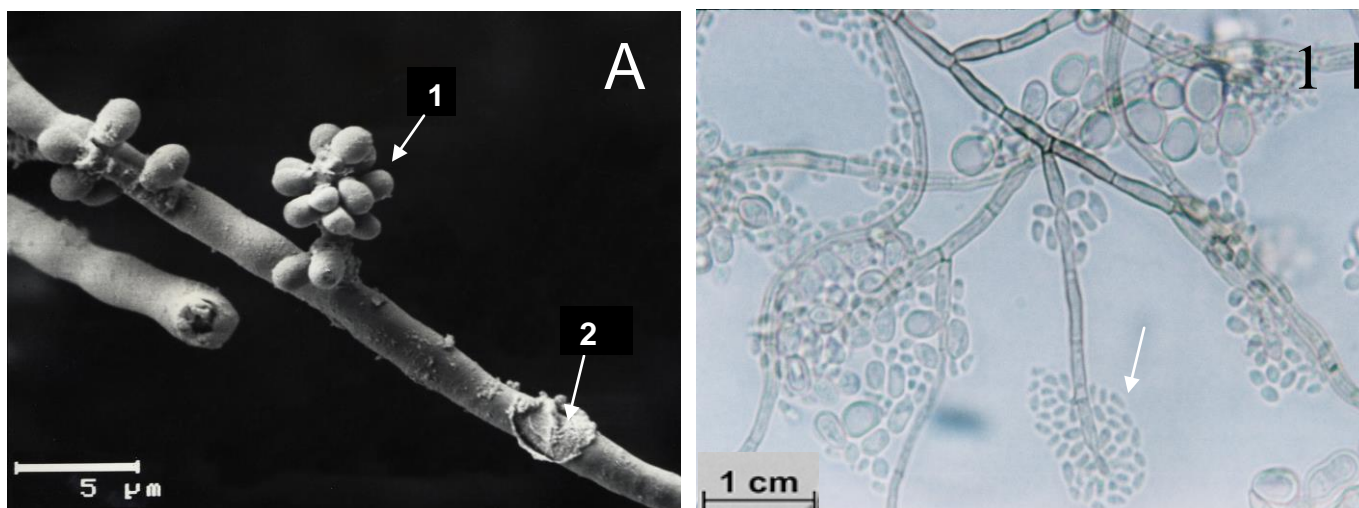


FIGURA 1 – ASPECTOS MICROMORFOLOGICOS DA LINHAGEM HCEML DE *Exophiala spinifera*: (A) microscopia eletrônica de varredura, aumento 3300X seta 1 indica conídios cilíndricos dispostos à superfície do conidióforo e a seta 2 indica a presença de cicatriz; (B) microscopia ótica, aumento 1000X, seta indicando conidióforos eretos, cilíndricos e multicelulares.

O seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS2 foi utilizado na confirmação da identificação realizada por meio da morfologia. A seqüência consenso obtida, foi comparada com dados de seqüências ITS de rDNA de linhagens referencia de *Exophiala* depositados no banco de dados do GenBank (*National Center for Biotechnology Information of the National Institutes of Health*) e utilizando o programa Blast para o alinhamento (ALTSCHUL et al., 1997).

Para análise foram comparados 474pb em que o isolado apresentou 99% de identidade com *Exophiala spinifera*. Diferentes análises, com dados pesados (Figura 2) e não pesados (Figura 3) revelaram resultados semelhantes, onde foram verificados vários nós que oferecem grande suporte, de acordo com as arvores apresentados nas figuras 2 e 3 verificou-se que o isolado HCEML, de *Exophiala* sp. agrupou-se com *E. spinifera*.

