

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA JACOMEL FAVORETO DE SOUZA LIMA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NEGRAS EM FORMIGAS,
ABELHAS E CUPINS

CURITIBA

2018

BRUNA JACOMEL FAVORETO DE SOUZA LIMA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NEGRAS EM FORMIGAS,
ABELHAS E CUPINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Débora do Rocio Klisiowicz

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Lima, Bruna Jacomel Favoreto de Souza
Isolamento e caracterização de leveduras negras em formigas, abelhas e cupins. / Bruna Jacomel Favoreto de Souza Lima. – Curitiba, 2018.
97 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vânia Aparecida Vicente
Co-orientadora: Débora do Rocio Klisiowicz
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Cromoblastomicose. 2. Fungos. 3. Formiga. 4. Abelha. 5. Cupim. I. Título II. Vicente, Vania Aparecida. III. Klisiowicz, Débora do Rocio. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.2



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Isolamento e caracterização de leveduras negras em formigas, abelhas e cupins”

por

Bruna Jacomel Favoreto de Souza Lima

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente – Presidente

Prof. Dr. Diogo Robl

Profa. Dra. Gheniffer Fornari

Profa. Dra. Renata Rodrigues Gomes

Curitiba, 23 de março de 2018.

Dedico a meus avós,

Juca (*in memoriam*) e Lila (*in memoriam*)

Oswaldo (*in memoriam*) e Ester,

que me ensinaram o valor do trabalho e

da família

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, pelo dom da vida e pelas oportunidades que me deu até aqui.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná (UFPR) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (PPGMPP) pelos ensinamentos ao longo desse tempo, também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária pelo suporte oferecido durante a realização deste mestrado.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente, por seus ensinamentos, tanto científicos como para a vida.

Agradeço à minha co-orientadora, Profa. Dra. Débora do Rocio Klisiowicz, por seu auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho e também pela formação desde a graduação.

Sou muito grata a Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, e ao Dr. Cristiano Menezes, da Embrapa Amazônia Oriental - CPATU, pelas coletas de amostras realizadas.

Gostaria de agradecer a Dra. Renata Rodrigues Gomes por toda a ajuda, com seus comentários e sugestões, sempre contribuindo para a melhoria deste trabalho.

Também sou muito grata aos colegas do LabMicro, especialmente a Juciliane, Gheniffer, Morgana, Amanda, Flávia, Tatiana, Germana e Cristina, por tornarem os dias mais leves e fáceis de serem levados.

Agradeço aos meus pais, Oziel e Rosangela, por todos os ensinamentos e suporte que sempre me deram.

Agradeço a minha irmã, Taynan, por ser a pessoa alegre que é e que ilumina meus dias.

Também agradeço ao meu esposo, Diego, por toda a paciência, apoio e companheirismo ao longo dos anos, em especial no decorrer desta etapa.

Muito obrigada!

“Quanto mais eu estudo a natureza, mais me maravilho com a obra do Criador”

Louis Pasteur

RESUMO

A cromoblastomicose é uma doença negligenciada caracterizada pela ocorrência de lesões cutâneas, subcutâneas ou disseminadas, de desenvolvimento lento, que podem comprometer a qualidade de vida e o desenvolvimento econômico do indivíduo afetado. Trata-se de uma doença ocupacional que afeta principalmente trabalhadores rurais e aqueles expostos a solo e material vegetal contaminados, homens (numa relação 4:1), com idades entre 25 e 85 anos. O desenvolvimento da doença se dá principalmente a partir da inoculação de leveduras negras por lesão traumática com material contaminado. No Brasil, *Fonsecaea pedrosoi* é considerado o principal causador de cromoblastomicose, porém outras espécies como por exemplo, *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pugnacius*, *Rhinochadiella tropicalis* e *Cyphellophora ludoviensis* também são relacionadas com a doença. Leveduras negras têm sido encontradas em substratos vegetais, madeira, solo e material vegetal em decomposição. Além disso, são capazes de se desenvolver em diversos micro-ambientes considerados extremos, como solo contaminado com hidrocarbonetos, material contaminado com petróleo e gasolina, madeira tratada com creosoto, entre outros. O desenvolvimento dessas leveduras em condições extremas, como presença de radiação ultravioleta, alta osmolaridade, altas temperaturas, escassez de nutrientes, além da capacidade de assimilação de compostos aromáticos de carbono as caracteriza como seres oligotróficos. Embora se conheça os agentes causais da cromoblastomicose, o nicho ambiental e a forma com que essas leveduras se dispersam no ambiente ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo uma das hipóteses sugeridas a de disseminação ambiental mediada por insetos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi determinar se insetos sociais, especificamente formigas, abelhas e cupins, podem atuar como vetores na disseminação de leveduras negras no ambiente. Para isso foram realizados isolamentos utilizando duas técnicas seletivas para leveduras negras, flotação em óleo mineral e enriquecimento seletivo em compostos aromáticos voláteis, sendo obtidos oito isolados de fungos dematiáceos, posteriormente identificados por micromorfologia e sequenciamento como *Fonsecaea pedrosoi*, *Rhinochadiella similis*, *Exophiala xenobiotica*, *Cyphellophora* sp., *Cladosporium* sp., *Microascus murinus* e *Hawksworthiomyces* sp. Dentre os isolados, *Fonsecaea pedrosoi*, *Rhinochadiella similis*, *Exophiala xenobiotica* e *Cyphellophora* sp. são relacionadas com o desenvolvimento de cromoblastomicose ou outras micoses de implantação. Assim sendo, formigas, abelhas e cupins podem ser considerados vetores e agentes de dispersão de leveduras negras patogênicas, visto que tais leveduras são encontradas no exoesqueleto destes insetos e em material diretamente associado a estes hospedeiros.

Palavras-chave: Cromoblastomicose; Leveduras negras; *Atta laevigata*; *Melipona flavolineata*; *Scaptotrigona postica*; *Nasutitermes* sp.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis is a neglected disease characterized by cutaneous, subcutaneous or disseminated lesions with slow progression that affects mostly farm workers and individuals exposed to contaminated soil and plant debris, impairing life's quality and affecting individual's economic status. The onset of this disease is mostly by traumatic inoculation of black yeasts from plant material contaminated. *Fonsecaea pedrosoi* is the major agent of chromoblastomycosis in Brazil, but other species are related to the disease, as *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pugnacius*, *Rhinocladiella tropicalis* and *Cyphellophora ludoviensis*. Black yeasts have been isolated from decaying plant material, soil, wood and other environments. They are capable of growing in harmful environments, like soil contaminated with hydrocarbons, contaminated sites with petroleum and gas, creosote treated wood and others. Black yeasts are known to be oligotrophic organisms because of their capacity for development in extreme conditions, such as UV presence, high osmolarity and temperature, low availability of nutrients, besides their capacity to assimilate hydrocarbons. It is well known which species are agents of chromoblastomycosis, but until now little is known about the environmental niche and mode of dispersion in nature. Because this, is hypothesized that insects can act as vectors mediating fungal dispersion. In this way, the aim of this study was determinate if social insects, being them ants, bees and termites, can act as vectors disseminating black yeasts in nature. To elucidate this, two selective methods of isolation were realized, oil flotation and selective enrichment on volatile aromatics. Eight isolates of dematiaceous fungi were obtained and were identified by micromorphology and sequencing as *Fonsecaea pedrosoi*, *Rhinocladiella similis*, *Exophiala xenobiotica*, *Cyphellophora* sp., *Cladosporium* sp., *Microascus murinus* and *Hawksworthiomyces* sp. Four of these are known as the agents of chromoblastomycosis or another implantation mycosis, being them *Fonsecaea pedrosoi*, *Rhinocladiella similis*, *Exophiala xenobiotica* and *Cyphellophora* sp. These results demonstrated that ants, bees and termites could be considered vectors and pathogenic black yeasts' dispersion agents since these fungi were found in insects' exoskeleton and in material associated with them.

Keywords: Chromoblastomycosis; Black yeast; *Atta laevigata*; *Melipona flavolineata*; *Scaptotrigona postica*; *Nasutitermes* sp.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ORDENS E GÊNEROS DE LEVEDURAS NEGRAS.....	15
FIGURA 2 – CONIDIÓFOROS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Fonsecaea</i>	17
FIGURA 3 – FILOGENIA DE ESPÉCIES REPRESENTATIVAS NA ORDEM CHAETOTHYRIALES, BASEADA EM ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS LSU.....	20
FIGURA 4 – PRESENÇA DE MELANINA NA SUPERFÍCIE DOS CONÍDIOS DE <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	23
FIGURA 5 – CORPOS MURIFORMES.....	25
FIGURA 6 – HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS.....	27
FIGURA 7 – FORMAS CLÍNICAS DA CROMOBLASTOMICOSE.....	30
FIGURA 8 – GRAUS DE SEVERIDADE DAS LESÕES DE CROMOBLASTOMICOSE.....	31
FIGURA 9 – MORFOLOGIA DE <i>Atta laevigata</i> E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NA AMÉRICA DO SUL.....	35
FIGURA 10 – MORFOLOGIA DE <i>Melipona</i> sp. E <i>Scaptotrigona</i> sp.....	36
FIGURA 11 – NINHO E MORFOLOGIA DE <i>Nasutitermes</i> sp.....	38

CAPÍTULO II

FIGURA 1 – MAPA DAS REGIÕES DE COLETA NOS ESTADOS DO MARANHÃO E DO PARÁ.....	56
FIGURA 2 – ÁRVORE COM REPRESENTANTES DAS FAMÍLIAS HERPOTRICHIELLACEAE E CYPHELLOPHORACEAE BASEADA EM SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS.....	64
FIGURA 3 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS COMPLEXOS <i>C. cladosporioides</i> E <i>C. shaerospermum</i> DO GÊNERO <i>Cladosporium</i> BASEADA EM ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS.....	66
FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS COLONIAIS E DE MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO CMRP 3080.....	67

FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA MICROASCALES BASEADA EM ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO LSU.....	68
FIGURA 6 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS GÊNEROS <i>Hawksworthiomyces</i> E <i>Sporothrix</i> BASEADA EM ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO LSU.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO II

GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO DOS ISOLADOS DE FORMIGAS (<i>Atta laevigata</i>), ABELHAS (<i>Melipona flavolineata</i>), CUPINS DO PARÁ (<i>Nasutitermes</i> sp.) E MATERIAL DO NINHO DE <i>Nasutitermes</i> sp. DO MARANHÃO.....	61
GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS <i>Fonsecaea pedrosoi</i> (CMRP 3076), <i>Exophiala xenobiotica</i> (CMRP 3077), <i>Rhinoctadiella similis</i> (CMRP 3079) E <i>Cyphellophora</i> sp. (CMRP 3103) APÓS 14 DIAS.....	65
GRÁFICO 3 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Cladosporium</i> sp. (CMRP 3119) APÓS 14 DIAS.....	66
GRÁFICO 4 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Canariomyces</i> sp. (CMRP 3080) APÓS 14 DIAS.....	67
GRÁFICO 5 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Hawksworthiomyces</i> sp. (CMRP 3102) APÓS 14 DIAS.....	69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1 – DIFERENTES TEMPERATURAS DE CRESCIMENTO E TIPOS DE LESÃO.....	26
---	----

CAPÍTULO II

TABELA 1 – LINHAGENS ISOLADAS.....	63
------------------------------------	----

SUMÁRIO

PREFÁCIO	8
CAPÍTULO I: DELINEAMENTO DA DISSERTAÇÃO	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 GERAL	13
2.2 ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 LEVEDURAS NEGRAS.....	14
3.1.1 TAXONOMIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS NEGRAS DA ORDEM CHAETOTHYRIALES	19
3.1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA	22
3.3 CHAETOTHYRIALES AGENTES DE DOENÇA EM HUMANOS.....	28
3.4 ORIGEM AMBIENTAL DA CROMOBLASTOMICOSE.....	32
3.5 INSETOS SOCIAIS	33
3.5.1 FORMIGAS	34
3.5.2 ABELHAS.....	35
3.5.3 CUPINS.....	37
3.5.4 INSETOS CARREADORES DE FUNGOS.....	38
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO II: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NEGRAS EM INSETOS SOCIAIS DE ÁREA ENDÊMICA DA DOENÇA CROMOBLASTOMICOSE	50
RESUMO	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAIS E MÉTODOS	55
2.1 COLETA DOS INSETOS.....	55
2.1.1 AUTORIZAÇÃO DE COLETA	55
2.2 ISOLAMENTO	57
2.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	58
2.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA	58
2.5 EXTRAÇÃO DE DNA	58
2.6 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO GÊNICO	59
2.7 ALINHAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	59

3 RESULTADOS	61
3.1. ISOLAMENTO	61
3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	62
4 DISCUSSÃO	70
5 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77
CAPÍTULO III: DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS	81
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE	95
REAGENTES UTILIZADOS.....	95
DIAGRAMA METODOLÓGICO – ISOLAMENTO	97

PREFÁCIO

Este estudo foi dividido em três capítulos distintos.

O capítulo I consiste em um delineamento da dissertação, englobando uma introdução geral, com detalhamento dos objetivos propostos para este estudo, bem como uma revisão de literatura abordando leveduras negras, a taxonomia da ordem Chaetothyriales e os fatores de virulência associados a patologias em humanos, bem como a origem ambiental da cromoblastomicose. Nesta revisão de literatura também são abordados aspectos relacionados a insetos sociais e sua importância como carreadores de fungos.

No capítulo II são detalhados o isolamento e a identificação de leveduras negras patogênicas e ambientais a partir do exoesqueleto de formigas, abelhas e cupins e também de ninhos de cupins.

No capítulo III são apresentadas as considerações finais e as perspectivas futuras deste estudo.

CAPÍTULO I: DELINEAMENTO DA DISSERTAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma doença cutânea e subcutânea caracterizada pela inoculação traumática com material ambiental em que se desenvolvem lesões de evolução lenta, clinicamente polimórficas podendo ser classificadas como nodular, verrucosa, cicatricial, em placas, tumorais (“cauliflower-like”), ou formas mistas, que podem acarretar em infecções secundárias e desenvolvimento de tumores malignos (GOMES et al., 2016; NAJAFZADEH, 2011b; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SEYEDMOUSAVI et al., 2014; SLESACK et al., 2011). Recentemente foi classificada como micose de implantação, assim como feohifomicose, entomofotoromicose, esporotricose, micetoma e lacaziose ou lobomicose, uma vez que estas doenças ocorrem após trauma transcutâneo de diversos tipos (QUEIROZ-TELLES et al., 2017), sendo uma doença negligenciada causada por leveduras negras pertencentes à ordem Chaetothyriales e principalmente a família Herpotrichiellaceae. Em cultura, estas leveduras se caracterizam por colônias filamentosas, com coloração escura no verso e no reverso. As espécies relacionadas com a cromoblastomicose se apresentam nos tecidos humanos na forma de 2 ou 4 células fúngicas com septação transversal e longitudinal, chamadas de corpos muriformes, consideradas estruturas adaptadas ao estresse devido a resposta imune do hospedeiro. A presença de corpos muriformes é determinante para o diagnóstico da doença, sendo que são considerados marcadores de cromoblastomicose (NAJAFZADEH et al., 2011b; NASCIMENTO, 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2013).

A cromoblastomicose é mais prevalente em regiões com clima tropical ou subtropical, afetando principalmente o continente americano, africano e asiático, com os maiores índices reportados no México, em Cuba, na Venezuela, na República Dominicana, na Colômbia e no Brasil. Na África o país com maior número de casos é Madagascar e na Ásia a maioria dos casos registrados se concentra na China, sendo comum também no Japão, em Sri Lanka e na Índia (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SALGADO et al., 2004; VICENTE et al., 2008, 2013).

No Brasil os estados com maior número de casos são os da região amazônica, entre eles Maranhão e Pará. Porém, casos são descritos em outras regiões do país, como Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná

(QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SALGADO et al., 2004; SILVA et al., 1992; VICENTE et al., 2008, 2013).

Em regiões de clima úmido, como Brasil e China, a maioria das infecções é causada por espécies do gênero *Fonsecaea*, contudo, a diferenciação a nível de espécie só é possível a partir de identificação molecular. Um estudo realizado com 123 pacientes no Brasil utilizou sequenciamento multilocus e constatou a maior ocorrência de *F. pedrosoi* como agente causal de cromoblastomicose, seguido por *F. monophora* e *F. nubica* (GOMES et al., 2016; DE AZEVEDO et al., 2015).

Em regiões com clima semi-árido ou árido a infecção por *Cladophialophora carrionii* é a mais recorrente. Mundialmente existem relatos de outras espécies relacionadas com o desenvolvimento de cromoblastomicose, tais como algumas pertencentes aos gêneros *Phialophora*, *Rhinochrysiella*, *Cyphellophora* e *Exophiala* (GOMES et al., 2016; DE AZEVEDO et al., 2015; KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015).

Dentre as oito espécies do gênero *Fonsecaea* quatro são consideradas agentes causais de cromoblastomicose em humanos, sendo elas *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius*. *F. pedrosoi* é a espécie mais comumente encontrada na região das Américas Central e do Sul, enquanto *F. monophora* e *F. nubica* apresentam distribuição mundial. *F. pedrosoi* e *F. nubica* são relacionadas estritamente com o desenvolvimento de cromoblastomicose, enquanto que *F. monophora* e *F. pugnacius* apresentam certo grau de neurotropismo, podendo levar ao desenvolvimento da doença de forma disseminada para o cérebro e outros órgãos (GOMES et al., 2016; DE AZEVEDO et al., 2015; ROJAS et al., 2015).

Para a identificação das espécies do gênero *Fonsecaea* associadas a cromoblastomicose se faz necessária a utilização de ferramentas moleculares, devido a se tratarem de espécies indistinguíveis morfológicamente. A identificação das espécies relacionadas a essa doença possibilita a elucidação de questões ainda não completamente elucidadas como ocorrência ambiental, epidemiologia e rotas de infecção (VICENTE et al. 2008;2013; SUN et al., 2010; NAJAFZADEH et al., 2011b; ROJAS et al., 2015).

Sabe-se que o desenvolvimento da doença se dá após a inoculação do fungo a partir de um ferimento (inoculação traumática) com material ambiental contaminado, principalmente espinhos e lascas de madeira, contudo, ainda é necessário esclarecer as rotas envolvidas na dispersão desses agentes e os processos de infecção

envolvidos (DE AZEVEDO et al., 2015).

Diversos trabalhos têm objetivado o isolamento ambiental de espécies de leveduras negras, contudo grande parte das espécies isoladas não correspondem às espécies causadoras da cromoblastomicose. O isolamento de *F. pedrosoi* é ainda mais complexo do que o das demais espécies, sendo que alguns autores propõem a necessidade de animais vetores que carreguem a levedura até os locais de infecção. O conhecimento dos nichos ecológicos dessas espécies é fundamental para o esclarecimento da epidemiologia da cromoblastomicose (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; VICENTE et al., 2001; 2008, 2013).

Estudos têm demonstrado que alguns insetos apresentam simbiose com fungos, sendo possíveis carreadores desses micro-organismos. Schlick-Steiner et al. (2008) identificaram a associação de formigas do gênero *Lasius* e fungos das ordens Venturiaceae, Capnodiales e, inclusive, Chaetothyriales. Da mesma forma, em um estudo realizado por Mayer e Voglmayr (2009) com *Azteca brevis* foi possível isolar espécies de fungos pertencentes à ordem Chaetothyriales (VOGLMAYR et al., 2011). Attili-Angelis et al. (2014) descreve duas novas espécies do gênero *Phialophora*, *P. attae* e *P. capiguarae*, a partir do isolamento de leveduras negras do exoesqueleto de *Atta laevigata* e *A. capiguarae*, estabelecendo um novo micro-ambiente ocupado por leveduras negras do clado europaea. Sabe-se que os cupins também apresentam uma significativa simbiose com fungos, sendo que essa associação possibilita o aprimoramento do processo de degradação dos compostos vegetais (Aanen et al., 2002).

Segundo Teixeira et al. (2017) não é possível determinar diferenças no potencial de virulência de espécies ambientais e patogênicas, uma vez que os fatores de virulência foram expressos a partir da exposição das leveduras negras a condições ambientais adversas, como por exemplo a capacidade de se desenvolver em altas temperaturas e com baixa disponibilidade de nutrientes apresenta relação com a presença de leveduras negras em rochas ou como a habilidade de metabolizar compostos tóxicos desenvolvida a partir do hiperparasitismo de leveduras negras em líquens que produzem metabólitos tóxicos.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi isolar e identificar leveduras negras causadoras de cromoblastomicose de formigas, abelhas e cupins utilizando uma técnica de isolamento seletivo a fim de identificar um possível nicho ambiental dessas espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a presença de leveduras negras, principalmente de espécies consideradas agentes causais de cromoblastomicose, em formigas, abelhas e cupins coletados de áreas endêmicas para a doença.

2.2 ESPECÍFICOS

- Isolar leveduras negras de formigas, abelhas e cupins;
- Identificar as leveduras negras isoladas por meio de técnicas morfológicas e moleculares.

3 REVISÃO DE LITERATURA

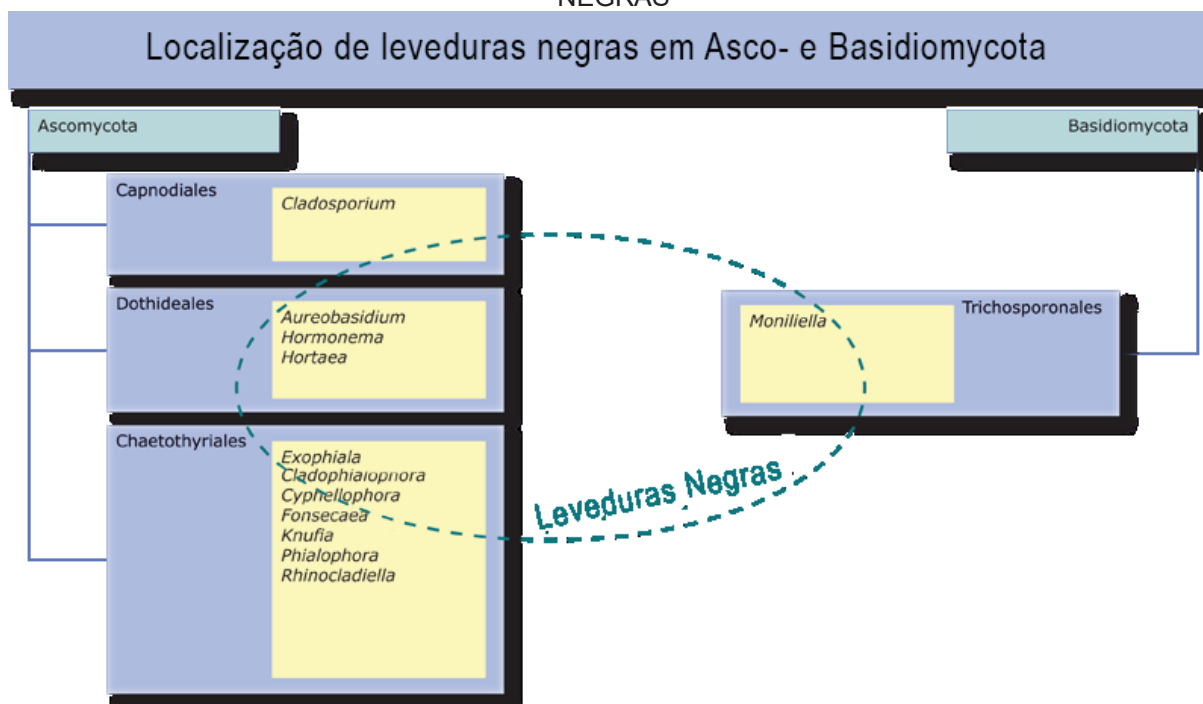
3.1 LEVEDURAS NEGRAS

Leveduras negras, também denominadas de fungos dematiáceos, são fungos filamentosos que apresentam células melanizadas e podem desenvolver uma fase leveduriforme em qualquer estágio do seu desenvolvimento (TEIXEIRA et al., 2017). Taxonomicamente pertencem aos filos Basidiomycota e Ascomycota, sendo que dentre os ascomicetos três ordens as englobam, Capnodiales, Dothideales e Chaetothyriales (FIGURA 1).

No filo Basidiomycota, as leveduras negras estão reunidas no gênero *Moniliella*, pertencente à ordem Trichosporonales, e são utilizadas na indústria devido a sua capacidade de fermentação e de degradação de lipídeos (THANH et al., 2012; DE HOOG et al., 2014), porém existe relato de espécies relacionadas com um caso de micose cutânea e um caso de micose sistêmica. Em cultura apresenta-se como uma colônia de crescimento restrito, de coloração creme passando a olivácea a preta e reverso amarelo claro a marrom oliváceo escuro, lisa passando a cerebriforme. Microscopicamente apresenta hifas hialinas, com cadeias acropetais em hifas não diferenciadas com conídios subhialinos a marrom (DE HOOG et al., 2014).

Na ordem Capnodiales o único gênero de levedura negra encontrado é o *Cladosporium*. Na ordem Dothideales são encontradas principalmente leveduras negras associadas a plantas, que muito raramente são consideradas patogênicas aos humanos. Já na ordem Chaetothyriales, principalmente na família Herpotrichiellaceae, diversas leveduras negras são consideradas patogênicas aos humanos, podendo causar uma grande variedade de doenças (DE HOOG et al., 2014).

FIGURA 1 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ORDENS E GÊNEROS DE LEVEDURAS NEGRAS



FONTE: Adaptado de DE HOOG et al. (2014).

Cladosporium, agrupado na ordem Capnodiales, é um gênero associado a plantas, podendo ser saprofítico ou patógeno. Diversas espécies são consideradas contaminantes em amostras clínicas, sendo raramente considerados oportunistas em humanos, e nestes casos, as principais espécies relacionadas são *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*. Macromorfológicamente é caracterizado por colônias de crescimento lento (14 a 21 dias), efusas, aveludadas ou lanosas, com coloração verde acinzentado a verde oliváceo. Apresenta conidióforo ereto, acastanhado, com formação simpodial e conídios acastanhados em cadeias ramificadas (DE HOOG et al., 2014; MENEZES; PÉREZ; LIMA, 2017).

Na ordem Dothideales apresentam-se três gêneros de leveduras negras, *Aureobasidium*, *Hormonema* e *Hortaea*. O gênero *Aureobasidium* agrupa fungos epifíticos que colonizam folhas de plantas e superfícies inertes. As colônias apresentam aspecto leveduriforme com crescimento rápido, coloração rósea e variados graus de melanização. Microscopicamente apresenta hifas hialinas, convertendo-se localmente em marrom escuro, conidiogênese síncrona, com brotamento abundante e endoconídios (DE HOOG et al., 2014). Enquanto que *Hormonema* reúne, na maioria, espécies patogênicas oportunistas de plantas, com um relato de agente causal de feohifomicose (COLDIRON; WILEY; RINALDI, 1990) e

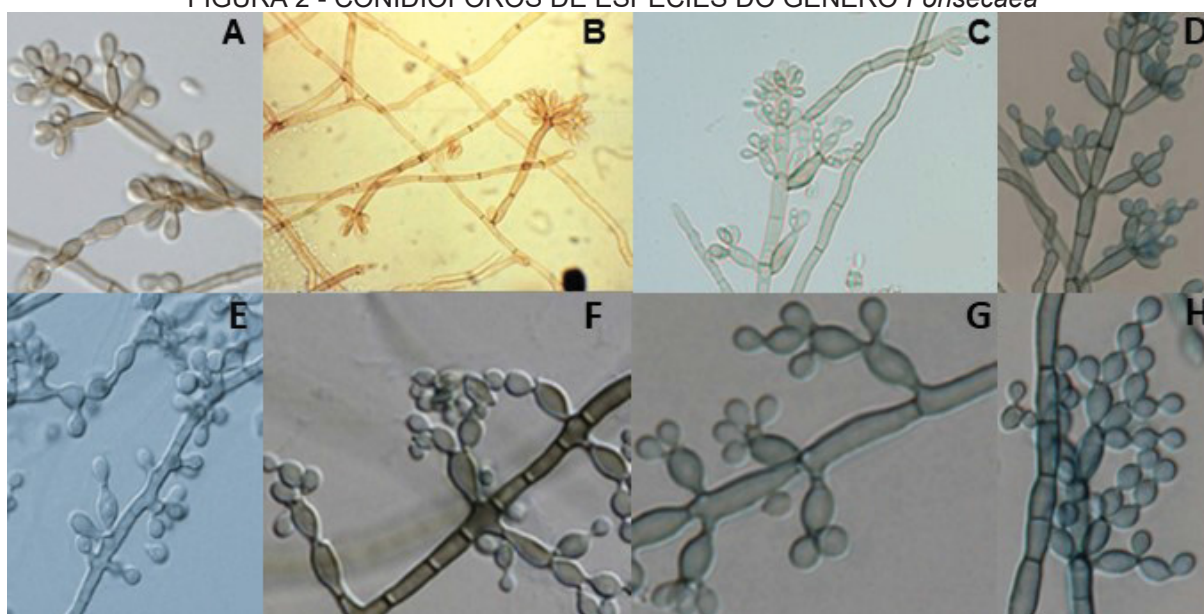
fungemia fatal (KENT et al., 1998). O aspecto macromorfológico das espécies deste gênero é de colônia lisa, inicialmente rosada passando a preto oliváceo com rápido crescimento. Micromorfológicamente apresenta hifas cenocíticas com ramificação dicotômica irregular quando em crescimento, quando maduras as hifas são septadas e largas, com conídios ao longo de hifas indiferenciadas, inicialmente hialinos tornando-se oliváceos (DE HOOG et al., 2014). As espécies do gênero *Hortaea* são relacionadas principalmente com o desenvolvimento de tinea nigra (BONIFAZ et al., 2008), além de um relato de isolamento de hemocultura de paciente neutropênico (NG et al., 2005). A presença destas espécies na pele humana normalmente está relacionada com colonização subclínica as quais em cultura desenvolvem colônias com crescimento lento, aspecto liso e viscoso, coloração preta olivácea, e micromorfológicamente, são caracterizadas por hifas largas, com septação abundante, acastanhadas e células conidiogênicas intercalares ou laterais com conídios elipsoides hialinos a oliváceo claro (DE HOOG et al., 2014).

Na ordem Chaetothyriales estão agrupados sete gêneros frequentemente reunindo espécies associadas a infecções em hospedeiros animais. O gênero *Exophiala* reúne além de espécies de origem ambiental aquelas que são relacionadas com micoses em hospedeiros humanos e animais. Em cultura essas espécies apresentam colônias inicialmente com centro viscoso e bordas lisas passando a aveludada ou lanosa com coloração preta olivácea. Microscopicamente apresentam células conidiogênicas intercalares, cilíndricas, com zonas de anelamento curtas ou muito curtas e estreitas, formando cadeias de células esféricas ou em forma de barril. Os conídios são sub-hialinos (DE HOOG et al., 2014; ZENG et al., 2007). Enquanto que o gênero *Cladophialophora* inclui diversas espécies relacionadas com infecções em humanos, inclusive causando infecções cerebrais, disseminadas e cutâneas. Algumas espécies são associadas a plantas vivas e consideradas sapróbias. As colônias apresentam crescimento lento, pulverulento a lanoso com coloração verde acinzentado a verde oliváceo. Micromorfológicamente não apresenta conidióforos, sendo as cadeias de conídios longas e pouco ramificadas. As cicatrizes formadas pela conidiogênese são pouco pigmentadas (DE HOOG et al., 2014).

Ainda na ordem Chaetothyriales, encontra-se o gênero *Fonsecaea* que é fortemente associado ao desenvolvimento de cromoblastomicose e de infecções disseminadas para o sistema nervoso central em hospedeiros humanos, com algumas espécies relatadas como agentes causais de infecção disseminada em caranguejo e

em gatos, além de espécies consideradas sapróbias de origem ambiental. Tais agentes, se desenvolvem em cultura como colônias de crescimento lento com aspecto aveludado ou algodinoso, com coloração olivácea. Os conidióforos são pouco diferenciados e com coloração variando de marrom claro a marrom escuro. Os conídios são simpodiais e se desenvolvem em cadeias ramificadas e curtas (FIGURA 2) (NAJAFZADEH et al., 2011a; VICENTE et al, 2012; VICENTE et al., 2013; DE HOOG et al., 2014; DE AZEVEDO et al., 2015; GOMES et al., 2016; VICENTE et al., 2017).

FIGURA 2 - CONIDIÓFOROS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Fonsecaea*



FONTE: Adaptada DE AZEVEDO et al. (2015), QUEIROZ-TELLES (2015), REVANKAR; SUTTON (2011), NAJAFZADEH et al. (2010), NAJAFZADEH et al. (2011a), VICENTE et al. (2012) e VICENTE et al. (2013). LEGENDA: (A) *F. pugnacius*. (B) *F. pedrosoi*. (C) *F. monophora*. (D) *F. nubica*. (E) *F. multimorphosa*. (F) *F. brasiliensis*. (G) *F. minima*. (H) *F. erecta*.

O gênero *Phialophora* é relacionado com infecções cutâneas e subcutâneas, como cromoblastomicose (ITO; IWATSU, 1985), micetoma (TURIANSKY et al., 1995) e feohifomicose (KIMURA et al., 2003) em humanos e em animais. Porém algumas espécies são consideradas estritamente ambientais. Em cultura as colônias se desenvolvem rapidamente, com aspecto lanoso a algodinoso e coloração acinzentada a quase preta. Micromorfológicamente podem ser encontrados conidióforos com fiáides em forma de frasco com colaretes distintos. Os conídios são hialinos ou acastanhados, ovalados, cilíndricos ou alongados com as extremidades arredondadas (DE HOOG et al., 2014). As espécies do gênero *Rhinochadiella* também são associadas a infecções cutâneas e subcutâneas, endoftalmite (LIU et al., 2015),

micetoma (DEVELOUX et al., 1994), cromoblastomicose (GOMES et al., 2016) e infecções cerebrais (TAJ-ALDEEN et al., 2010), com espécies isoladas a partir de madeira em decomposição. Em cultura as colônias se desenvolvem de maneira lenta em cultura, com aspecto aveludado, lanoso ou quase liso com coloração acinzentada, esverdeada ou marrom oliváceo. Os conidióforos são pouco diferenciados, normalmente ramificados e com coloração castanha clara a escura. As células conidiogênicas são intercaladas ou livres com cicatrizes despigmentadas. Os conídios são únicos ou em cadeias curtas, hialinos ou subhialinos (DE HOOG et al., 2014).

Recentemente foram descritos dentro desta ordem dois gêneros, *Cyphellophora*, em que algumas espécies são relatadas como causadoras de micoses cutâneas e subcutâneas em humanos e animais, inclusive de cromoblastomicose (GOMES et al., 2016). Em cultivo os fungos desse gênero desenvolvem-se como colônias de crescimento lento, com aspecto úmido e coloração cinza a preto oliváceo. Quanto a micromorfologia, apresentam hifas acastanhadas e sem conidióforos, com células conidiogênicas intercalares ou laterais com conídios em forma de foice acastanhados com 3 a 8 septos (DE HOOG et al., 2014; GOMES et al., 2016). O segundo gênero é denominado *Knufia*, a maioria de suas espécies são consideradas ambientais, contudo, *K. epidermidis* pode causar infecções cutâneas moderadas (LI et al., 2008). A morfologia destes agentes é caracterizada por colônias de crescimento lento, com aspecto aveludado e coloração marrom escuro a cinza oliváceo, com hifas de septação abundante e regular apresentando ramificações quase perpendiculares. Os conídios são elipsoidais ou esféricos com paredes lisas (LI et al., 2008; HE et al., 2013; DE HOOG et al., 2014).

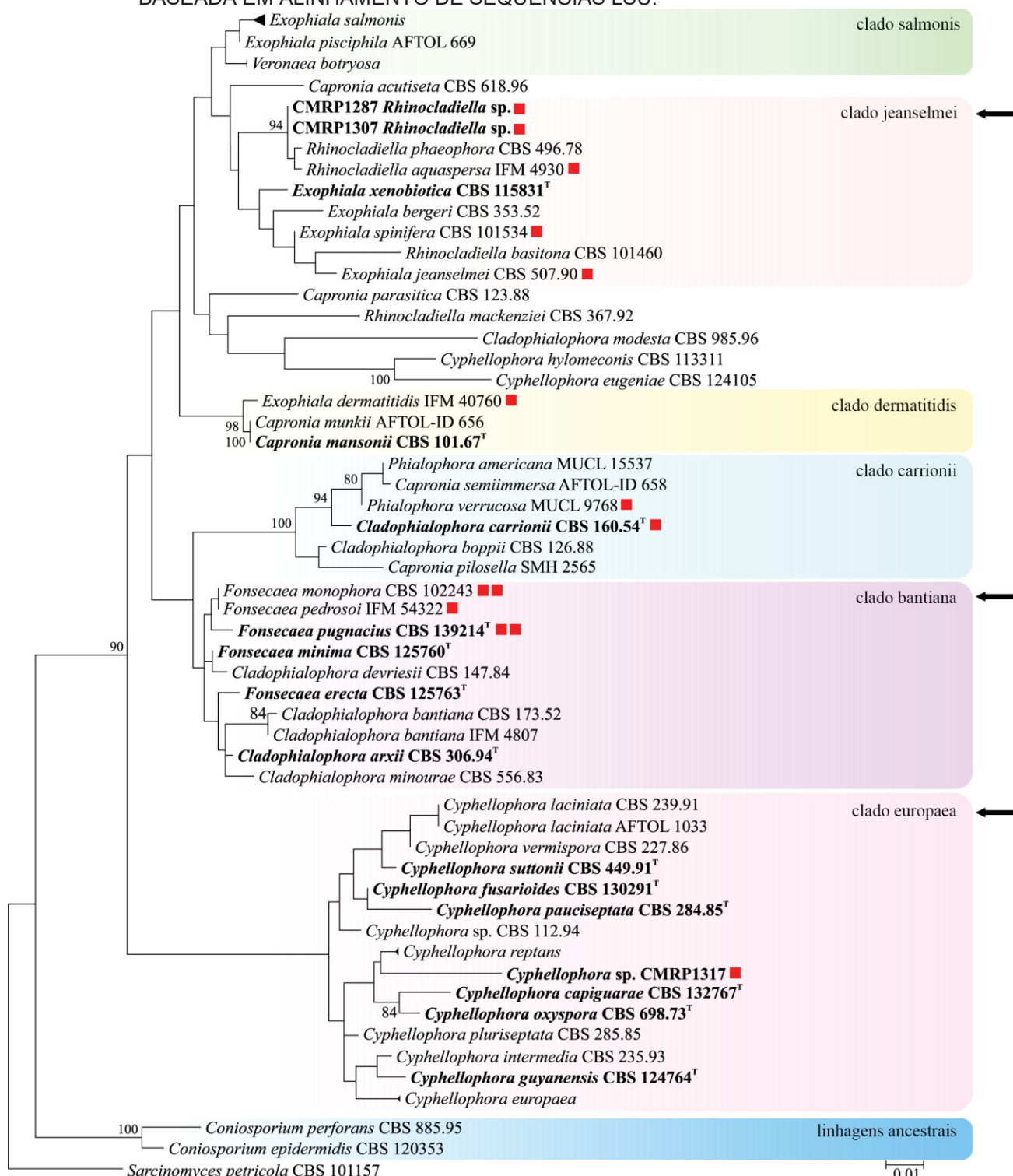
Na natureza leveduras negras apresentam distribuição mundial, sendo encontradas em regiões com clima tropical e sub-tropical, ambientes semi-áridos e desérticos, bem como em solos glaciais (NASCIMENTO, 2013; VICENTE et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017), sendo encontradas em diversos habitats. Estes agentes são considerados oligotróficos devido a capacidade de se desenvolver em baixas concentrações de nutrientes, além de se desenvolverem bem na presença de compostos aromáticos, altas temperaturas, radiação ultravioleta, estresse osmótico, entre outros. Supõem-se que devido à pouca habilidade de competitividade com outros micro-organismos ocupam microambientes considerados extremos, sendo isolados de madeira tratada com creosoto, além de ambientes contaminados com gasolina, petróleo e outros hidrocarbonetos, saunas, máquinas de

lavar, e também a partir de substratos vegetais, madeira, solo e matéria orgânica em decomposição (NASCIMENTO, 2013; 2017; VICENTE et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2017).