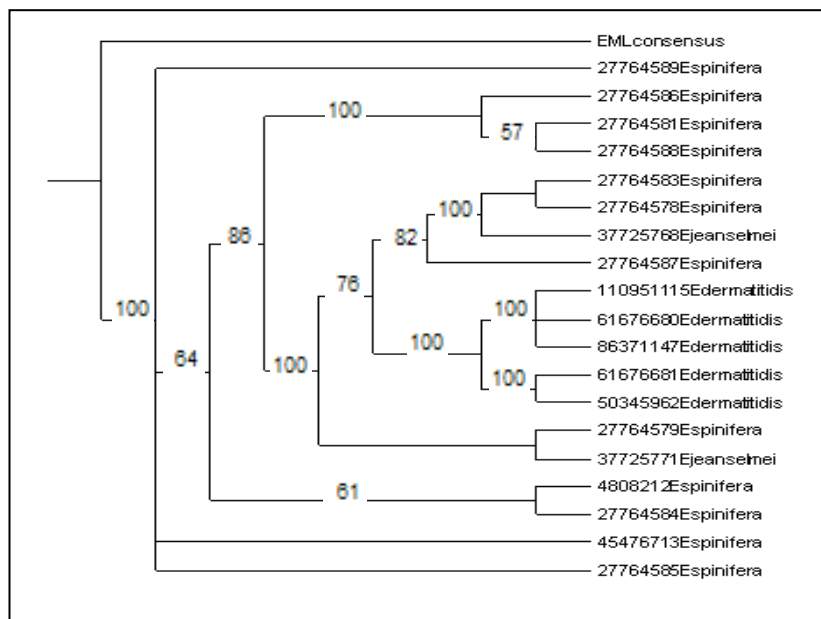


Figura 2 - Árvore filogenética representando as relações entre o isolado HCEML e outros representantes de fungos. máxima parcimônia (pesagem maior para transversões - 2:1)

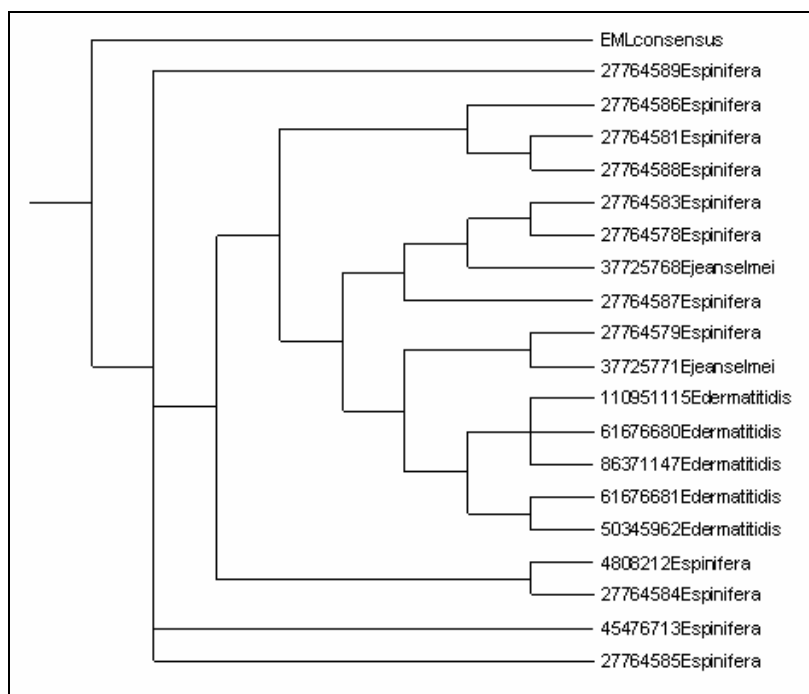


Figura 3 - Árvore filogenética representando as relações entre o isolado HCEML e outros representantes de fungos. máxima parcimônia (dados não pesados)

Haase et al. (1999), demonstraram que *E. spinifera* e *E. jeanselmei* constituem um grupo filogeneticamente delimitado dentro da família Herpotrichiellaceae e distinto de outras espécies de *Exophiala*, sendo a *E. spinifera* uma das espécies de maior virulência dentro do gênero e com morfologia diferenciada dentro do grupo (WANG et al., 1987).

Há diversos relatos de infecções a partir de inoculações por estes fungos (HOOG e GUARRO, 1995) e um grande aumento no número de casos em pacientes imunodeprimidos, tais como vítimas do câncer, AIDS e transplantados, *E. spinifera* é um microrganismo com potencial patogênico para esses pacientes.

Sendo assim, o conhecimento dos fatores de virulência é de fundamental importância para o esclarecimento da patogenidade deste agente e conseqüentemente fornecer parâmetros para entendimento da evolução clínica da doença. A caracterização dos polissacarídeos sintetizados por este agente visa determinar a antigenicidade destes componentes através de imunoenaios.