3.1.1 TAXONOMIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS NEGRAS DA ORDEM CHAETOTHYRIALES

No que diz respeito à ordem Chaetothyriales, as espécies de maior importância clínica são reunidas dentro das famílias Herpotrichiellaceae e Cyphellophoraceae e são distribuídas por toda a extensão da árvore filogenética, devido a se tratarem de espécies polifiléticas. Os gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Fonsecaea*, *Rhinoctadiella* e *Phialophora* pertencem à Herpotrichiellaceae enquanto que as espécies do gênero *Cyphellophora* se agrupam na família Cyphellophoraceae, conforme a árvore filogenética (FIGURA 3) mostrada por Gomes et al. (2016) (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; GOMES et al., 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

FIGURA 3 - FILOGENIA DE ESPÉCIES REPRESENTATIVAS NA ORDEM CHAETOTHYRIALES, BASEADA EM ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS LSU.



FONTE: Adaptado de GOMES et al. (2016). LEGENDA: Construída com Máxima Verossimilhança no MEGA 7. Valores de bootstrap >80% de 100 replicatas são mostrados nos ramos. As tarjas coloridas representam os complexos de espécies de acordo com de Hoog et al. (2011), Feng et al. (2012) e Vicente et al. (2013). Clados com espécies causadoras de cromoblastomicose analisadas no estudo de Gomes et al. (2016) são indicadas com setas. As *type strain* estão em negrito.

As espécies causadoras de cromoblastomicose são encontradas em cinco clados diferentes. No clado bantiana são agrupadas tanto as espécies de *Fonsecaea*

patogênicas para humanos (*F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius*) quanto para animais (*F. brasiliensis* e *F. multimorphosa*) e também as espécies ambientais (*F. erecta* e *F. minima*), sendo também incluídas nesse clado espécies patogênicas e ambientais do gênero *Cladophialophora* (*C. bantiana*, *C. arxii*, *C. devriesii* e *C. minourae*). No clado carrionii encontra-se *Cladophialophora carrionii*, principal agente causal de cromoblastomicose em regiões de clima árido e semi-árido, e *Phialophora verrucosa*, um agente associado a doença, porém de forma rara. No clado dermatitidis, *Exophiala dermatitidis* já foi relacionada com casos de cromoblastomicose e no clado europaea, *Cyphellophora ludoviensis*, que foi isolada a partir de lesões moderadas da doença. *Exophiala jeanselmei*, *E. spinifera*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *R. tropicalis* são agentes de cromoblastomicose agrupados no clado jeanselmei (GOMES et al., 2016; DE AZEVEDO et al., 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Atualmente a identificação de fungos é baseada em estudos filogenéticos que utilizam métodos de biologia molecular visando maior acurácia na identificação das espécies fúngicas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). De acordo com Schoch et al. (2012), ITS (do inglês *Internal Transcribed Spacer*) é a região mais indicada para identificação de fungos, sendo considerado o *barcode* para organismos desse reino. Contudo, devido a diversidade genética e a ancestralidade do reino Fungi pode ser necessário que mais de um marcador seja utilizado para identificação a nível de espécie. Para a distinção entre os gêneros *Fonsecaea* e *Phialophora* outros marcadores utilizados são fator de alongamento de tradução (*TEF1*) e β -tubulina (*BT2*). No que diz respeito a fatores de virulência alguns genes podem ser utilizados, como o Citocromo P450, que é relacionado com a síntese de melanina e com a degradação de hidrocarbonetos, bem como genes relacionados com a formação do citoesqueleto e com estágios do ciclo celular, entre eles actina (*ACT*), β -tubulina (*BT2*) e ciclo de divisão celular 42 (*Cdc42*), que apresentam relação com a formação de células muriformes (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Outras técnicas de biologia molecular, além de sequenciamento genético, têm sido desenvolvidas a fim de aprimorar a identificação de espécies filogeneticamente próximas. Uma dessas técnicas é a amplificação em círculo rolante (RCA – do inglês *Rolling Circle Amplification*), que consiste na amplificação isothermal de DNA com alta sensibilidade e especificidade que, em conjunto com a utilização de sondas cadeado, possibilita a diferenciação de espécies crípticas, uma

vez que torna possível a identificação de poliforfismos em um único nucleotídeo, bem como a quantificação do número de cópias do gene, complexos antígeno-anticorpo discretos e a expressão de RNAm em células individuais, devido a ligação da sonda ser altamente específica e com amplificação retida a posição de interesse no gene (FURUIE, 2014; NAJAFZADEH, 2011; QUEIROZ-TELLES, 2015).

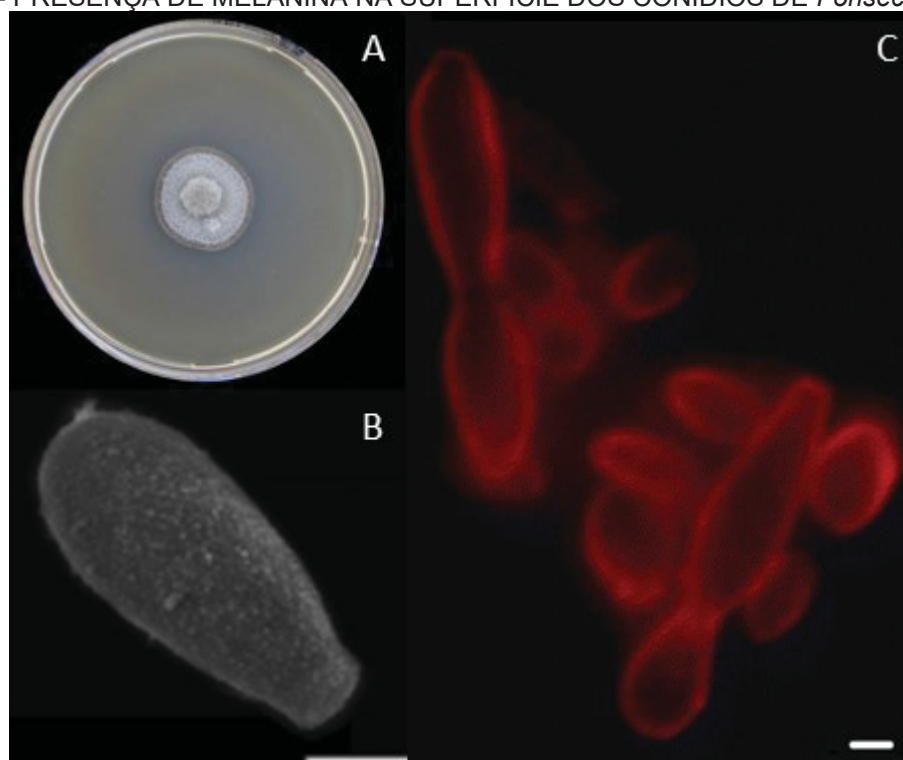
3.1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência das leveduras negras ainda não são bem esclarecidos, contudo sabe-se que membros da ordem Chaetothyriales apresentam significativa predisposição ao crescimento em tecidos humanos, sendo que grande parte das espécies desta ordem são agentes etiológicos de infecções em vertebrados, afetando tanto indivíduos imunodeprimidos quanto imunocompetentes. Estão relacionados com uma variedade de doenças, com quadros clínicos diversos, afetando a nível superficial (cutâneo, córneo e ungueal), subcutâneo ou sistêmico (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; VICENTE et al., 2013).

3.1.2.1 MELANINA E CAROTENÓIDES

Dentre os fatores de virulência de leveduras negras conhecidos um dos principais é a presença de melanina e carotenóides na parede celular fúngica (FIGURA 4), sendo a melanina responsável pela coloração castanha característica dessas leveduras. Esses pigmentos são importantes no que diz respeito a virulência e patogenicidade, porém não apresentam influência na capacidade de crescimento e desenvolvimento do fungo (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; VICENTE et al., 2017).

FIGURA 4 - PRESENÇA DE MELANINA NA SUPERFÍCIE DOS CONÍDIOS DE *Fonsecaea pedrosoi*



FONTE: Adaptado de SANTOS et al. (2007); DE HOOG et al. (2014). LEGENDA: (A) Aspecto da colônia de *F. pedrosoi*. (B) Conídio de *F. pedrosoi*. (C) Anticorpos policlonais com fluorescência se ligam a melanina presente na parede celular dos conídios.

A partir da análise genômica de *Fonsecaea* spp. foi possível determinar que nesse gênero de leveduras negras ocorre a formação de melanina a partir de três vias distintas e conservadas, sendo elas DNH-melanina, DOPA-melanina e a via da degradação da L-tirosina (VICENTE et al., 2017).

A presença de melanina é um fator de virulência descrito para outros grupos de fungos patogênicos, como *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e *Cryptococcus neoformans*. Sua importância se dá por seu papel na proteção contra o sistema imune do hospedeiro. Supõe-se que essa habilidade é conferida devido (I) ao bloqueio da ação de enzimas proteolíticas na parede celular; (II) a eliminação de radicais livres, derivados de oxigênio e nitrogênio, liberados durante o estresse oxidativo resultante da fagocitose; e (III) ao efeito inibitório na fagocitose mediada por receptor, alterando a produção de ácido nítrico (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

A melanina também tem função importante no processo de infecção, uma vez que está envolvida na diferenciação em corpos muriformes e na proteção contra antifúngicos (VICENTE et al., 2017).

Outros pigmentos relacionados com a virulência de leveduras negras são os carotenóides, especificamente toruleno e torularrodina, que atuam blindando moléculas sensíveis e em organelas (SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

3.1.2.2 QUITINA SINTASE

A quitina é um componente da parede celular dos fungos, formada por cadeias longas de n-acetilglicosamina, que tem papel importante no estabelecimento da estrutura e na diferenciação celular, podendo se remodelar durante os processos de crescimento e de esporulação (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Segundo Sterflinger (2006), leveduras negras e fungos meristemáticos apresentam maior quantidade de quitina do que de manose e glicose em suas paredes celulares.

As quitinas sintases (CHS) são relacionadas com a citocinese (CHS1), a síntese de septos (CHS2) e a formação da cicatriz do brotamento (CHS3), sendo os genes relacionados com a codificação dessas enzimas conservados em *F. pedrosoi* (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A partir de estudos com *E. dermatitidis* foi possível purificar e identificar a quitina-sintase V, fortemente relacionada com a capacidade de crescimento em altas temperaturas, o que é sabidamente um fator de virulência (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Em *F. pedrosoi*, componentes semelhantes à quitina atuam inibindo a dectina-1, considerada o principal receptor de superfície dos macrófagos, dessa forma contribuindo para a cronicidade da cromoblastomicose, uma vez que os conídios são internalizados, porém não há ativação do macrófago nem a secreção de citocinas pró-inflamatórias (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2017).

3.1.2.3 CORPOS MURIFORMES

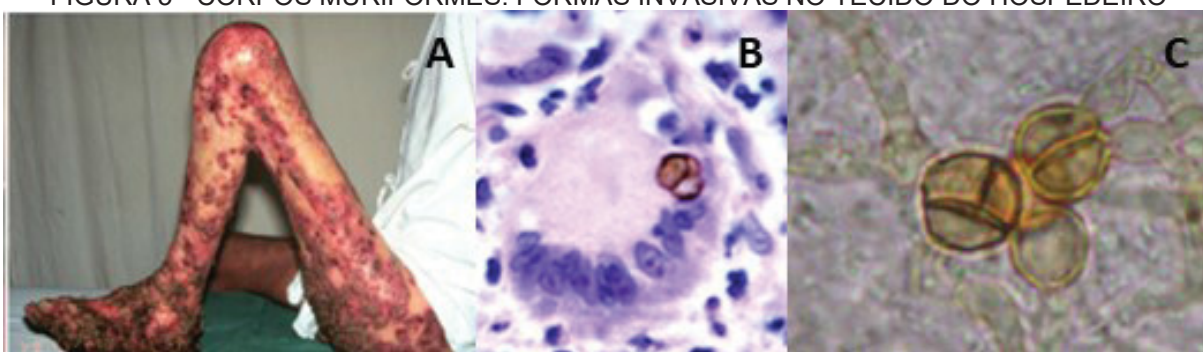
A presença de corpos muriformes no tecido do hospedeiro é considerada a principal característica diagnóstica associada à cromoblastomicose, sendo o que a distingue de outras doenças causadas por leveduras negras, como feohifomicose e micetoma (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

As células muriformes são formadas em condições de estressantes como baixas ou altas temperaturas, pouca disponibilidade de água e de nutrientes, acidez,

alta osmolaridade, entre outros (SEYEDMOUSAVI et al., 2014). No tecido do hospedeiro são consideradas formas invasivas e de evasão do sistema imune devido à resistência à fagocitose, o que caracteriza o início da cronicidade da doença (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2017).

Morfologicamente apresentam crescimento meristemático com aumento isodiamétrico de volume, engrossamento da parede celular com deposição de melanina e formação de septos cruzados (FIGURA 5) (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; CASTRO et al., 2017).

FIGURA 5 - CORPOS MURIFORMES: FORMAS INVASIVAS NO TECIDO DO HOSPEDEIRO



FONTES: Adaptado de QUEIROZ-TELLES et al. (2017). LEGENDA: (A) Lesão em membro inferior de paciente com cromoblastomicose. (B) Exame histopatológico de lesão com corpo muriforme no interior de uma célula de Langerhans. (C) Raspado de lesão de paciente com cromoblastomicose em que se observam corpos muriformes caracterizados por células pigmentadas com parede celular espessa e septação longitudinal e transversal.

Segundo Siqueira et al. (2017), a capacidade de alternar entre diferentes formas é um importante fator de virulência, uma vez que essa habilidade permite a sobrevivência do patógeno no tecido do hospedeiro.

3.1.2.4 FASE LEVEDURIFORME

Algumas leveduras negras, principalmente pertencentes ao gênero *Exophiala*, possuem a capacidade de alternância entre estados filamentosos e leveduriformes, o que consiste uma importante habilidade no que concerne a virulência (SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

Leveduras negras são conhecidas como causadoras de micoses cutâneas e subcutâneas, porém somente algumas espécies são relacionadas com o desenvolvimento de micoses disseminadas, como *C. bantiana* (REVANKAR, 2011), *F. pugnacius* (de AZEVEDO et al., 2015) e *F. monophora* (KOO; KLOMPAS; MARTY,

2010). Essa capacidade parece ter relação com a presença de fase leveduriforme, o que possibilita a disseminação hematogênica do fungo para outros órgãos (SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

3.1.2.5 TERMOTOLERÂNCIA

A capacidade de crescer em altas temperaturas é um dos principais fatores de virulência associados a leveduras negras, já que parece existir uma relação entre as temperaturas ótima e máxima de crescimento e a ocorrência de lesão cutânea, subcutânea ou disseminada (TABELA 1) (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

TABELA 1 – DIFERENTES TEMPERATURAS DE CRESCIMENTO E TIPOS DE LESÃO.

Temperatura	Levedura negra	Tipo de infecção
42°C a 45°C	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Em pássaros ou morcegos
40°C	<i>Cladophialophora bantiana</i>	Disseminada
37°C ou mais	Clado bantiana	Sistêmica ou disseminada
	Clado dermatitidis Clado jeanselmei	
35°C a 37°C	Clado carrionii	Subcutânea, cutânea ou superficial
	Clado europeae	

FONTE: Adaptado de Seyedmousavi et al. (2014) e Queiroz-Telles et al. (2017).

3.1.2.6 HIDROFOBIA E ADERÊNCIA

Algumas leveduras negras apresentam polissacarídeos extracelulares hidrofílicos que parecem ter um papel importante na aderência às células do hospedeiro. Essa aderência é importante pois precede a internalização do patógeno, o que auxilia no processo de evasão do sistema imune (SANTOS et al., 2007; SEYEDMOUSAVI et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Sabe-se que conídios *Fonsecaea pedrosoi* expressam adesinas de superfície lectina-like com afinidade a manose, envolvidos na adesão inicial a célula do hospedeiro, e N-acetilglicosamina, para internalização do fungo. É interessante que a expressão dos sítios de ligação a manose e N-acetilglicosamina é maior quando o

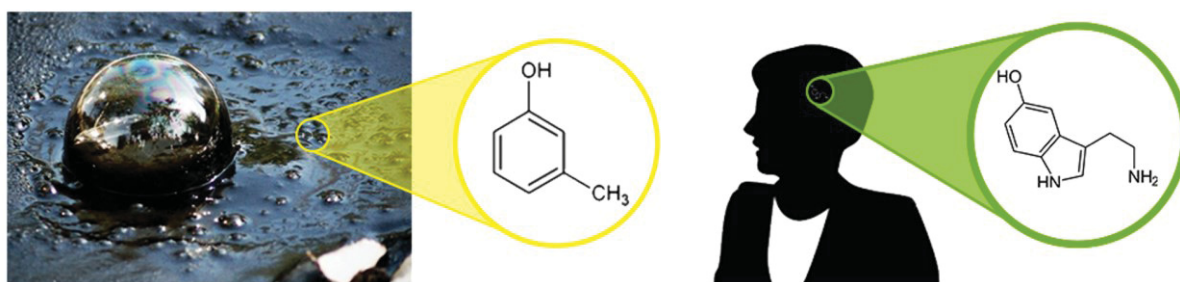
fungo é cultivado a 37°C do que quando a 28°C, indicando uma superexpressão durante a infecção (SANTOS et al., 2007).

Além disso, algumas espécies patogênicas, como *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, *Exophiala dermatitidis*, e *Exophiala spinifera*, produzem conídios aderentes, que podem aderir à superfície corporal de vetores, como artrópodes ou invertebrados. Tanto a hidrofobia como a aderência são fatores que influenciam na fixação dos propágulos às células epiteliais do hospedeiro, processo importante para a diferenciação em corpos muriformes (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

3.1.2.7 ASSIMILAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS DE CARBONO

Leveduras negras, principalmente pertencentes aos gêneros *Exophiala* e *Cladophialophora*, apresentam a capacidade de metabolizar hidrocarbonetos através do citocromo P450 (NASCIMENTO et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Essa característica constitui um importante fator de virulência devido à semelhança estrutural entre compostos aromáticos de carbono e neurotransmissores (FIGURA 6), o que pode influenciar na predileção desses fungos ao sistema nervoso central (SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

FIGURA 6 - HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS



FONTE: A Autora (2018). LEGENDA: Comparação entre a estrutura química do creosol, presente no creosoto, e da serotonina, neurotransmissor presente no sistema nervoso central.

3.1.2.8 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS E DE SIDERÓFOROS

Metabólitos secundários ácidos ou alcalinos e sideróforos podem ser produzidos por leveduras negras, o que parece ter relação com o aumento da virulência. Um exemplo é a presença de *Exophiala dermatitidis* em muco de pulmão de pacientes com fibrose cística, um ambiente caracterizado pela alta concentração

de sais, e também o neurotropismo que essa espécie apresenta, uma vez que o sistema nervoso central apresenta grande concentração de ferro livre, o que estimula a produção de sideróforos (SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

3.3 CHAETOTHYRIALES AGENTES DE DOENÇA EM HUMANOS

Diversas espécies de leveduras negras da ordem Chaetothyriales podem levar ao desenvolvimento de feohifomicose, micetoma e cromoblastomicose, sendo que a característica diagnóstica que as difere é a forma encontrada no tecido do hospedeiro. Na cromoblastomicose são encontrados corpos muriformes, enquanto que na feohifomicose são encontradas hifas, pseudo-hifas ou em fase leveduriforme e no micetoma são observados grânulos negros com hifas distorcidas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Quanto ao estado imunológico dos pacientes, na cromoblastomicose normalmente são indivíduos imunocompetentes (DE AZEVEDO et al., 2015), enquanto que a feohifomicose normalmente acomete indivíduos imunossuprimidos, devido a terapia com corticoides, pacientes de transplante ou HIV-positivo (PARENTE et al., 2011), e aparentemente nos casos de micetoma existe uma grande relação entre o comprometimento da imunidade celular do indivíduo e o desenvolvimento da doença (ZIJLSTRA et al., 2016).

Corpos muriformes são células pigmentadas devido à presença de melanina na espessa parede celular e são divididas por septos longitudinais e transversais. Acredita-se que no ambiente, os agentes etiológicos da cromoblastomicose sejam encontrados na forma micelial, mudando sua morfologia para corpos muriformes no tecido, sendo essa forma altamente resistente (KHAN et al., 2015; NAJAFZADEH, 2011c; QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Segundo Queiroz-Telles (2015), a cromoblastomicose é a mais comum dentre as micoses causadas por fungos dematiáceos, sendo majoritariamente causada por *Fonsecaea pedrosoi*, em áreas úmidas, e *Cladophialophora carrionii*, em locais com clima semi-árido. Além dessas espécies também existem relatos de cromoblastomicose causada por *F. monophora*, *F. nubica*, *F. pugnacius*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *R. similis*, *R. tropicalis*, *Exophiala spinifera*, *E. dermatitidis*, *E. jeanselmei* e *Cyphellophora ludoviensis* (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; DE AZEVEDO et al., 2015; GOMES et al., 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; HEIDRICH et al., 2017).

São conhecidas quatro espécies de *Fonsecaea* que afetam humanos, *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius*, sendo *F. pedrosoi* mais frequente na América Central e do Sul enquanto *F. monophora* e *F. nubica* apresentam distribuição mundial. Casos de disseminação para tecido cerebral e para outros órgãos têm sido relatados para *F. monophora* e *F. pugnacius* foi isolada a partir de um caso de cromoblastomicose disseminada para o cérebro (DE AZEVEDO et al., 2015; KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; ROJAS et al., 2015; GOMES et al., 2016).

A prevalência da cromoblastomicose é mundial, contudo existe maior número de casos relatados nas zonas tropicais e subtropicais (latitude entre 30° N e 30° S), com maior prevalência nos países México, Cuba, Venezuela, República Dominicana, Colômbia, Índia, Austrália e Brasil (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Quanto aos sintomas clínicos, após a inoculação transcutânea ocorre um período de incubação por tempo desconhecido, seguido de uma lesão primária com pápula eritematosa ou crescimento verrucoso, aumentando de tamanho e assumindo várias formas, podendo espalhar-se através do sistema linfático e em consequência da auto inoculação devido ao ato de coçar. Normalmente a infecção ocorre nos membros inferiores ou superiores, mas pode ocorrer em todo o corpo, sendo registrados casos nas nádegas, tronco e face. A progressão da doença é lenta, sendo que entre a infecção e o diagnóstico podem se passar aproximadamente 10 anos. Inicialmente assintomática, a lesão não interfere com o desenvolvimento de atividades do paciente, porém com o tempo pode ocorrer prurido intenso e dor localizada. São conhecidas cinco formas clínicas, nodular, tumoral, verrugosa, cicatricial e com formação de placa (FIGURA 7) (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

FIGURA 7 - FORMAS CLÍNICAS DA CROMOBLASTOMICOSE



FONTE: QUEIROZ-TELLES et al. (2017). LEGENDA: (A) Lesão inicial. (B) Lesão nodular. (C) Lesão tumoral. (D) Lesão cicatricial com contorno verrucoso. (E) Lesão verrucosa com hiperqueratose. (F) Lesão em placa.

A doença pode ser classificada em três formas de acordo com sua severidade: forma leve, com um único nódulo ou lesão, menor do que 5 cm de diâmetro; forma moderada, uma ou mais lesões tumorais, verrugosas ou com placas com menos de 15 cm de diâmetro, cobrindo uma ou duas regiões adjacentes; e forma severa, em que estão presentes uma ou várias formas de lesão cobrindo uma área extensa da pele, próximas ou em áreas afastadas (FIGURA 8). Com o agravamento da doença podem ocorrer edema e infecções bacterianas secundárias, podendo, em casos mais severos, causar linfedema, anilose e carcinomas de células escamosas não-invasivos (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

FIGURA 8 - GRAUS DE SEVERIDADE DAS LESÕES DE CROMOBLASTOMICOSE



FONTE: QUEIROZ-TELLES et al. (2017). LEGENDA: (A) Forma leve. (B) Forma moderada. (C) Forma severa.

O diagnóstico da cromoblastomicose se dá a partir de dados clínicos e epidemiológicos em áreas endêmicas, sendo confirmado pela observação de corpos muriformes no tecido através de microscopia de raspado de pele ou de biópsia. Os corpos muriformes se multiplicam por divisão planar e raramente por brotamento, o que é mais relacionado com a feohifomicose (KHAN et al., 2015; KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

A cromoblastomicose apresenta baixas taxas de cura e altos índices de recorrência, principalmente em infecções crônicas e extensas. Diversos fatores contribuem para a dificuldade do tratamento, que é dependente do agente etiológico, do tamanho, extensão e localização da lesão, da ocorrência de infecções secundárias, entre outros. Ainda não existe um padrão ouro de tratamento, que normalmente consiste do uso de antifúngicos sistêmicos – em monoterapia ou combinados –, métodos físicos – cirurgia, termo, laser ou fototerapias – e uso de adjuvantes imunológicos. Acredita-se que *Fonsecaea* spp. sejam menos sensíveis a antifúngicos do que *C. carrionii* (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

3.4 ORIGEM AMBIENTAL DA CROMOBLASTOMICOSE

Apesar de as leveduras negras serem encontradas em ambientes de todo o mundo, o nicho ecológico de diversas espécies ainda é desconhecido. A determinação do nicho ambiental envolvido com as espécies patogênicas para humanos é fundamental para o estabelecimento da patogênese da infecção (VICENTE et al., 2008; KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014).

A dificuldade de isolamento de leveduras negras do ambiente pode estar relacionada com o oligotrofismo associado a essas espécies, uma vez que se desenvolvem em ambientes com baixa competitividade, pouca disponibilidade de nutrientes, altas temperaturas e osmolaridade, radiação ultravioleta (UV) e, até em presença de hidrocarbonetos (NASCIMENTO, 2013; PRENAFETA-BOLDU; SUMMERBELL; HOOG, 2006; TEIXEIRA et al., 2017; VICENTE et al., 2008).

Acredita-se que o desenvolvimento da cromoblastomicose se dê após inoculação traumática com material ambiental contaminado, o que pode ser reforçado pela presença de fragmentos de vegetais no local da lesão e também por ser possível observar material vegetal no exame histológico de alguns pacientes (SAUNTE et al., 2011; VICENTE et al., 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Diversos autores identificaram a presença de leveduras negras em amostras ambientais, contudo tais espécies dificilmente são as encontradas em amostras clínicas, sendo consideradas estritamente ambientais. Em um estudo realizado por Vicente et al. (2013) foi possível isolar leveduras negras do gênero *Fonsecaea* de material ambiental em decomposição, contudo, quando comparadas molecularmente com linhagens tipo, somente duas foram identificadas como *F. pedrosoi* e uma como *F. monophora*, o que levanta a questão do por que a infecção, sendo um processo aleatório, está mais relacionada à *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*, sendo que as espécies ambientais são mais abundantes na natureza (SAUNTE et al., 2011; VICENTE et al., 2013).

Acredita-se que *F. monophora* é mais facilmente isolada do ambiente, quando comparada a *F. pedrosoi*, que normalmente apresenta um isolamento mais complexo, requerendo condições especiais, como habitats dinâmicos e/ou a necessidade de um animal vetor, porém tais condições ainda não estão bem esclarecidas (VICENTE et al., 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Da mesma forma, de Hoog et al. (2007) analisaram isolados de cactos *Stenocereus griseus* e observaram por análise molecular que as amostras clínicas se tratavam de *C. carrionii*, enquanto que as isoladas de plantas vivas eram um análogo ambiental, *C. yegressi*, morfológicamente indistinguível de *C. carrionii*. Em raras ocasiões foi possível isolar *C. carrionii* do ambiente, contudo somente a partir de material vegetal em decomposição (VICENTE et al., 2013).

Salgado et al. (2004) relatam um caso em que foi possível isolar *F. pedrosoi* de espinhos de *Mimosa pudica* relacionado com a infecção de uma paciente, todavia a identificação foi feita somente a partir de micromorfologia e não foi possível isolar a levedura nos demais espinhos colhidos de *Mimosa pudica* de outros locais. Os autores atribuem esse resultado a ocorrência de um reservatório para *F. pedrosoi*, sendo necessários mais estudos para elucidar as vias de disseminação e os nichos ecológicos destas leveduras negras, assim contribuindo para o esclarecimento da patogênese da cromoblastomicose (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SALGADO et al., 2004; VICENTE et al., 2008, 2013).

3.5 INSETOS SOCIAIS

Formigas, abelhas, cupins e vespas são considerados insetos sociais devido às características de organização das colônias e são classificados como insetos eusociais, o nível mais avançado de existência colonial (OSTER; WILSON, 1978; Wilson; Hölldobler, 2005).

Segundo Ribeiro (2009) a eusociabilidade parece decorrer da existência de uma necessidade que não pode ser suprida por um único indivíduo, como a vivência em ninhos ou a manutenção de um território, e também pelo desenvolvimento de atividades que consumam grande parte do tempo, como a procura por alimentos, impedindo a execução de outras tarefas, por exemplo, o cuidado com a prole.

As principais características que definem os insetos sociais são (I) a presença de castas entre os membros da colônia, (II) a divisão de trabalho baseada nas castas e (III) a coordenação e a integração das atividades desenvolvidas (OSTER; WILSON, 1978). Entre os eusociais, ainda se especifica que as colônias possuam membros adultos pertencentes a duas ou mais gerações sobrepostas, além do cuidado

cooperativo com as formas mais jovens e a divisão em castas reprodutivas e não-reprodutivas ou menos reprodutivas (Wilson; Hölldobler, 2005).

3.5.1 FORMIGAS

As formigas (Hymenoptera: Formicidae) representam um dos grupos mais diversos, com mais de 17 mil espécies descritas, sendo que se acredita que isso represente apenas metade da diversidade mirmecológica do planeta. As formigas são encontradas em quase todo o planeta, com exceção dos pólos (VINHA, 2007).

Além de sua importância em termos de abundância de espécies, formigas também possuem grande significância em termos de biomassa, sendo que na Amazônia sua biomassa é maior do que a de todos os pássaros, mamíferos, anfíbios e répteis somados, podendo até ser comparada a de humanos (FRIZZO, 2016).

Formigas também são fundamentais no que diz respeito à importância ecológica, uma vez que atuam como predadoras de outros insetos, inclusive de pragas agrícolas, como polinizadoras, além de reciclarem nutrientes do solo e fazer a dispersão de sementes, entre outras (VINHA, 2007; FRIZZO, 2016).

Dentre a grande variedade de formigas, existem as chamadas formigas cortadeira, pertencentes à tribo Attini (Myrmicinae). Essas formigas são encontradas em regiões tropicais das Américas, desde os Estados Unidos até a Argentina (COSTA, 2013; MOREIRA, 2013).

As formigas cortadeiras englobam 13 gêneros e 215 espécies, sendo que os gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) são considerados os mais importantes já que apresentam grande influência econômica, uma vez que são os herbívoros dominantes na região neotropical e são consideradas pragas agrícolas devido a sua grande capacidade de corte de folhas e ramos tenros durante todo o ano, bem como à sua capacidade de propagação em áreas antes não ocupadas (VINHA, 2007; COSTA, 2013; FRIZZO, 2013).

No gênero *Atta*, a espécie *A. laevigata* (FIGURA 9) ocupa extensas áreas na América do Sul, sendo encontrada na Colômbia, Venezuela, Guiana, Bolívia, Paraguai e nas cinco regiões do Brasil, com exceção de apenas alguns estados (FIGURA 9) (VINHA, 2007).

FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA de *Atta laevigata* NA AMÉRICA DO SUL.

FONTE: Adaptado de VINHA (2007) e DE BRITTO et al. (2016).

3.5.2 ABELHAS

Assim como as formigas, as abelhas (Hymenoptera: Apidae) apresentam uma enorme diversidade de espécies, sendo já descritas 25.000 espécies e acredita-se que muitas ainda não foram descritas. No Brasil, devido às proporções continentais e a riqueza de ecossistemas, estima-se que existam 1.576 nomes válidos ou mais, sendo a maioria representada por meliponídeos (MORETTI, 2014; NEIVA, 2015; MACEDO, 2016).

Ao contrário da maioria das espécies de animais, a abundância das abelhas parece aumentar conforme a distância do equador aumenta. Na América do Sul é observado que a diversidade aumenta a partir da região do cerrado em direção às regiões semidesérticas da Argentina. Acredita-se que isso tenha relação com os níveis de chuvas, uma vez que grande parte das espécies constrói seus ninhos no solo, e

dessa forma, em regiões mais úmidas, pode ocorrer o crescimento exacerbado de fungos e até o afogamento das larvas (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Os meliponídeos, também chamados de abelhas sem ferrão, são considerados os principais polinizadores, sendo responsáveis pela polinização de sistemas naturais, como na reprodução de angiospermas, mantendo a biodiversidade local, e também de sistemas agrícolas, aumentando a produção de muitas plantações (MORETTI, 2014; NEIVA, 2015; VEIGA, 2015; NETO, 2016; MACEDO, 2016).

Os meliponídeos se distribuem por regiões tropicais e subtropicais, sendo o gênero *Melipona* (FIGURA 10) específico de regiões neotropicais (COSTA, 2008; MACEDO, 2016). Dentre o gênero *Melipona*, a espécie *Melipona flavolineata* Friese, 1900, conhecida como uruçú-amarela, apresenta distribuição restrita ao Brasil, especificamente nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins (VEIGA, 2015).

Scaptotrigona postica Latreille, 1804 também pertence à tribo Meliponini e ao gênero *Scaptotrigona* (FIGURA 10) e apresenta ampla distribuição no Brasil, principalmente São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná. Conhecida como “Mandaguari” ou “canudo” tem papel importante na polinização de espécies nativas (MACEDO, 2016).

FIGURA 10 - MORFOLOGIA DE *Melipona* sp. E *Scaptotrigona* sp.



FONTE: Anthophila- an online repository of bee diversity (disponível em <http://apoidea.myspecies.info/taxonomy/term/1889> e em <http://apoidea.myspecies.info/taxonomy/term/1976>). LEGENDA: (A) *Melipona* sp. (B) *Scaptotrigona* sp.

3.5.3 CUPINS

Cupins pertencem à ordem Isoptera, que inclui sete famílias, das quais quatro são encontradas no Brasil, entre elas a família Termitidae, considerada a família dos cupins superiores devido a ocorrência de colônias muito populosas, com ninhos elaborados e castas bem definidas, capacidade de degradação de celulose devido a presença de bactérias, além da utilização de outras fontes de alimento além de madeira, como detritos vegetais, húmus, fezes e, algumas vezes, de fungos cultivados no interior da colônia. São considerados um dos invertebrados dominantes em ambientes terrestres tropicais, mas também são encontrados em zonas temperadas e até desérticas (ELEOTÉRIO, 2000; SILVA, 2008; OLIVEIRA, 2011; GIOVANELLA, 2013).

Estima-se que existam aproximadamente 3 mil espécies descritas, sendo que no Brasil são encontradas cerca de 68 gêneros e 300 espécies (VASCONCELLOS, 2003; SILVA, 2008; SANTOS, 2016).

Das espécies encontradas no Brasil, 22 são consideradas pragas urbanas, 34 agrícolas e 12 tanto urbanas quanto agrícolas. Apesar do grande prejuízo causado por infestações de cupins, os cupins também exercem importante papel na decomposição e reciclagem de matéria orgânica, além de influenciar a estrutura dos solos devido a sua grande diversidade de grupos alimentares e sua abundância (VASCONCELLOS, 2003; SILVA, 2008; HAIFIG, 2013).

Nasutitermes (Termitidae: Nasutitermitinae) (FIGURA 12), um gênero de cupim arbícola, é considerado o mais diversificado em número de espécies, representando, segundo Constantino (1998; 2002), 54% das espécies de cupins (VASCONCELLOS, 2003; SILVA, 2008; ALMEIDA, 2016). Esse gênero ataca madeiras moles e duras, secas, úmidas, manufaturas ou não (ELEOTÉRIO, 2000; VASCONCELLOS, 2003; SILVA, 2008). No Brasil são encontrados em árvore de matas tropicais, na caatinga e no cerrado, bem como em residências, devido à invasão e destruição de seu habitat natural (SILVA, 2008).

FIGURA 11 – NINHO E MORFOLOGIA DE *Nasutitermes* sp.

FONTE: Adaptado de GOMES (2010) e The biodiversity of Singapore – a digital reference collection for Singapore's biodiversity (disponível em <https://singapore.biodiversity.online/species/A-Arth-Hexa-Blattodea-000044>). LEGENDA: (A) Ninho de *Nasutitermes* sp. (B) Vista interna do ninho. (C) Morfologia de *Nasutitermes* sp.

3.5.4 INSETOS CARREADORES DE FUNGOS

A relação entre fungos e insetos pode ser considerada tanto antagonista como simbiote, uma vez que diferentes organismos convivem de forma mutualística, sendo que existem relatos de que essa associação foi originada há aproximadamente 50 milhões de anos (LITTLE; CURRIE, 2007; MORENO et al., 2015).

De acordo com Caldera et al. (2009), o mutualismo era considerado raro e de pequena importância, contudo nos últimos anos passou a ser reconhecido por sua influência na evolução de diversas formas de vida, como no caso da simbiose entre micro-organismos e insetos que proporciona melhora nos aspectos nutricionais e de proteção contra predadores, parasitas e patógenos.

Segundo Reis et al. (2015), o cultivo de fungos surgiu independentemente em formigas, cupins e besouros, sendo que a principal função era obter nutrientes. No caso da relação entre formigas e fungos, sabe-se que mecanismos de defesa foram desenvolvidos pelas formigas a fim de manter a colonização fúngica, como comportamentos de higiene que impedem a colonização de micro-organismos estranhos e a gestão dos resíduos que podem trazer algum prejuízo para os fungos de interesse (LITTLE; CURRIE, 2008).

Um estudo realizado por Schlick-Steiner et al. (2008) com formigas do gênero *Lasius* buscou investigar a associação e a transmissão de fungos pelas formigas e foi observado que algumas espécies de fungos estão associadas, formando um complexo que inclui Venturiaceae, Capnodiales e Chaetothyriales, sendo os fungos da família Venturiaceae considerados simbiotes enquanto os das ordens Capnodiales e Chaetothyriales foram considerados parasitas. Outro estudo, realizado por Mayer e Voglmayr (2009), utilizando formigas da espécie *Azteca brevis*, da Costa

Rica, possibilitou o isolamento de seis espécies de fungos, todos sendo leveduras negras pertencentes a ordem Chaetothyriales (VOGLMAYR et al., 2011).

Attili-Angelis et al. (2014) objetivaram isolar e identificar fungos negros do tegumento de formigas cortadeiras da tribo Attini através da técnica de flotação em óleo mineral e sequenciamento das regiões ITS, da subunidade 28S e da β -tubulina e identificaram duas novas espécies do gênero *Phialophora*, *P. attae* e *P. capiguarae*.

A investigação dos fungos filamentosos e leveduriformes associados a formigas cortadeiras das espécies *Atta laevigata* e *A. capiguara* realizada por Pagnocca et al. (2008) possibilitou o isolamento de leveduras e fungos filamentosos, sendo alguns considerados oportunistas para humanos, como *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus laurentii*, bem como de leveduras negras, *Aureobasidium pullulans* e *Cladosporium* sp., frequentemente isoladas do ambiente. O mesmo estudo também demonstra que os fungos presentes na superfície corporal das formigas estudadas são adquiridos do ambiente e a baixa ocorrência de leveduras indica a não ocorrência de transmissão vertical.

Sabe-se que as formigas da tribo Attini utilizam o material vegetal coletado para a manutenção do fungo simbiote cultivado para alimentação de larvas, alados e operárias adultas, sendo essa relação importante para a abundância de colônias e para o bom desenvolvimento nas áreas em que se encontram, uma vez que as futuras rainhas carregam uma porção da colônia do fungo para a nova colônia a ser formada (VINHA, 2007; PAGNOCCA et al., 2008; MOREIRA, 2013).

Com relação aos cupins, os fungos são frequentemente relacionados com o habitat dos cupins, devido à alta umidade desses ambientes, o que favorece o crescimento dos micro-organismos. Assim como as formigas da tribo Attini, os cupins da família Macrotermitinae cultivam um fungo simbiote que auxilia na degradação do material vegetal devido à celulase produzida pelo fungo. Estudos têm demonstrado que a transmissão dos fungos entre os cupins é tanto sexual e horizontal, uma vez que os propágulos sexuais do fungo são adquiridos de outras colônias, quanto vertical, quando adquiridos do ambiente (ROULAND-LEFEVRE, 2000; AANEN ET AL., 2002; 2007; MAKONDE ET AL., 2013).