Padronização da produção de exopolissacarídeos (EPS) em Exophiala spinifera

A avaliação do crescimento nos dois diferentes meios de cultivo analisados demonstrou a estabilização do crescimento entre o sexto e o sétimo dia, porém obteve-se um peso maior de biomassa produzida no meio CD, quando comparado à biomassa produzida no MM, indicando o meio CD como melhor meio de cultivo para obtenção de biomassa. (Figura 4).

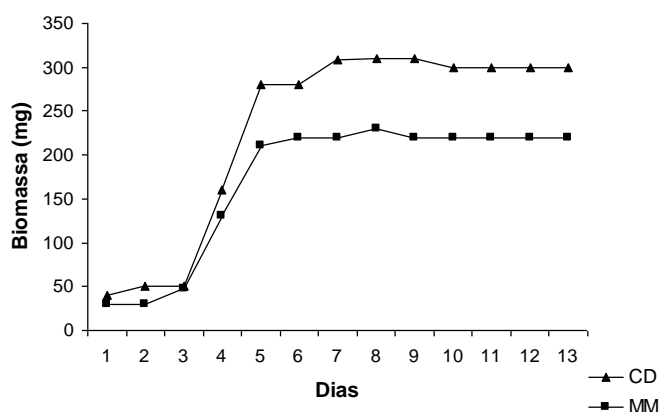


Figura 4 - Curva de crescimento de *exophiala spinifera* nos meios mínimo e czapeck-dox.

Para determinação do perfil da produção de EPS pelo isolado de *E. spinifera* nos meios Mínimo e Czapeck-DOX foi realizada uma curva de produção de EPS construída com o monitoramento da produção destes polissacarídeos durante 13 dias. No meio Mínimo a produção de EPS foi maior em relação ao meio Czapeck-dox. A partir do sétimo dia os isolados param de produzir EPS e os níveis começam a baixar indicando que o fungo inicia o consumo do exopolissacarídeo produzido por ele (Figura 5).

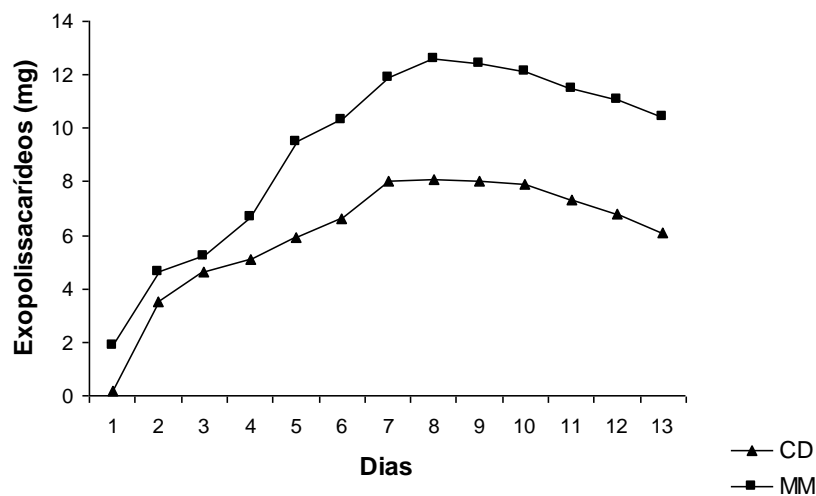


Figura 5- Exopolissacarídeos produzidos por *exophiala spinifera* nos meios mínimo e czapeck-dox.

A partir das alíquotas retiradas diariamente do meio de cultura MM cuja fonte de açúcar é a glucose, foi dosada a concentração de deste açúcar a cada dia de crescimento, para verificar o consumo diário deste açúcar. A dosagem foi realizada através da reação da enzima glucose oxidase. Esta curva foi elaborada a fim de avaliar o comportamento do fungo *E. spinifera* 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 a glucose é totalmente consumida por volta do sétimo dia (Figura 6).