Segundo Vicente et al. (2008), Voglmayr et al. (2011) e Saunte et al. (2012), leveduras negras (Chaetothyriales) são mais frequentemente isoladas de amostras clínicas e dificilmente isoladas do ambiente, devido a sua baixa capacidade de

competição e lento crescimento em cultura o que, até o momento, tem dificultado o entendimento da biodiversidade e do nicho ambiental de algumas espécies.

A importância de insetos sociais na disseminação de fungos pelo ambiente foi demonstrada em um estudo realizado por Stefanini et al. (2012), em que se observou o papel fundamental que vespas e abelhas podem exercer sobre a manutenção da diversidade ecológica de *Saccharomyces cerevisiae*, completando o nicho e contribuindo com a estrutura populacional e a diversidade desta espécie de levedura.

A presença de leveduras em mosquitos também já foi evidenciada, porém sendo relacionada principalmente com a proteção do inseto contra outros patógenos, inclusive patógenos humanos, como *Leishmania* spp., e como controle de vetores (RICCI et al., 2012).

No que diz respeito a família Herpotrichiellaceae, supõem-se que a produção de conídios com propriedades de aderência de *F. pedrosoi*, *E. dermatitidis*, *E. spinifera* e *C. carrionii* possam estar relacionados com a adesão a superfície corporal de artrópodes e outros invertebrados (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Em síntese, as leveduras negras são organismos adaptados a ambientes extremos e com essa adaptação passaram a desenvolver fatores de virulência (VASSE et al., 2017), como tolerância a altas temperaturas, assimilação de hidrocarbonetos, presença de melanina na parede celular, entre outras. Estão associadas com um grupo de doenças denominado micoses de implantação, visto que ocorrem a partir da inoculação traumática de leveduras negras no tecido subcutâneo do hospedeiro. Usualmente o material associado a essas lesões é ambiental, como plantas, lascas de madeira e espinhos.

As leveduras negras são ubíquas, contudo os mecanismos envolvidos com a alta dispersão desses agentes na natureza ainda não estão bem esclarecido. Uma hipótese é a dispersão mediada por insetos, que transportariam os propágulos fúngicos pelo ambiente devido a elementos constituintes do seu exoesqueleto, como a presença de hidrocarbonetos, pelo qual as leveduras negras apresentam tropismo, e de ácidos graxos, que proporcionariam adesão desses propágulos.

O grupo de micoses de implantação inclui uma doença denominada cromoblastomicose, que é frequentemente associada a lesões granulomatosas no tecido cutâneo ou subcutâneo, sendo que algumas espécies de leveduras negras estão associadas com a forma disseminada da doença. A cromoblastomicose possui distribuição mundial e é endêmica em algumas regiões do Brasil, sendo *Fonsecaea*

pedrosoi a principal espécie associada. Porém, mundialmente diversos gêneros são considerados agentes causais da cromoblastomicose, principalmente *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Rhinocladiella*, *Cyphellophora*, *Phialophora*, além de *Fonsecaea*.

REFERÊNCIAS

- AANEN, D. K. et al. Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 115, 2007. doi:10.1186/1471-2148-7-115.
- AANEN, D. K. et al. The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99 (23), p. 14887-92, 2002.
- ALMEIDA, C. S. Forrageio Em *Nasutitermes Aff. Coxipoensis*: Comportamento e Estratégias Em Relação À Disponibilidade De Recursos. 2016. Disponível em: https://www.sigaa.ufs.br/sigaa/public/programa/noticias_desc.jsf?lc=lc=lc=pt_BR&id=225¬icia=183117664.
- ATTILI-ANGELIS, D. et al. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, v. 65, p. 65-75, 2014.
- BONIFAZ, A. et al. Tinea nigra by *Hortaea werneckii*, a report of 22 cases from Mexico. **Stud. Mycol.**, v. 61, p. 77-82, 2008.
- CALDERA, E. J. Insect Symbioses: A Case Study of Past, Present, and Future Fungus-growing Ant Research. **Entomological Society of America**, v. 38(1), p. 78-92, 2009.
- COLDIRON, B.M., WILEY, E.L. & RINALDI, M.G. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by a rare fungal pathogen, *Hormonema dematioides*: successful treatment with ketoconazole. **J. Am. Acad. Derm.**, v. 23, p. 363-67, 1990.
- CASTRO, R. J. A. et al. The Major Chromoblastomycosis Etiologic Agent *Fonsecaea pedrosoi* Activates the NLRP3 Inflammasome. **Frontiers in Immunology**, v. 8:1572, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01572.
- COSTA, A. N. Efeitos Diretos e Indiretos das Formigas Cortadeiras de Folha (*Atta*) sobre a Dinâmica da Vegetação de uma Savana Neotropical. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- DE AZEVEDO, C. M. P. S. et al. *Fonsecaea pugnacius*, a Novel Agent of Disseminated Chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53 (8), p. 2674-85, 2015.
- DE BRITO, J. S. et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3 (2), p. 11-92, 2016.
- DE HOOG, G. S. et al. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 219–34, 2007. doi:10.3114/sim.2007.58.08.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. Atlas of Clinical Fungi, 4^a ed. Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht/Universitat. **Rovira i Virgili, Reus**. 2014.

DEVELOUX, M. et al. Madura foot caused by *Rhinocladiella atrovirens*. **Abstr. 12th ISHAM Congr.**, Adelaide, p. D79. 1994.

ELEOTÉRIO, E. S. R. Levantamento E Identificação De Cupins (Insecta: Isoptera) Em Área Urbana De Piracicaba, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

FRIZZO, T. L. M. Mudanças do uso da terra sobre a comunidade de formigas e a retenção dos serviços ecossistêmicos no Cerrado. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2016.

FURUIE, J. L. Desenvolvimento De Sonda Cadeado Para Diagnóstico Molecular De *Histoplasma capsulatum* Baseado Na Técnica De Amplificação Em Círculo Rolante (Rca). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal do Paraná, 2014.

GIOVANELLA, R. Influência Do Campo Eletromagnético No Comportamento De Cupins De Madeira Seca (*Cryptotermes Brevis*). Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2013.

GOMES, M. R. Características Da Infestação de Cupins (insecta, isoptera) Em Área de Preservação Ecológica E Sugestões De Medidas de Manejo. Monografia (Especialização em Entomologia Urbana) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2010.

GOMES, R. R. et al., Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10(11): e0005102, p. 1-20, 2016, doi:10.1371/journal.pntd.0005102.

HAIFIG, I. Morfofisiologia Das Castas E Forrageamento Do Cupim De Cerrado *Velocitermes Heteropterus* (Isoptera: Termitidae). 2013. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/106578/haifig_i_dr_rcla.pdf?sequence=1

HE, F. et al. *Knufia aspidiotus* sp. nov., a new black yeast from scale insects. **Phytotaxa**, v. 153 (1), p. 39-50, 2013.

HEIDRICH, D. et al. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report. **Medical Mycology Case Reports**, v. 16, p. 25-27, 2017.

ITO, M.; IWATSU, T. A case of chromoblastomycosis caused by *Phialophara verrucosa*. **Jpn. J. Clin. Dermatol.**, v. 39, p. 435-39, 1985.

KENT, D., et al. Fungemia due to *Hormonema dematioides* following intense avian exposure. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 759-60, 1998.

KHAN, S. et al. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: an old wine in a rare bottle. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9(3), p. 325-329, 2015. doi:10.3855/jidc.5312.

KIMURA, M. et al. Multifocal subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Phialophora verrucosa*. **Arch. Path. Lab. Med.**, v. 127, p. 91-93, 2003.

KRZYSCIAK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYNSKA, P.; PIASZCZYNSKI, M., Chromoblastomycosis, **Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 5, p. 310-21, 2014.

KOO, S.; KLOMPAS, M.; MARTY, F. M. *Fonsecaea monophora* cerebral phaeohyphomycosis: case report of successful surgical excision and voriconazole treatment and review. **Medical Mycology**, v. 48(5), p. 769-74, 2010. doi:10.3109/13693780903471081.

LI, D. M. et al. *Coniosporium epidermidis* sp. nov., a new species from human skin. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 131–36, 2008. doi:10.3114/sim.2008.61.13.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black Yeast Symbionts Compromise the Efficiency of Antibiotic Defenses in Fungus-Growing Ants. **Ecology**, v. 89, n. 5, p. 1216–1222, 2008.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters**, v. 3, n. 5, p. 501–504, 2007.

LIU, X.Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Stud. Mycol.**, v. 81, p. 85-147, 2015.

MACEDO, R. C. Toxicidade Do Acetamiprido E Dimetoato Para Abelha *Scaptotrigona postica* Latreille, 1804. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MAKONDE, H. A. et al. Diversity of *Termitomyces* Associated with Fungus-Farming Termites Assessed by Cultural and Culture-Independent Methods. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 8 (2): e56464, 2013. e56464. doi:10.1371/journal.pone.0056464.

MAYER, V. E., VOGLMAYR, H., Mycelial Carton Galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) As A Multi-Species Network, **Proceeding Of The Royal Society B**, v. 276, p. 3265-73, 2009, doi:10.1098/rspb.2009.0768.

MENEZES, C. P.; PÉREZ, A. L. A. L.; LIMA, E. O. *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis** v. 1(1), p. 23-27, 2017.

MOREIRA, S. M. Morfometria de Rainhas do Gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae), Arquitetura Interna e Infecção Pelo Fungo Parasita *Escovopsis* de Ninhos Iniciais. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto

de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2013.

MORENO, L., F.; FENG, P.; WEISS, V. A.; VICENTE, V. A.; STIELOW, B.; DE HOOG, S. Phylogenomic analyses reveal the diversity of laccase-coding genes in *Fonsecaea* genomes. **PLoS ONE**, v. 12, e0171291, 2017.

MORETTI, C. J. Dinâmica populacional em populações de abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) no nordeste brasileiro. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

NAJAFZADEH, M.J. et al. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data, **Med Mycol**, v. 48(6), p. 800-6, 2010, doi: 10.3109/13693780903503081.

NAJAFZADEH, M. J. et al. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of Chaetothyriales isolated from a feline cerebral abscess. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1066-76, 2011a.

NAJAFZADEH, M. J. et al. Rapid identification of fungal pathogens by rolling circle amplification using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**, v. 54: e577–e582, 2011b.

NAJAFZADEH, M. J. et al. Molecular Epidemiology of *Fonsecaea* Species. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17(3), p. 464-69, 2011c.

NASCIMENTO, M. M. F. Ecologia Molecular de Leveduras Negras. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NASCIMENTO, M. M. F. et al. Diversity of opportunistic black fungi on babassu coconut shells, a rich source of esters and hydrocarbons. **Fungal Biology**, v.121, p. 488-500, 2017.

NEIVA, I. S. Diversidade e Comportamento de Abelhas (Hymenoptera: Apidae) Associadas aos Capítulos Florais de *Helianthus annuus* (Asterales: Asteraceae) em Ambientes Urbano e Rural. 2015. Disponível em: <https://www.ufgd.edu.br/pos-graduacao/mestrado-doutorado-entomologia/teses-defendidas>.

NETO, C. M. S. A Importância Das Abelhas Para A Cultura Do Tomateiro. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

NG, K.P. et al. The mycological and molecular study of *Hortaea werneckii* isolated from blood and splenic abscess. **Mycopathologia**, v. 159, p. 495-500, 2005.

OLIVEIRA, G. F. S. Controle Biológico De *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera:Termitidae) Por Fungos Entomopatogenicos: *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) (Sorokin), *Beauveria bassiana* (Balssamo) (Vuillemin), *Isaria javanica* (Frieder E Bally) E *Penicillium* sp. (Fleming) No Amazonas. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

OSTER, G. F.; WILSON, E. O. *Castle and Ecology in the Social Insects*. Princeton University Press, Princeton, 1978.

PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, pg. 517-26, 2008.

PARENTE J. N. et al. Subcutaneous phaeohyphomycosis in immunocompetent patients: two new cases caused by *Exophiala jeanselmei* and *Cladophialophora carrionii*. **Mycosis**, v. 54(3), p. 265-69, 2011.

PRENAFETA-BOLDU, F. X; SUMMERBELL, R.; DE HOOG, G. S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? **Federation of European Microbiological Societies**, v. 30, p. 109-130, 2006.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: A Neglected Tropical Disease. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 57(19), p. 46-50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. DE C. L. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 477–488, 2013.

REIS, B. M. S. Fungal communities in gardens of the leafcutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of southern Bahia State (Brazil). **Fungal Biology**, v. 119, p. 1170-78, 2015.

REVANKAR, S. G. *Cladophialophora bantiana* brain abscess in an immunocompetent patient. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 22(4), p. 149-150, 2011.

REVANKAR, S. G., SUTTON, D. A., Melanized Fungi in Human Disease, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23(4), p. 884-928, 2010, doi:10.1128/CMR.00019-10.

RIBEIRO, P. L. Insetos Eusociais e o Desafio Para a Ideia de Seleção Natural. **Revista da Biologia**, v. 3, p. 6-8, 2009.

RICCI, I. et al. Mosquito/microbiota interactions: From complex relationships to biotechnological perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 278–284, 2012.

ROJAS, O. C. Chromoblastomycosis by *Cladophialophora carrionii* Associated with Squamous Cell Carcinoma and Review of Published Reports. **Mycopathologia**, v. 179 (1-2), p. 153-57, 2015.

ROULAND-LEFEVRE, C. Symbiosis with Fungi. In: Abe, T., Bignell, D.E. and Higashi, M., Eds., *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 289-306, 2000.

SALGADO, C. G., et al., Isolation Of *Fonsecaea pedrosoi* From Thorns of *Mimosa*

pubida, A Probable Natural Source Of Chromoblastomycosis, **Rev. Inst. Med Trop S. Paulo**, v. 46(1), p. 33-36, 2004.

SANTOS, A. A. Óleos Essenciais E Seus Constituintes Para O Controle De *Cryptotermes brevis* e *Nasutitermes corniger*. Vias De Exposição E Respostas Comportamentais. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.

SANTOS, A. L. S. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 31, p. 570–91, 2007.

SAUNTE, D. M. et al. Black yeast-like fungi in skin and nail: it probably matters. **Mycoses**, v. 55, p. 161–67, 2011. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02055.x.

SCHOCHA, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109(16), p. 6241–46, 2012.

SEYEDMOUSAVI, S. et al. Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27(3), p. 527–42, 2014.

SILVA, A. C. C., et al., Cromoblastomicose Produzida Por *Fonsecaea pedrosoi* No Estado Do Maranhão. I – Aspectos Clínicos, Epidemiológicos E Evolutivos, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25(1), p. 37-44, 1992.

SILVA, V. S. G. Comportamento De Forrageamento De *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) E Sua Ocorrência Em Áreas Urbanas. 2008. Disponível em: http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PRODVEGETAL_3434_1223924180.pdf.

SILVEIRA F. A.; MELO, G. A. R; ALMEIDA, E. A. B. ABELHAS BRASILEIRAS: Sistemática e Identificação. Belo Horizonte, 2002.

SIQUEIRA, I. M. et al. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11(3): e0005461, 2017.

SLESÁK, G. et al. Chromoblastomycosis after a leech bite complicated by myiasis: a case report. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 14, 2011.

STEFANINI, I. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109 (33), p. 13398-03, 2012.

STERFLINGER, K. Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification. In: Péter G., Rosa C. (eds) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. doi: 10.1007/3-540-30985-

3_20.

SUN, J. et al., Rapid Detection Of Pathogenic Fungi Using Loop-Mediated Isothermal Amplification, Exemplified By *Fonsecaea* Agents Of Chromoblastomycosis, **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 19-24, 2010.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Cerebral phaeohyphomycosis due to *Rhinocladiella mackenziei* (formerly *Ramichloridium mackenziei*): a taxonomic update and review of the literature. **Med. Mycol.**, v. 48, p. 546-56, 2010.

TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology** v. 86, p. 1–28, 2017.

THANH, V. N. et al. *Moniliella carnis* sp. nov. and *Moniliella dehoogii* sp. nov., two novel species of black yeasts isolated from meat processing environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 3088–94, 2012.

TURIANSKY, G.W. et al. *Phialophora verrucosa*: a new cause of mycetoma. **J. Am. Acad. Derm.**, v. 32, p. 311-15, 1995.

VASCONCELLOS, A. Ecologia e biodiversidade de cupins (Insecta, Isoptera) em remanescentes de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

VEIGA, J. C. Aptidão Reprodutiva e Acasalamentos em Condições Artificiais na Abelha sem Ferrão *Melipona flavolineata* Friese (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2015.

VICENTE, V. A. et al. Isolation of herpotrichiellacious fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 47-51, 2001.

VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–44, 2008. doi:10.3114/sim.2008.61.14.

VICENTE, V. A. et al. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 109-22, 2012.

VICENTE, V. A. et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2013. doi: 10.1007/s13225-013-0246-5.

VICENTE, V. A. et al. Comparative Genomics of Sibling Species of *Fonsecaea* Associated with Human Chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8:1924, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01924.

VINHA, G. G. SISTEMÁTICA MOLECULAR de *Atta laevigata* (Smith 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

VOGLMAYR, H. et al. The diversity of ant-associated black yeasts: Insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1077-91, 2011.

WILSON, E. O.; HÖLLDOBLER, B. Eusociality: Origin and consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102(38), p. 13367-13371, 2005. doi:10.1073/pnas.0505858102.

ZENG, J. S. et al. Spectrum of Clinically Relevant *Exophiala* Species in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45(1), p. 3713-20, 2007.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Mycetoma: a unique neglected tropical disease. **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 100-12, 2016.

**CAPÍTULO II: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NEGRAS EM
INSETOS SOCIAS DE ÁREA ENDÊMICA DA DOENÇA CROMOBLASTOMICOSE**

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NEGRAS EM INSETOS SOCIAS DE ÁREA ENDÊMICA DA DOENÇA CROMOBLASTOMICOSE

Bruna Jacomel Favoreto de Souza Lima¹, Renata Rodrigues Gomes¹, Morgana Ferreira Voidaleski¹, Gheniffer Fornari², Fernanda Miranda Rocha³ Jade Mariane Barbosa Soares⁴, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo⁵, Cristiano Menezes⁶, Débora do Rocio Klisiowicz¹, Sybren De Hoog⁷, Vânia Aparecida Vicente^{1*}

1- Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

2- Faculdade Campo Real, Guarapuava, PR, Brasil

3- Graduação em Biomedicina, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

4- Graduação em Biologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

5 -Departamento de Medicina, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

6- Embrapa Amazônia Oriental – CPATU, Belém, PA, Brasil

7- Micologia Médica, Centro de Biodiversidade Fúngica, Utrecht, Holanda

*Autora correspondente: Vânia Aparecida Vicente

RESUMO

A cromoblastomicose é uma doença negligenciada caracterizada pela ocorrência de lesões cutâneas, subcutâneas ou disseminadas de desenvolvimento lento, que podem comprometer a qualidade de vida e o desenvolvimento econômico do indivíduo afetado. Trata-se de uma doença ocupacional que afeta principalmente trabalhadores rurais e aqueles expostos a solo e material vegetal contaminados, já que o desenvolvimento da doença se dá a partir da inoculação de leveduras negras por lesão traumática com material contaminado. No Brasil, *Fonsecaea pedrosoi* é considerada a principal causadora de cromoblastomicose, porém outras espécies como *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius* também são relacionadas com a doença. Leveduras negras são consideradas oligotróficas e têm sido encontradas em substratos vegetais, madeira, solo, material vegetal em decomposição e em microambientes contaminados com hidrocarbonetos, além de se desenvolverem em temperaturas extremas. Apesar de já ser bem estabelecido quais espécies são agentes causadores da cromoblastomicose, o nicho ambiental e a forma com que essas leveduras se dispersam no ambiente ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo que a disseminação ambiental mediada por insetos, considerados vetores, é uma possibilidade. Dessa forma, o objetivo deste estudo é determinar se insetos sociais, especificamente formigas, abelhas e cupins, podem atuar como vetores na disseminação de leveduras negras no ambiente. A partir da utilização de técnicas seletivas, como o isolamento com flotação em óleo mineral e o enriquecimento seletivo em compostos aromáticos voláteis, foram obtidos oito isolados de fungos melanizados, destes sendo cinco leveduras negras e três fungos dematiáceos. A partir da análise micromorfológica e de sequenciamento foram identificados os agentes de cromoblastomicose *Fonsecaea pedrosoi* e *Rhinoctadiella similis*, além de *Exophiala xenobiotica* e *Cyphellophora* sp., também relacionados com micoses de implantação. Os demais isolados foram identificados como *Cladosporium* sp., *Canariomyces* sp. e *Hawksworthiomyces* sp. Assim sendo, formigas (n=2), abelhas (n=2), cupins (n=3) e ninho de cupins (n=1) podem ser considerados ambientes colonizados por leveduras negras com potencial patogênico para humanos, sendo os insetos potenciais carreadores, atuando na dispersão destas leveduras no ambiente.

Palavras-chave: Cromoblastomicose; Leveduras negras; *Atta laevigata*; *Melipona flavolineata*; *Scaptotrigona postica*; *Nasutitermes* sp.

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma doença que apresenta distribuição mundial e é classificada como micose cutânea, subcutânea ou disseminada crônica caracterizada pela presença de corpos muriformes no tecido do hospedeiro e reação granulomatosa (KHAN et al., 2015; KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; ROJAS et al., 2015).

Trata-se de uma doença com caráter ocupacional que afeta principalmente trabalhadores rurais, o que é fortemente associado à exposição ao material vegetal contaminado com leveduras negras, que através de lesão traumática são inoculadas no tecido epidérmico do hospedeiro dando início ao desenvolvimento da doença (VICENTE et al., 2008; 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Segundo Gomes et al. (2016) a principal espécie relacionada com a cromoblastomicose no Brasil é *Fonsecaea pedrosoi*, representando 80% das amostras analisadas, sendo que outras espécies também são associadas, porém em menor frequência, como *F. monophora* (13%), *F. nubica* (3%), *Rhinocladiella tropicalis* (3%) e *Cyphellophora ludoviensis* (1%), além de um caso de cromoblastomicose disseminada para o cérebro causada por *F. pugnacius*. Além desses, outras espécies também estão relacionados com a cromoblastomicose a nível mundial, como *Exophiala spinifera*, *E. dermatitidis*, *E. jeanselmei*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *R. similis* (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; DE AZEVEDO et al., 2015; GOMES et al., 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; HEIDRICH et al., 2017).

Leveduras negras são fungos filamentosos que apresentam melanina em sua parede celular, por isso são chamados de fungos dematiáceos, também possuem a habilidade de se desenvolverem na forma de leveduras e em condições adversas, como altas temperaturas, altas concentrações de sal e na presença de radiação ultravioleta, além de serem capazes de assimilar compostos aromáticos de carbono, além de formarem corpos muriformes no tecido. Todas essas características são consideradas fatores de virulência por auxiliarem no processo de infecção do hospedeiro, seja como forma de adaptação ao novo ambiente ou como mecanismo de evasão do sistema imune (SEYEDMOUSAVI et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Devido ao caráter oligotrófico do seu metabolismo, estes agentes ocupam

micro-ambientes na natureza, e assim, são encontradas em matéria vegetal em decomposição, solo e espinhos, também estão presentes em ambientes extremos, como rochas, locais poluídos com hidrocarbonetos, madeira tratada com creosoto, entre outros (NASCIMENTO et al., 2017; NASCIMENTO, 2013; TEIXEIRA et al., 2017; VICENTE et al., 2013).

Contudo, na natureza, a forma de dispersão das leveduras negras potencialmente capazes de causar infecção em hospedeiros animais não está bem estabelecida, enquanto que raramente são isoladas do ambiente, sendo que normalmente são isoladas espécies-irmãs estritamente ambientais, como é o caso de *F. erecta* e *F. mínima* isoladas de plantas vivas (VICENTE et al., 2013). Outro agravante das leveduras negras é o fato de que alguns dos gêneros envolvidos apresentam espécies crípticas, morfologicamente indistinguíveis, o que torna necessária a identificação molecular dos isolados (GOMES et al., 2016). Devido aos nichos ambientais não estão totalmente elucidados é de fundamental importância uma extensiva investigação a respeito da ecologia destes agentes, principalmente na elucidação da rota de infecção e dos aspectos evolutivos relacionados a patogenicidade e mecanismos de virulência.

Dentro deste contexto este estudo objetivou isolar e identificar leveduras negras a partir do exoesqueleto de insetos sociais (formigas, abelhas e cupins) e de material associado a eles, já que estes insetos apresentam hidrocarbonetos aromáticos, pelo qual as leveduras negras possuem certo tropismo, ou ácidos graxos, que possibilitam a adesão de propágulos dos fungos, em seu corpo (PRENAFETA-BOLDU; SUMMERBELL; HOOG, 2006; NASCIMENTO, 2013; KELLER et al., 2014).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. COLETA DOS INSETOS

As coletas de insetos foram realizadas em duas regiões endêmicas da doença cromoblastomicose no Brasil, os estados do Maranhão e do Pará. Formigas da tribo Attini, identificadas como *Atta laevigata*, foram coletadas próximo à casa de pacientes com cromoblastomicose em seis municípios no Estado do Maranhão, sendo eles São Benedito do Rio Preto, Bacabeira, Icatu, Pinheiro, Palmeirândia e Nina Rodrigues. Foram coletados 100 indivíduos em cada município. Da mesma forma foram coletados 100 cupins identificados como pertencentes ao gênero *Nasutitermes* juntamente com material do ninho. A coleta foi procedida nos arredores da moradia de paciente com cromoblastomicose no município de Nina Rodrigues (FIGURA 1). No estado do Pará duas espécies de abelhas, identificadas como *Melipona flavolineata* e *Scaptotrigona postica*, foram coletadas em dez locais diferentes da unidade da Embrapa Amazônia Oriental em Belém - PA, sendo cinco locais para cada espécie, totalizando 100 indivíduos por colônia. Cupins do gênero *Nasutitermes* foram coletados de cinco locais diferentes na unidade da Embrapa Amazônia Oriental em Belém – PA, sendo coletados 100 indivíduos por ninho (FIGURA 1).

2.1.1 AUTORIZAÇÃO DE COLETA

As coletas foram realizadas após obtenção da “Autorização para Atividades com Finalidade Científica” nº 96657187, expedida com base na Instrução Normativa nº 03/2014 pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO.

FIGURA 1 - MAPA DAS REGIÕES DE COLETA NOS ESTADOS DO MARANHÃO E DO PARÁ.



FONTE: A Autora (2018).

2.2 ISOLAMENTO

O isolamento foi realizado a partir das técnicas de flotação em óleo mineral (Iwatsu, 1981, adaptado por Atilli-Angelis, 2014) e da técnica de Enriquecimento Seletivo em Compostos Aromáticos Voláteis (Prenafeta-Boldú et al., 2001, adaptada por Nascimento et al., 2017).

Para a técnica de flotação em óleo mineral corpos de 10 insetos foram imersos em 25 mL de solução salina (NaCl 0,85%) com antibióticos (200 U de penicilina, 200 µg/mL de cloranfenicol, 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de ciclohexamida). Aproximadamente 20g do material do ninho de cupins foram submetidos ao mesmo processo. Os tubos foram agitados e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente, sendo que após a incubação foram adicionados 5 mL de óleo mineral. Em seguida foram agitados vigorosamente em agitador de tubos por 5 minutos e foram deixados em repouso por 20 minutos para formação da interfase óleo-solução. Em seguida, alíquotas de 100 µL eram coletadas de diferentes pontos da interfase óleo-solução (n=5) e inoculados em Ágar Micosel com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas eram incubadas a 28°C por até 60 dias, sendo monitoradas diariamente para o aparecimento de colônias negras. As colônias negras obtidas foram mantidas em Ágar Sabouraud Dextrose a 28°C.

Para a técnica de enriquecimento seletivo em compostos aromáticos voláteis uma amostra contendo 5 insetos era inoculada em 6 mL do Meio Czapeck sem glicose (2g/L de nitrato de sódio, 1 g/L de fosfato dipotássico, 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 0,5 g/L de cloreto de potássio, 0,01 g/L de sulfato ferroso e 0,1 g/L de cloranfenicol). Para obtenção de uma atmosfera rica em hidrocarbonetos foi utilizado um dessecador com bomba de vácuo e uma solução de tolueno em dibutilftalato 3% v/v. Os tubos foram organizados no dessecador e incubados a 28°C por 3 semanas. Após a incubação inicial, foram coletadas alíquotas de 100 µL de cada frasco e semeadas em Ágar Micosel por 4 semanas a 28°C, sendo observados diariamente para o aparecimento de colônias negras.

Os fungos isolados foram depositados na Rede Paranaense de Coleções Microbiológicas – TaxOnline (<http://taxonline.bio.br/index.php>) e estão disponíveis para acesso na rede.

2.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

A identificação macromorfológica dos isolados obtidos foi feita com base no crescimento em Ágar Sabouraud Dextrose sendo avaliadas as seguintes características do verso e do reverso das colônias: velocidade de crescimento, aspecto, borda e pigmentação.

Para análise da micromorfologia foi realizada a técnica de microcultivo em Ágar Aveia (DE HOOG et al., 2011) que consiste na inoculação do fungo de interesse em três cubos de meio de cultura sobre uma lâmina de vidro sendo uma lamínula esterilizada colocada sobre o bloco de ágar. A umidade foi preservada com a utilização de algodão embebido com água destilada esterilizada. As placas foram incubadas a 28°C por 7, 14 e 21 dias. Após cada período de incubação uma lamínula foi removida e colocada sobre uma lâmina com uma gota de lactofenol, sendo procedida a análise ao microscópio óptico para avaliação do crescimento de estruturas de reprodução e possível identificação a nível de gênero.

2.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

As temperaturas cardinais de crescimento foram determinadas em ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas por 14 dias com temperaturas variando de 20°C a 42°C. Os isolados foram testados em triplicatas simultâneas, sendo calculada a média de crescimento a partir da medição das colônias. Os resultados foram plotados utilizando temperatura (°C) *versus* diâmetro da colônia (mm) como parâmetros.

2.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA fragmentos de aproximadamente 1 cm² de colônias com 14 a 21 dias foram transferidos para microtubos com sílica:celite (2:1) contendo 300 µL de brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB). Os fragmentos fúngicos foram macerados com bastão de vidro por aproximadamente 5 minutos, sendo em seguida adicionados mais 200 µL de CTAB e levado a banho-maria a 65°C por 10 minutos.

Após o banho-maria, foi adicionado um volume 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) (24:1) em cada microtubo e após centrifugação a 16.000 g por 7 minutos o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e esta etapa foi

repetida. Após a segunda centrifugação foram adicionados 800 µL de etanol 96% gelado e mantido *overnight* a -20°C, em seguida uma centrifugação a 16.000 g por 7 minutos foi realizada e o sobrenadante descartado e ao precipitado era adicionado o volume 500 µL de etanol 70% gelado e após centrifugação a 16.000 g por 7 minutos todo o sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi desidratado e o DNA ressuspendido em 100 µL de água ultrapura esterilizada. O microtubo com DNA foi mantido em temperatura ambiente por 24 horas para completa hidratação. Após esse período a quantificação foi feita em Espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c e a visualização da qualidade do DNA em gel de agarose 1%.

2.6 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO GÊNICO

Para amplificação gênica foram utilizadas a região dos espaçadores internos transcritos (ITS) com os iniciadores ITS1 e ITS4 e a região da subunidade maior do ribossomo (LSU) com os iniciadores NL1 e LR5. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 7,3 µL de água ultrapura esterilizada, 1,25 µL de tampão 1x, 0,5 µL de cada iniciador, 0,5 µL de MgCl₂ (6mM), 1,25 µL de dNTP (2,5mM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase e 2 µL de amostra (20 ng/µL). A reação em cadeia da polimerase foi feita nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos, 94°C por 35 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 72°C por 7 minutos, sendo realizados 35 ciclos. A temperatura de anelamento foi alterada para 58°C para a região LSU.

Após a visualização em gel de agarose 1,6% os amplicons foram purificados, precipitados e sequenciados. O sequenciamento foi realizado com os iniciadores ITS1/ITS4 e NL1/LR5 para as regiões ITS e LSU, respectivamente, nas seguintes condições: 96°C por 2 minuto, 96°C por 10 segundos, 52°C por 10 segundos, 62°C por 4 minutos, com 35 ciclos. A temperatura de anelamento foi alterada para 58°C para a região LSU. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems).

2.7 ALINHAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências obtidas foram editadas utilizando o BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5. O alinhamento, a inspeção visual e a reconstrução filogenética

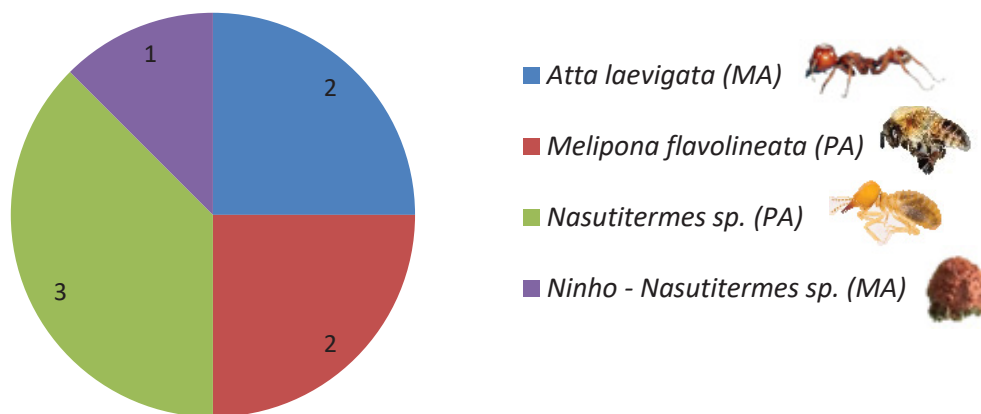
foram realizados no MEGA 7.0.26. As sequências utilizadas para construção das árvores filogenéticas foram selecionadas do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

3 RESULTADOS

3.1. ISOLAMENTO

A partir da técnica de isolamento seletivo com flotação em óleo mineral foram isolados oito fungos com características morfológicas semelhantes a leveduras negras, com um total de 1860 insetos analisados, sendo formigas (n = 600), abelhas (n = 1000) e cupins (n = 260). Totalizando 186 amostragens contendo 10 indivíduos, com 930 réplicas. Destes, 2 (25%) foram isolados de formigas da espécie *Atta laevigata*, 2 (25%) de abelhas da espécie *Melipona flavolineata*, 3 (37,5%) de cupins da espécie *Nasutitermes* sp e 1 (12,5%) de material do ninho de cupins *Nasutitermes* sp. (GRÁFICO 1). Não foram obtidas leveduras negras a partir do isolamento com a técnica de enriquecimento seletivo em compostos aromáticos voláteis.

GRÁFICO 1 - REPRESENTAÇÃO DOS ISOLADOS DE FORMIGAS (*Atta laevigata*), ABELHAS (*Melipona flavolineata*), CUPINS DO PARÁ (*Nasutitermes* sp.) E MATERIAL DO NINHO DE *Nasutitermes* sp. DO MARANHÃO.



FONTE: A Autora (2018).

A partir do material coletado no Maranhão foram obtidos 3 isolados, sendo dois de *A. laevigata*, um procedente de amostra do município de São Benedito do Rio Preto e o outro do município de Icatu, e um do material do ninho de *Nasutitermes* sp. coletado no município de Nina Rodrigues (TABELA 1). O isolamento do material coletado no Pará resultou em 4 isolados, sendo dois procedentes de amostra de abelha *M. flavolineata* e dois de cupins *Nasutitermes* sp. todos coletados no município de Belém (TABELA 1).

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Com base em características macro e micromorfológicas foram identificados isolados similares aos agentes de cromoblastomicose (n=4) *Exophiala*, *Rhinoctadiella*, *Fonsecaea* e *Fonsecaea-like*. Um dos isolados apresentava colônia com coloração cinza esverdeada e os demais coloração preta olivácea, todas com coloração olivácea no reverso. As formas de conidiogênese foram variáveis, sendo que um dos isolados formava aglomerados de conídios elipsoides e formação simpodial em conidióforos, por isso sendo identificado preliminarmente como *Rhinoctadiella* sp. (CMRP 3079), outro isolado apresentava conidiogênese abundante, com conídios elipsoides por vezes aderidos em grupos, sendo relacionado com o gênero *Exophiala* (CMRP 3077). O isolado identificado como *Fonsecaea* sp. (CMRP 3076) exibia hifas acastanhadas com septos e conidióforo ramificado em cadeias curtas de conídios simpodiais e ovalados, enquanto que o isolado identificado como *Fonsecaea-like* (CMRP 3103) apresentou somente hifas acastanhadas e septadas aos 21 dias de microcultivo.

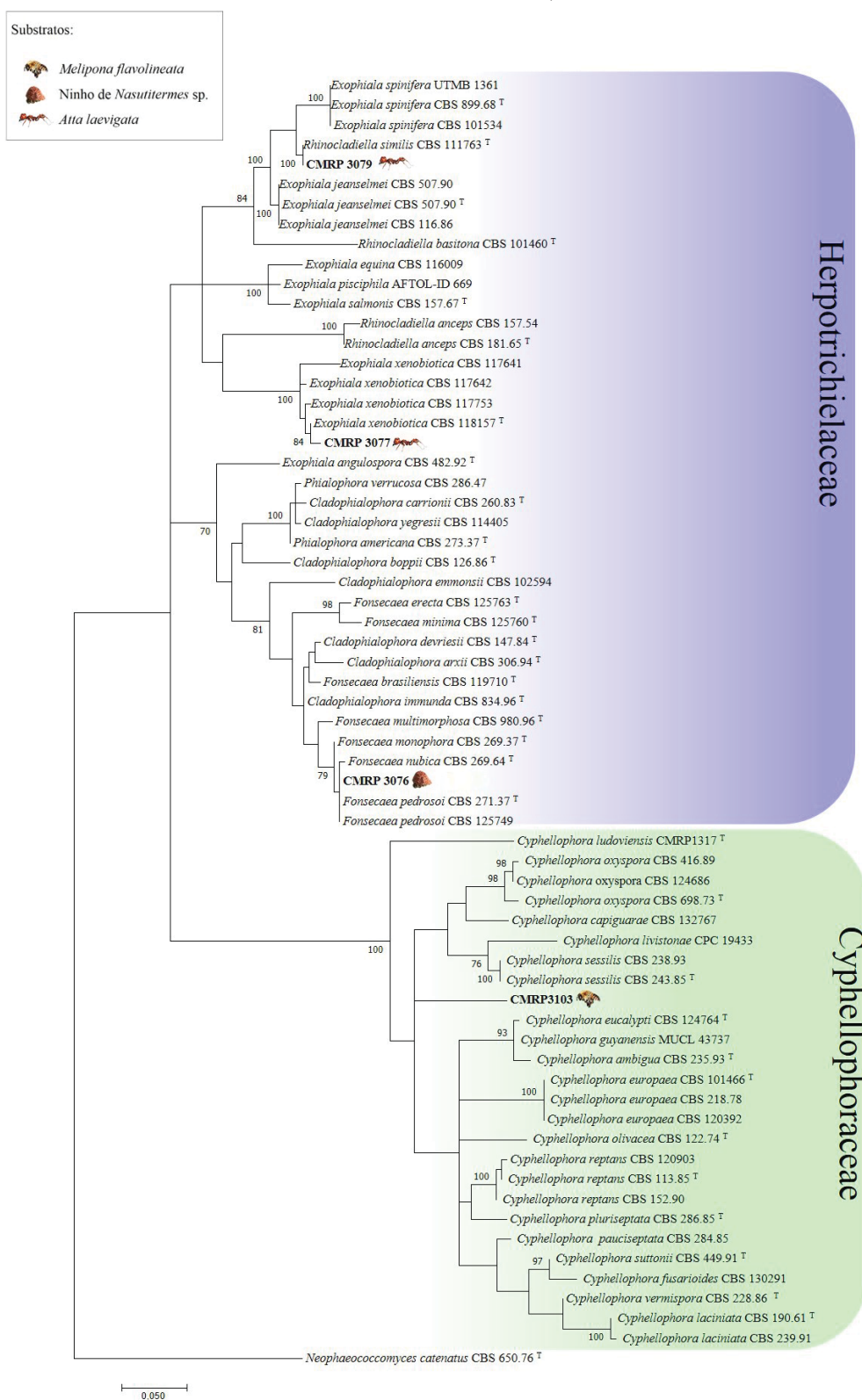
As sequências ITS (TABELA 1) destes isolados foram comparadas com linhagens referência e a partir disso foi construída uma árvore filogenética com Máxima Verossimilhança no Mega 7.0.26 com modelo Kimura 2 parâmetros com gama variação e sítios invariáveis (K2+G+I). De acordo com essa análise o isolado CMRP 3079 foi identificado como *Rhinoctadiella similis*. Enquanto que o isolado CMRP 3077 como pertencente ao clado jeanselmei especificamente dentro do grupo *Exophiala xenobiotica* com um valor de bootstrap de 100. De acordo com a análise da árvore filogenética os dois isolados preliminarmente identificados como *Fonsecaea* sp. pertenciam a clados diferentes, sendo CMRP 3076 agrupado no clado bantiana juntamente com *F. pedrosoi* e *F. nubica*, em análise complementar do gênero *Fonsecaea* este isolado se agrupou com *F. pedrosoi* (dado não mostrado), e o segundo isolado *fonsecaea-like*, CMRP 3103, se agrupou completamente separado da família Herpotrichiellaceae, no clado europaea, que pertence à família Cyphellophoraceae e foi assim identificado como *Cyphellophora* sp., dessa forma é necessário o sequenciamento de outros genes a fim de estabelecer as relações filogenética entre estas espécies (FIGURA 2).