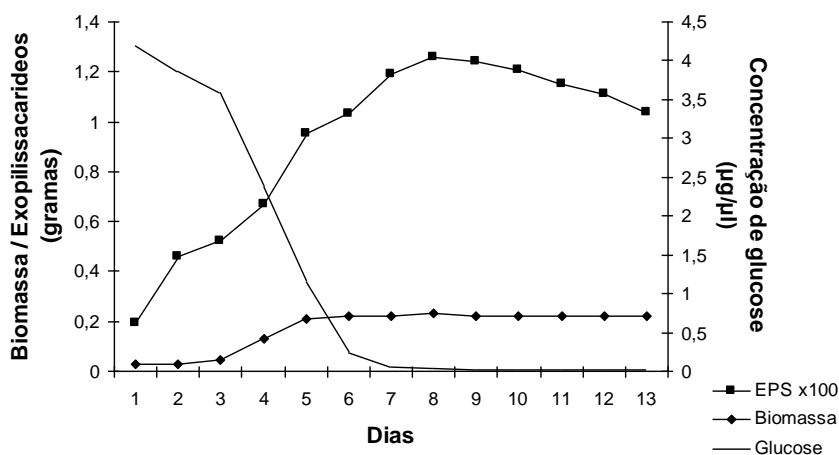


Figura 6 - Gráfico indicando o consumo de glucose, produção de EPS e biomassa no meio mínimo

Utilizando as alíquotas retiradas diariamente do meio de cultura CD cuja fonte de açúcar é a sacarose, foi determinado o consumo deste açúcar a cada dia. Os valores das alíquotas diárias foram determinados por densitometria em CCD com auxílio do programa *Scion Image*. A concentração de sacarose no meio de cultivo CD foi monitorada durante 13 dias, pode-se observar que os níveis de sacarose diminuem ao longo dos dias e houve a estabilização dos níveis a partir do oitavo dia indicando a parada do consumo deste açúcar (Figura 7).

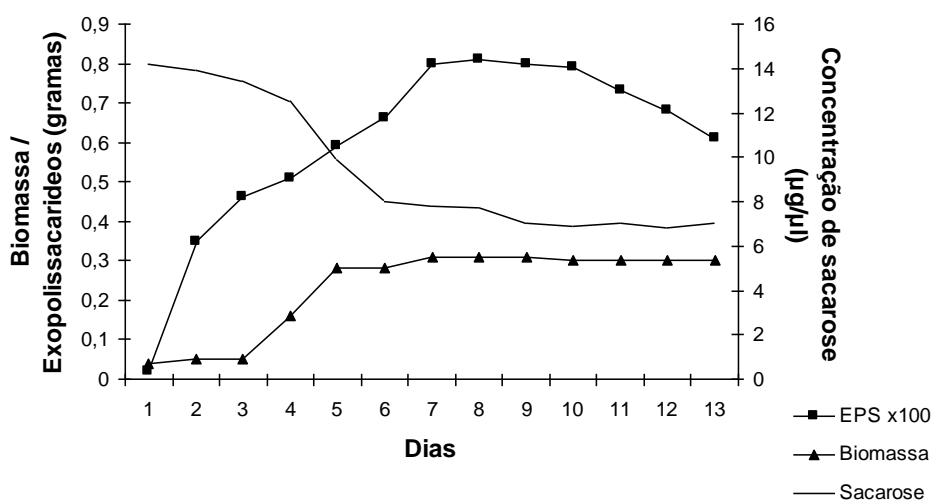


Figura 7 - Gráfico indicando o consumo de sacarose, produção de eps e biomassa no meio de cultivo czapeck-dox

Em ambos os meios de cultura foram observados que a partir do momento em que os níveis dos açúcares baixam, os exopolissacarídeos começam a ser consumidos. Esse comportamento pode ser encarado como uma estratégia de sobrevivência para este microrganismo. No estudo realizado por Yurlova e Hoog, (2002) resultados semelhantes foram obtidos, diferentes quantidades de EPS foram detectados em variados meios de cultura, porém neste estudo a produção de EPS foi quantificada somente ao final do quinto dia não sendo feito o controle diário.

Análise de ressonância magnética nuclear de ^{13}C dos polissacarídeos de parede celular e EPS nos meios czapeck-dox (CD) e meio mínimo (MM)

Analisando em conjunto os espectros de RMN de ^{13}C (Figuras 8 A e B) da parede do fungo nos meios CD e MM pode-se observar que ambos apresentam algumas semelhanças.

A região anomérica apresenta uma menor complexidade de sinais quando comparados aos espectros de RMN de ^{13}C dos EPS obtidos para os meios CD e MM. A alteração mais evidente é a ausência do sinal de $\beta\text{-Gal}f$ em δ 107,7, entretanto, deve-se ressaltar que existe uma grande variedade de sinais de unidades de $\alpha\text{-Man}p$ 2,6-di-O-substituídas, unidades terminais de $\alpha\text{-Gal}p$ ligadas em C-2 em δ 102,6. O sinal em δ 101,2 foi atribuído a unidades de $\alpha\text{-Man}p$ (1 \rightarrow 6) ligadas e esta atribuição pode ser suportada pela presença dos sinais em δ 65,9 e δ 66,1. Outras atribuições de assinalamento não foram realizadas devido a falta de congruência com os dados de metilação.