TABELA 1 – ISOLADOS OBTIDOS DE INSETOS SOCIAIS PROVENIENTES DA REGIÃO NORTE DO BRASIL

ESTADO	ESPÉCIE	LOCAL DE COLETA	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA	CMPR	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO AO GENBANK ITS / LSU
Maranhão	<i>Atta laevigata</i>	São Benedito do Rio Preto	3° 19' 55.11" S	3079	<i>Rhinoctadiella similis</i>	MH704431
			43° 32' 9.44" W Elevação 37 m			
		Icatu	2° 46' 29.01" S	3077	<i>Exophiala xenobiotica</i>	MH704245
			44° 2' 47.58" W Elevação 28 m			
			3° 27' 33.04" S			
Pará	<i>Nasutitermes</i> sp.	Nina Rodrigues	43° 55' 29.10" W	3076	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	MH703648
			Elevação 28 m			
		Belém - Local 5	1° 26' 7.29" S	3119	<i>Cladosporium</i> sp.	MH705339
			48° 26' 57.09" W Elevação 18 m			
			1° 26' 7.29" S			
	Belém - Local 5	48° 26' 57.09" W	3103	<i>Cyphellophora</i> sp.	MH705341	
		Elevação 18 m				
	<i>Nasutitermes</i> sp.	Belém - Local 1	1° 26' 7.96" S	3081	<i>Canariomyces</i> sp.	MH705337
			48° 26' 53.36" W Elevação 18 m			
		Belém - Local 1	1° 26' 7.96" S	3102	<i>Hawksworthiomyces</i> sp.	MH705338 / MH705335
48° 26' 53.36" W Elevação 18 m						
1° 26' 7.29" S						
Belém - Local 5	48° 26' 57.09" W	3080	<i>Canariomyces</i> sp.	MH705340 / MH705336		
	Elevação 18 m					

FONTE: A Autora (2018).

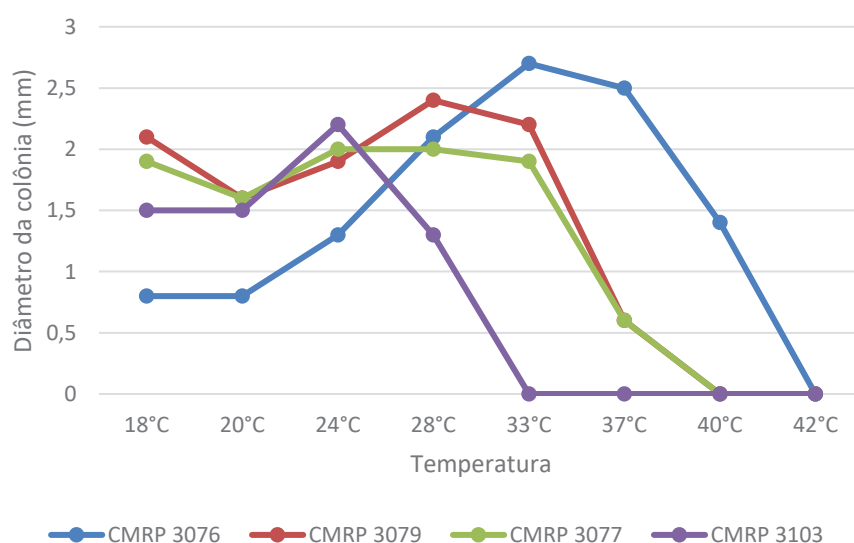
FIGURA 2 - ÁRVORE COM REPRESENTANTES DAS FAMÍLIAS HERPOTRICHIELLACEAE E CYPHELLOPHORACEAE BASEADA EM SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS



FONTE: A Autora (2018). LEGENDA: Construída com Máxima Verossimilhança no MEGA 7.0.26 com modelo Kimura 2 parâmetros com gama variação e sítios invariáveis (K2+G+I). Valores de bootstrap superior a 70% a partir de 1000 replicatas são mostrados nos ramos. Os isolados deste estudo estão em negrito com indicação do substrato em que foram coletados. As *type strains* estão indicadas por ^T. *Neophaeococcomyces catenatus* foi utilizado como *outgroup*.

O isolado CMRP 3079 apresentou crescimento ótimo a 28°C, com intervalo de crescimento entre 20°C e 37°C, enquanto que para o isolado CMRP 3077 a temperatura ótima de crescimento foi entre 24 e 28°C, com crescimento entre 20°C e 37°C. O isolado CMRP 3076 apresentou crescimento ótimo a 33°C, com crescimento entre 20°C e 40°C. Enquanto que CMRP 3103 apresentou crescimento ótimo a 24°C, com crescimento entre 20°C e 28°C (GRÁFICO 2).

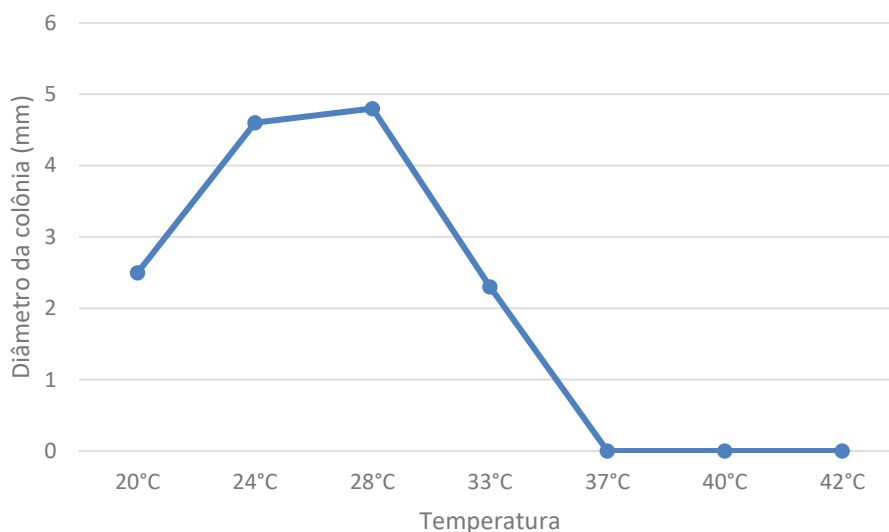
GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS *Fonsecaea pedrosoi* (CMRP 3076), *Exophiala xenobiotica* (CMRP 3077), *Rhinocladiella similis* (CMRP 3079) E *Cyphellophora* sp. (CMRP 3103) APÓS 14 DIAS



FONTE: A Autora (2018).

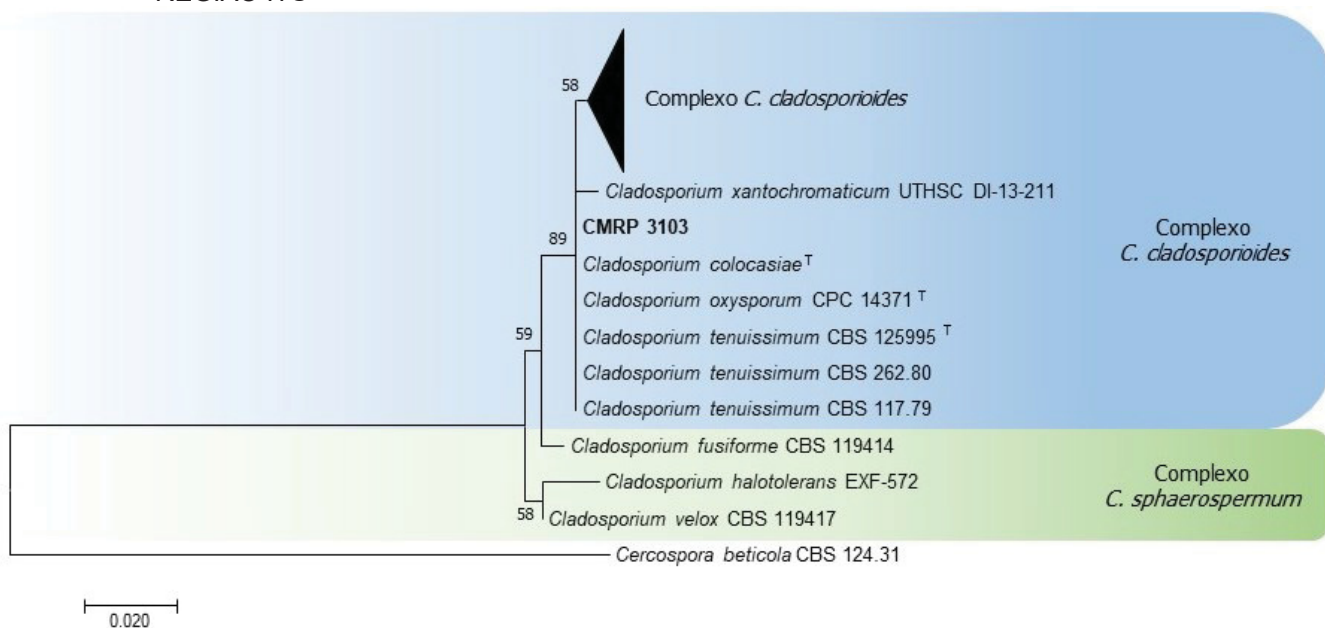
O isolado CMRP 3119 apresentou crescimento ótimo a 28°C com intervalo de crescimento entre 20°C e 33°C (GRÁFICO 3), com aspecto filamentososo e aveludado e coloração inicialmente verde claro passando a verde oliváceo e reverso verde oliváceo. Em microcultivo apresentava hifas septadas com coloração castanha e conidióforos ramificados com conídios arredondados em cadeias curtas. De acordo com a análise filogenética com base no sequenciamento da região ITS o isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Cladosporium* (FIGURA 3). Contudo, a análise desta região gênica não foi suficiente para determinar a espécie, sendo necessário utilizar outras regiões gênicas para a identificação complementar.

GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE *Cladosporium* sp. (CMRP 3119) APÓS 14 DIAS



FONTE: A Autora (2018).

FIGURA 3 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS COMPLEXOS *C. cladosporioides* E *C. shaerospermum* DO GÊNERO *Cladosporium* BASEADA EM ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS

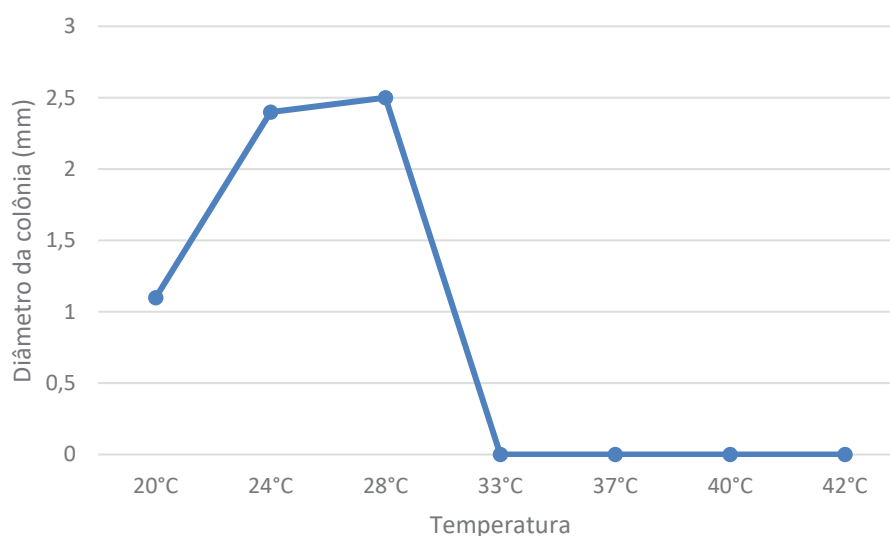


FONTE: A Autora (2018). LEGENDA: Construída com Máxima Verossimilhança no Mega 7.0.26. *Bootstrap* calculado a partir de 500 replicatas com modelo filogenético Jukes-Cantor (JC). O isolado CMRP 3119 destacado em negrito. *Cercospora beticola* foi usado como *outgroup*.

Os isolados CMRP 3080 e CMRP 3081 apresentam crescimento ótimo a 28°C, com crescimento entre 20°C e 28°C (GRÁFICO 4), e colônias lanosas, sendo a coloração central acastanhada tornando-se verde oliváceo com reverso verde oliváceo, as bordas apresentavam aspecto de franjas. No microcultivo de ambos foram observadas hifas septadas e com coloração castanha. Os conidióforos em sua

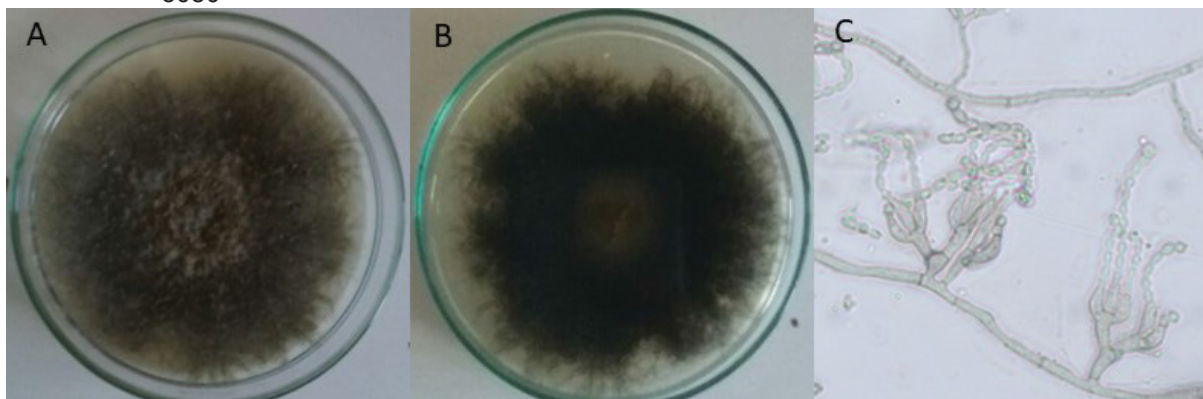
maioria eram ramificados com formato semelhante a um tridente, sendo cada célula conidiogênica lageniforme com conídios arredondados dispostos em longas cadeias (FIGURA 4). A partir da análise dessas características a identificação inicial foi *Microascus* sp., contudo a análise da região ITS demonstrou um agrupamento externo aos isolados com o gênero *Microascus* (dado não mostrado). A partir da análise da região LSU foi observado um agrupamento com *Canariomyces notabilis*, sendo, portanto, identificado preliminarmente como *Canariomyces* sp. (FIGURA 5).

GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE *Canariomyces* sp. (CMRP 3080) APÓS 14 DIAS



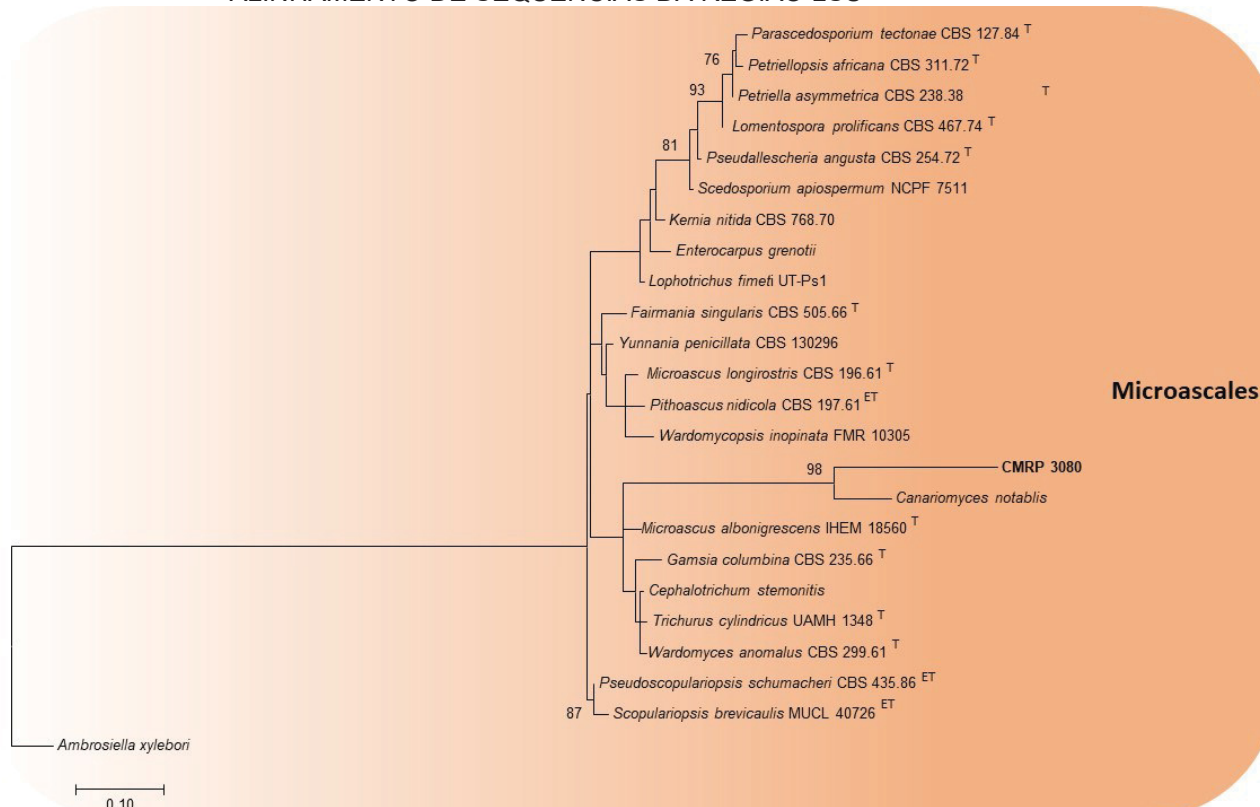
FONTE: A Autora (2018).

FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS COLONIAIS E DE MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO CMRP 3080



FONTE: A Autora (2018). LEGENDA: (A) Macromorfologia da colônia em ágar Sabouraud Dextrose apresentando aspecto lanoso e coloração marrom no centro da colônia passando a verde oliváceo nas bordas. (B) Reverso da colônia com coloração verde oliváceo. (C) Conidióforos ramificados com células conidiogênicas lageniformes (em forma de garrafa) e longa cadeia de conídios. Aumento de 400X.