O espectro de ^{13}C -RMN (Figura 8 C) do EPS obtido no meio CD mostra-se extremamente complexo pela grande quantidade de sinais na região de carbono anomérico onde observamos pelo menos 15 sinais majoritários. Comparando-se com os dados de literatura pode-se destacar a presença de unidades terminais e substituídas em C-6 de $\beta\text{-Gal}f$ em δ 107,7 e δ 107,5 respectivamente. O sinal em δ 100,5 foi atribuído a unidades de $\alpha\text{-Man}p$ (1 \rightarrow 2) ligadas e o sinal em δ 98,7 foram atribuídas a unidades de $\alpha\text{-Man}p$ 2,6-di-O-substituídas, que podem ser sugeridas através da presença de sinais na região de 78,3 a 78,7 PPM e pelos sinais em δ 66,8 e δ 66,9. O sinal em δ 99,9 corresponde unidades terminais de $\alpha\text{-Glc}p$ e o sinal em δ 97,6 foi atribuído a unidades de $\alpha\text{-Glc}p$ substituído em C-6, sendo sustentada pela presença do sinal em δ 68,5.

O espectro de ^{13}C -RMN (Figura 8 D) do EPS obtido no meio MM também é extremamente complexo, entretanto não apresenta grandes quantidades de terminais de β -Gal f . Pode-se atribuir o sinal em 102,4 à unidades terminais de α -Man p . Como observado aos espectros anteriores, o sinal em δ 101,2 foi atribuído a unidades de α -Man p (1 \rightarrow 6) substituídas e confirmadas pelos sinais em δ 65,9 e δ 66,1. A presença do sinal em δ 100,3 foi atribuída as unidades de α -Man p 2,6-di-O-substituídas, e que podem ser confirmadas através da presença dos sinais na região de 78,3 a 78,7 PPM. O sinal em δ 99,9 corresponde unidades terminais de α -Glc p , o sinal em δ 97,6 foi atribuído a unidades de α -Glc p substituídas em C-6, sendo sustentada pela presença do sinal em δ 68,5.

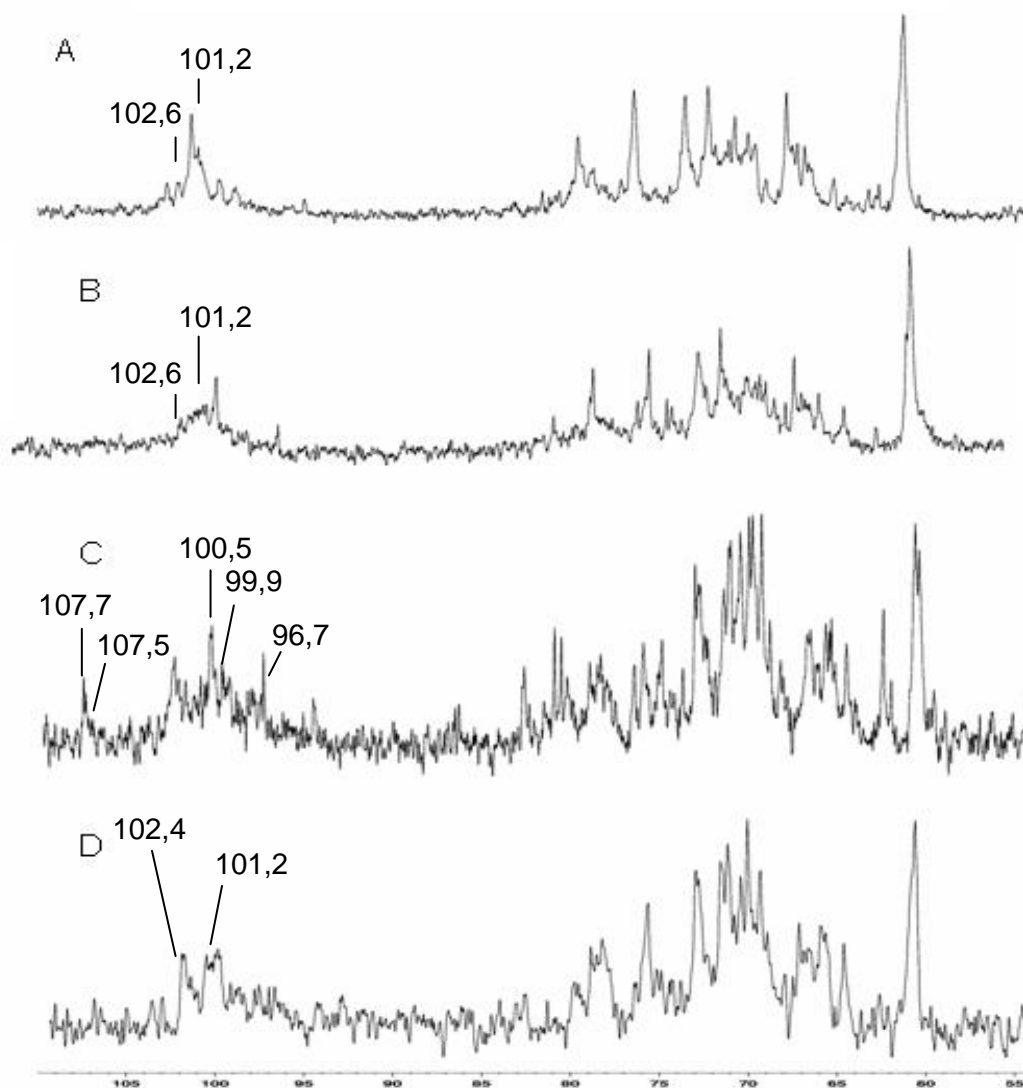


Figura 8 - Espectros de RMN das amostras mm-parede (A), cd-parede (B), cd-eps (C) e mm-eps (D).

Produção de anticorpos

Com os experimentos de ELISA foi observado que o soro contendo os anticorpos produzidos em camundongos reconhece as amostras de maneiras diferentes. O EPS obtido da cultura em Meio Mínimo foi o mais imunogênico, pois apresentou maior absorvância no método utilizado para avaliação da ligação dos antígenos com os anticorpos, seguido do EPS obtido do meio de cultivo Czapeck-Dox, as amostras obtidas de parede celular apresentaram baixas absorvâncias indicando ser pouco imunogênicas (Figura 9).

Através destas informações não é possível indicar a estrutura responsável pela propriedade de exercer maior imunogenicidade. Estes resultados são extremamente interessantes, pois durante a imunização foi utilizado o fungo inativado e não os EPS obtidos no cultivo no meio MM e CD. Pode-se sugerir que o EPS serviria como uma barreira prévia e a melanina uma segunda barreira, e ambos estariam protegendo o fungo contra o sistema de defesa, o que permitiria o crescimento do fungo patogênico. Entretanto, estas suposições necessitam de mais experimentos para sua confirmação

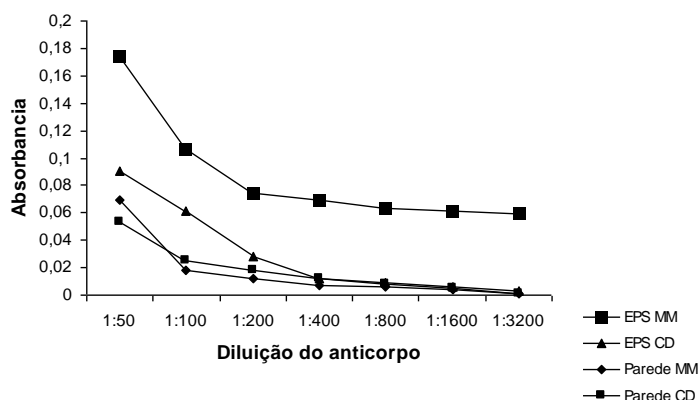


Figura 9 - Resposta do anticorpo frente a diferentes amostras

Conclusões

A linhagem HCEML de *Exophiala spinifera* caracterizada por meio de morfologia e seqüência ITS apresentou a produção dos polissacarídeos manose, galactose e glucose nas amostras cultivadas em meios de cultura pobres em fontes de carbono. O estudo da produção de polissacarídeos revelou que estes passam a ser consumidos quando os níveis dos açúcares diminuem, indicando um mecanismo de reserva e conseqüentemente uma estratégia de sobrevivência para este microrganismo.

A presença das diversas estruturas em quantidades variadas pode estar relacionada a maior ou menor atividade antigênica observada, pois diferentes quantidades e variedades estruturais de polissacarídeos de parede e EPS reagiram com intensidades diferentes aos imunoensaios. A alta atividade imunogênica dos exopolissacarídeos frente à baixa resposta contra os polissacarídeos de superfície observada sugere um mecanismo potencial de virulência da linhagem, o qual pode representar um meio de defesa à resposta do hospedeiro, uma vez que os anticorpos parecem reconhecer os EPS em vez dos antígenos da parede celular, o que pode ser um dos fatores que favorecem a sobrevivência deste agente no tecido do hospedeiro.

Referências Bibliográficas

- ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J. ; DE SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanolol. **Mycopathologia**, v.119, p.17-23, 1992.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J.A.; MIRANDA, B.G.; DOMENEEH, J.; BARBERO, J.J.; BERNABÉ, M. Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of genera *Cylindrocladium* and *Calonectria*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.303, p.67-72, 1997.
- DIXON, D.M.; POLAK-WISS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification, **Mycoses**, v.34, p.1-18, 1991.
- DUGGAN, J.M.; WOLF, M.D.; KAUFFMAN, C.A. Phialophora verrucosa infection in an AIDS patient. **Mycoses** May-Jun;38: 215-8, 1995.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: na approach using the bootstrap. **Evolution** 39: 83-791,1985.
- HAASE, G.; SONNTORG, L.; MELXER-CRICK, B.; HOOG, G.S. de Phylogenetic inference by SSU-gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. **Studies in Mycology**, n.43: 80-97, 1999.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41: 95-98, 1999.
- HILLIS, D. M., MORITZ, C. E MARBLE, B.K. Molecular Systematics. **Sinauer Associates**, Inc., 1996.
- HOOG, G.S. de; GUARRO. **Atlas of clinical fungi**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995, 720p.
- HOOG, G.S. de. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. **Mycoses**, 40 Suppl 2:5-8. 1997.
- LIMONJI, C. L.; ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S. & SOUZA, W. The influence of surfaces carbohydrates on interaction of *Fonsecaea pedrosi* with Chinese Hamster Ovary glycosylation mutant cells. **Mycopathologia**, v.138, p.127-135. 1997.
- MATSUYAMA, H.; SASAKI, R.; KAWASAKI, K.; YUMOTO, I. Production of a novel exopolysaccharide by *Rahnella aquatilis*. **J Biosci Boieng**, 87(2):180-3, 1999.
- MATSUMOTO, T.; NISHIMOTO, K.; Cutaneous manifestations of systemic mycoses. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**;44(3):193-6, 2003.
- McGINNIS, M.R. Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis: New concepts, diagnosis and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.8, p.1-16, 1983.
- OHIRA, S.; ISODA, K.; HAMANAKA, H.; TAKAHASHI, K.; NISHIMOTO, K.; MIZUTANI, H. Case report. Phaeohyphomycosis caused by *Phialophora verrucosa* developed in a patient with non-HIV acquired immunodeficiency syndrome. **Mycoses** Feb;45(1-2):50-4. 2002.

PYROG, T.P. Biological functions of microbial exopolysaccharides. **Mikrobiol Z.** Sep-Oct;63(5):80-101, 2001.

SALGADO, C. G.; SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; SILVA, M. B.; COSTA, P. F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo 46(1):33-36, January-February, 2004

SASSAKI, G.L.;MACHADO, M. J.; TISCHER, C. ^a GORIN, P. ^a; IACOMINI M. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichem *Dictyonema glabratum*. **J. Nat Prod.**, v. 62, p. 844-847, 1999.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Versão 4. **Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts, 2003.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Research** 22, 4673-4680, 1994.

WANG, L.D.; LI, R.Y.; WANG, X.H. Observations os sporulation in Fonsecaea and Phialophora by scanning electron microscopy. **Mycopathologia**, v.98 p.105-109, 1987.

WOLFROM, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 2, p. 211-215, 1963.

YURLOVA, N.A.; HOOG, G.S. Exopolysaccharides and capsules in human pathogenic Exophiala species. **Mycoses** p .443-448, 2002.