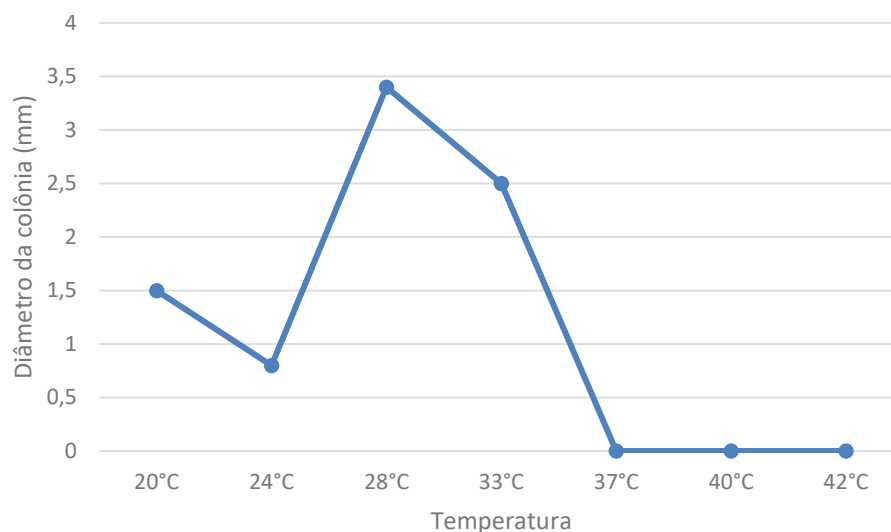
FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA MICROASCALES BASEADA EM ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO LSU



FONTE: A Autora (2018). LEGENDA: Construída com Máxima Verossimilhança no Mega 7.0.26. *Bootstrap* calculado a partir de 500 replicatas com modelo filogenético Tamura-Nei (1993) com variação gama (TN93+G). O isolado CMRP 3080 está em negrito. ^T indica *type strain* e ^{ET} indica *Ex-type*. *Ambrosiella xylebori* foi usado como *outgroup*.

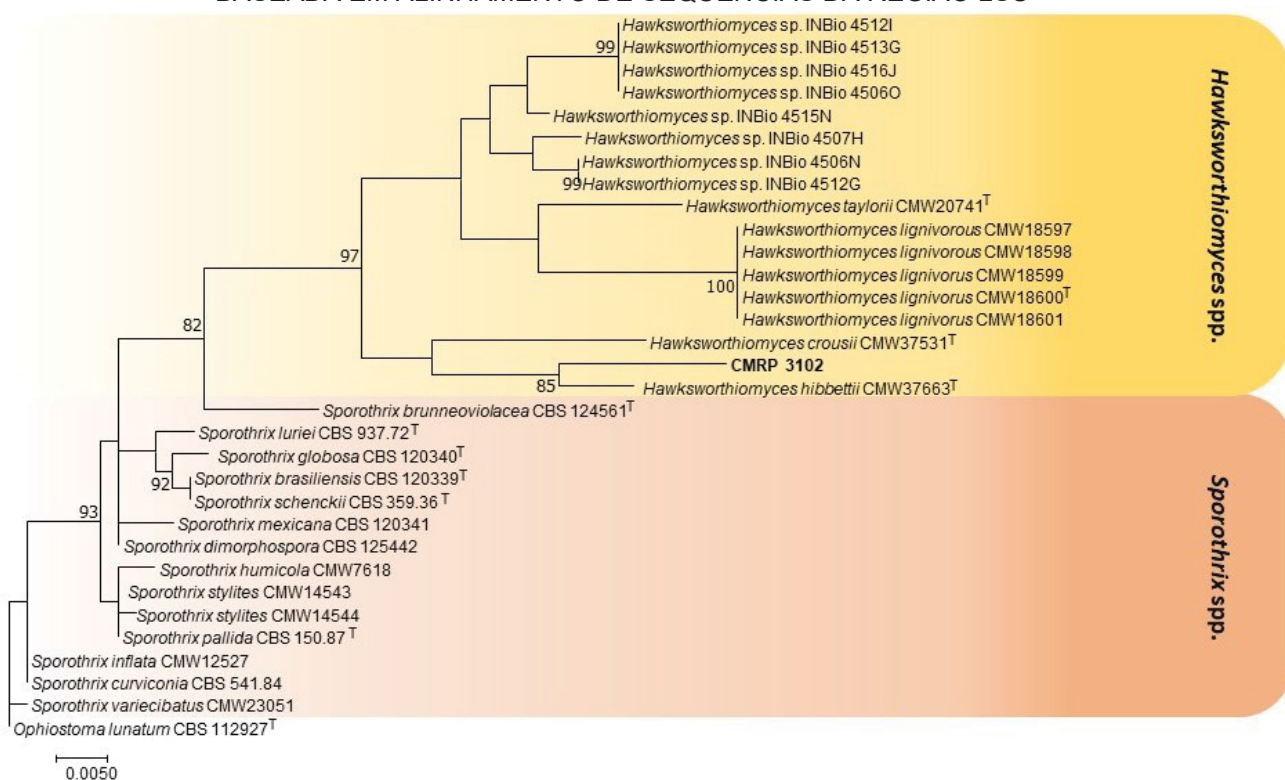
Com relação ao isolado CMRP 3102, a morfologia colonial observada era filamentosa e aveludada com crescimento ótimo a 28°C e crescimento entre 20°C e 33°C (GRÁFICO 5), e apresentava coloração acinzentada com reverso marrom escuro e bordas sutilmente radiadas e hifas septadas e acastanhas com conidióforos indiferenciados e células conidiogênicas levemente aumentadas de volume no ápice, os conídios apresentavam forma de gota e eram arranjados de forma semelhante aos do gênero *Sporothrix*. A análise preliminar da sequência ITS do isolado CMRP 3102 indicou a proximidade do isolado com as sequências do gênero *Sporothrix* agrupado com *S. lignivora*. Contudo, a espécie *S. lignivora* foi reagrupada no gênero *Hawksworthiomyces*, que foi descrito recentemente (DE BEER et al., 2016). Dessa forma foi feita a análise da sequência do isolado CMRP 3102 com todas as sequências pertencentes a esse novo gênero de acordo com De Beer et al. (2016) juntamente com as sequências do gênero *Sporothrix*. A partir dessa análise pôde-se afirmar que o isolado CMRP 3102 tratava-se de *Hawksworthiomyces* sp. (FIGURA 6).

GRÁFICO 5 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE *Hawksworthiomyces* sp. (CMRP 3102) APÓS 14 DIAS



FONTE: A Autora (2018).

FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS GÊNEROS *Hawksworthiomyces* E *Sporothrix* BASEADA EM ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO LSU



FONTE: A Autora (2018). LEGENDA: Construída com Máxima Verossimilhança no Mega 7.0.26. *Bootstrap* calculado a partir de 500 replicatas com modelo filogenético Kimura 2 parâmetros com variação e sítios invariáveis (K2+G+I). O isolado CMRP 3102 está indicado em negrito. A tarja laranja indica o grupo reclassificado como *Hawksworthiomyces*. A tarja rosa indica as espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*. ^T indica *type strain*. *Ophiostoma lunatum* foi usado como *outgroup*.

4 DISCUSSÃO

O isolamento de leveduras negras é considerado difícil devido ao oligotrofismo apresentado por esses fungos, sendo que, na natureza, são encontrados em microambientes onde a competição com outros micro-organismos é menor, principalmente em condições extremas, como em rochas, ambientes poluídos por hidrocarbonetos e em altas temperaturas (VICENTE et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017).

Sabe-se que os insetos sociais apresentam uma relação de simbiose com algumas espécies de fungos, principalmente relacionados a nutrição, seja utilizando-os para prover nutrientes e enzimas para os indivíduos da colônia, para degradar a matéria alimentar, o que aumenta também sua competitividade, ou até para construção de estruturas do ninho (AANEN et al., 2007; VINHA, 2007; ATTILI-ANGELIS et al., 2014; VASSE et al., 2017).

Vasse et al. (2017) relatam que as leveduras negras têm sido encontradas em diversos ambientes na natureza e não se agrupam por origem geográfica ou com o tipo de hospedeiro. Em formigas as leveduras negras foram isoladas do exoesqueleto e do *pellet* de fungos, sendo que foi isolado *Exophiala oligosperma*, uma espécie patogênica para humanos e capaz de metabolizar tolueno. Também em formigas, especificamente a espécie *Atta laevigata* tem sido estudada nesse aspecto. Pagnocca et al. (2008) utilizaram três métodos para o isolamento de fungos e leveduras presentes no exoesqueleto e no *pellet* de fungos carregados pelas rainhas durante o voo nupcial para formação de novas colônias. O método em que as formigas andavam sobre o meio de cultura foi o que apresentou maior número de isolados, sendo que *Cladosporium* sp. foi isolado em maior quantidade, sugerindo que as formigas do gênero *Atta* podem exercer papel importante na dispersão desses fungos para o ambiente.

Baron (2011) realizou o isolamento de leveduras negras do exoesqueleto e do *pellet* de *A. laevigata*, sendo que do corpo foram isoladas nove espécies de fungos, sendo quatro leveduras negras pertencentes ao gênero *Cladosporium*. A partir do isolamento do *pellet* foi isolada *E. dermatitidis*. Duarte et al. (2014) realizaram outro isolamento em *A. laevigata*, também utilizando o exoesqueleto e o *pellet* de fungos, e obtiveram leveduras negras isoladas a partir do exoesqueleto (n=07), sendo identificados como *Cladosporium perangustum*, *C. cladosporioides*, *E. dermatitidis*,

Cladophialophora sp. e *Phialophora capiguare*, destas, somente *E. dermatitidis* sendo considerada patogênica para humanos. Os autores ressaltam que a cutícula das formigas é rica em hidrocarbonetos, devido ao papel que estes exercem nos sinais de comunicação e também dificultando a desidratação, e podem estar relacionados com a colonização por leveduras negras. Um estudo realizado por Brandt et al. (2009) demonstrou que esses compostos presentes na cutícula de formigas cortadeiras são semelhantes a taninos e a flavonóides (TEIXEIRA et al., 2017).

Diversos autores relatam a presença de fungos em abelhas e cupins, contudo a maioria dos isolados são fungos hialinos, sendo *Cladosporium* spp. o único gênero de levedura negra isolado (GILLIAM; PREST; MORTON, 1974; ZOBBERI; GRACE, 1990; MATHEW et al., 2011; KELLER et al., 2014; SAMAL; SETHY; SAHU, 2014). Segundo Keller et al. (2014), pode haver uma relação entre a constituição do pólen, rico em ácidos graxos, e a adesão de propágulos de fungos ao corpo de abelhas adultas, o que pode ter papel importante na dispersão desses micro-organismos no ambiente.

Neste estudo a técnica de enriquecimento seletivo em compostos aromáticos voláteis não resultou na obtenção de colônias de leveduras negras, o que está de acordo com o descrito por Nascimento et al. (2017), uma vez que apenas os gêneros *Exophiala* e *Cladophialophora* possuem alta habilidade de metabolização de hidrocarbonetos como a única fonte de carbono (BLASI et al., 2016). Segundo Blasi et al. (2016) a via de degradação de tolueno está presente em apenas algumas espécies de leveduras negras, especificamente em *Cladophialophora saturnica* e *C. immunda*.

A partir da técnica de flotação em óleo mineral foi possível isolar sete gêneros e/ou espécies diferentes de leveduras negras, sendo quatro deles potencialmente patogênicas para humanos, *Fonsecaea pedrosoi*, *Rhinochadiella similis*, *Exophiala xenobiotica* e *Cyphellophora* sp. Os demais foram identificados como *Cladosporium* sp., *Canariomyces* sp. e *Hawksworthiomyces* sp.

Fonsecaea pedrosoi é um importante patógeno associado a cromoblastomicose, doença subcutânea que possui significativa associação a inoculação traumática com material ambiental (VICENTE et al., 2008; 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Essa espécie faz parte de um gênero que compreende oito espécies com morfologia muito similar, mas que diferem em virulência (VICENTE et al., 2008). Dentre essas espécies, quatro são consideradas

patogênicas para humanos, *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius*, duas são consideradas ambientais, *F. erecta* e *F. mínima*, uma é patogênica para felinos, *F. multimorphosa*, e uma causa a doença do caranguejo letárgico (LCD), *F. brasiliensis* (VICENTE et al., 2012; GOMES et al., 2016).

As espécies patogênicas dificilmente são isoladas do ambiente, o que pode ter relação com a baixa carga fúngica presente no substrato ou também com a presença maciça de outros fungos que apresentam melhor capacidade de crescimento em cultura, o que tornaria o isolamento de *Fonsecaea* spp. mais complexo, uma vez que apresentam crescimento lento em cultura. Devido a dificuldade de isolamento, ferramentas alternativas têm sido sugeridas para esclarecer a presença ou ausência de leveduras negras em diversos substratos, sendo a metagenômica uma dessas alternativas, uma vez que possibilita a elucidação da diversidade microbiana do substrato estudado sem a necessidade de isolamento prévio (HANDELSMAN et al., 1998). Além disso, alguns autores sugerem a necessidade de um animal que atue como vetor, transportando os propágulos fúngicos de um material contaminado para outro até então sem a presença do fungo (SALGADO et al., 2004; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). O isolamento de *F. pedrosoi* a partir do ninho de cupins demonstra que essa é uma hipótese plausível, pois supõem-se que os micro-organismos encontrados no interior dos ninhos normalmente são transportados pelos operários juntamente com o material vegetal utilizado para alimentação ou no próprio corpo dos insetos (ZOBERI e GRACE, 1990; MATHEW et al., 2012).

Raros são os relatos de isolamento de *F. pedrosoi* a partir de material ambiental (VICENTE et al., 2001; 2008; 2013), sendo que em alguns relatos a identificação foi baseada em morfologia o que não assegura a correta identificação. Salgado et al. (2004) isolaram *F. pedrosoi* de espinhos de *Mimosa pudica* associada pelo paciente como fonte de trauma, porém a identificação molecular não foi realizada. Iwatsu, Miyaji e Okamoto (1981) afirmam ter isolado *F. pedrosoi* de madeira apodrecida, identificada por características morfológicas, biológicas e serológicas, inclusive realizando testes de patogenicidade em ratos e obtendo estruturas semelhantes a corpos muriformes no tecido. Marques et al. (2006) realizaram o isolamento de leveduras negras de material ambiental relacionado a coco babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) e isolaram *F. pedrosoi* de amostra de cascas e de matéria vegetal, ambos em decomposição, porém a identificação também foi realizada

somente a partir de características morfológicas. No estudo realizado por Vicente et al. (2013) foram isoladas duas linhagens de *F. pedrosoi* a partir de madeira apodrecida coletada nos fundos da casa de paciente com cromoblastomicose, sendo a identificação feita com sequenciamento da região ITS, *BT2* e *TEF1*.

Rhinocladiella similis pertence ao clado spinifera, juntamente com espécies do gênero *Exophiala* e outras espécies de *Rhinocladiella* (ZENG; DE HOOG, 2008). Essa levedura negra foi anteriormente isolada de solo, superfícies de banheiro (MADRID et al., 2016), água utilizada para hemodiálise (FIGEL et al., 2013), água de torneira e de lençóis freáticos (BABIC et al., 2017). Além do isolamento ambiental, *R. similis* foi isolada de amostras clínicas a partir de lesão de cromoblastomicose (HEIDRICH et al., 2017), sendo que outras espécies do gênero *Rhinocladiella* também são relacionadas com o desenvolvimento de cromoblastomicose, *R. aquaspersa*, considerada um agente clássico, porém raro (HEIDRICH et al., 2017), *R. tropicalis*, no Brasil (GOMES et al., 2016) e *R. phaeophora*, na Tailândia (KAMPIRAPAP et al., 2015).

Leveduras negras do gênero *Exophiala* têm sido relacionadas com ambientes pobres em nutrientes, como água limpa, solo e madeira tratada com creosoto, gasolina, instalações de vapor, fontes termais, saunas, piscinas, máquinas de lavar (PRENAFETA-BOLDU; SUMMERBELL; HOOG, 2006; TEIXEIRA et al., 2017). Determinadas espécies de *Exophiala* são conhecidas como patógenos humanos, causando cromoblastomicose (*E. jeanselmei*), feohifomicose (*E. lecanii-corni*, *E. spinifera*, *E. xenobiotica* e *E. dermatitidis*) e em alguns casos apresentando neurotropismo primário (*E. dermatitidis*). Especificamente, *E. xenobiotica* é considerada um oportunista para humanos, sendo seu potencial patogênico embasado por sua proximidade filogenética com *E. spinifera*, um conhecido patógeno associado a lesões subcutâneas (DE HOOG et al., 2006). Um estudo realizado por Zeng et al. (2007) demonstrou que mais de 40% das infecções por *Exophiala* são causadas por membros do clado spinifera (ZENG; DE HOOG, 2008). Pouco se sabe até o momento sobre a virulência de *E. xenobiotica*, contudo infecções leves a moderadas, cutâneas ou superficiais têm sido frequentemente associadas a essa espécie (DE HOOG et al., 2006; MORIO et al., 2012).

Cyphellophora é o único gênero que compõe a família Cyphellophoraceae e as espécies pertencentes a esse gênero são encontradas em diversos ambientes, como detritos de plantas, substratos abióticos, inclusive em ninhos de formigas e

causando micoses superficiais em humanos (GAO et al., 2015; GOMES et al., 2016). As espécies normalmente associadas com micoses cutâneas são *C. laciniata*, *C. pluriseptata*, *C. suttonii* e *C. europaea*, além dessas, recentemente foi descrita a espécie *C. ludoviensis*, a partir de lesão de cromoblastomicose, sendo essa considerada a única espécie do gênero a formar corpos muriformes no tecido do hospedeiro (FENG et al., 2012; GAO et al., 2015; GOMES et al., 2016), enquanto *C. guyanensis*, *C. oxyspora*, *C. olivacea* e *C. sessilis* são consideradas espécies ambientais (GAO et al., 2015). Com a análise da sequência ITS foi possível identificar o isolado CMRP 3103 somente a nível de gênero, sendo necessário o sequenciamento da região da β -tubulina para determinação da espécie.

Em relação ao isolado de *Cladosporium* encontrado neste estudo, de acordo com a literatura algumas espécies são consideradas oportunistas para humanos, tais como *C. cladosporioides*, *C. halotolerans*, *C. herbarum*, *C. oxysporum*, *C. sphaerospermum*, *C. asperulatum*, *C. funiculosum*, *C. flabelliforme*, *C. pseudocladosporioides*, *C. subuliforme* e *C. tenuissimum*, sendo *C. cladosporioides* e *C. oxysporum* associados a feohifomicose (SANDOVAL-DENIS et al., 2016; MENEZES; PÉREZ; LIMA, 2017).

O isolado CMRP 3119 foi identificado como *Cladosporium* sp., ficando agrupado juntamente com *C. colocasiae* e *C. tenuissimum*, porém não foi possível determinar a espécie utilizando somente a região ITS, para isso se faz necessário o sequenciamento da região do fator de alongação 1 (*TEF1*) e da actina (*ACT*). É interessante ressaltar que, de acordo com Sandoval-Denis et al. (2016), *C. tenuissimum* é considerado um patógeno oportunista para humanos e a proximidade do isolado CMRP 3119 pode indicar capacidade de patogenicidade por parte deste isolado.

Os isolados CMRP 3080 e CMRP 3081 não puderam ser identificados utilizando as regiões ITS e LSU visto que a proximidade com *Canariomyces notabilis* apresenta ramos longos, o que indica a ocorrência de um grande número de mutações entre essas espécies. Análises complementares utilizando outras regiões gênicas serão realizadas buscando estabelecer a correta identificação destes isolados.

O isolado CMRP 3102 foi identificado preliminarmente por micromorfologia como *Sporothrix* sp. e a partir disso foi procedida a análise filogenética do isolado utilizando a região ITS de sequências do gênero *Sporothrix*. A análise dessa árvore indicou o agrupamento do isolado com *S. lignivora*. Contudo, de acordo com de Beer

et al. (2016), *S. lignivora* forma uma linhagem completamente distante dos outros grupos da família Ophiostomatales, inclusive do gênero *Sporothrix*, o que levou a uma reclassificação da espécie em um novo gênero, *Hawksworthiomyces*, que inclui outros três isolados de *S. lignivora*, agora *H. lignivorous*, além de isolados identificados previamente como *Sporothrix* sp., *Leptographium* sp. e fungos com culturas não disponíveis. A nova classificação definiu as espécies como *H. lignivorous*, *H. taylorii*, *H. hibbettii*, *H. sequentia*, *H. crousii*, além de *Hawksworthiomyces* sp. A análise filogenética com base no sequenciamento das regiões ITS e LSU indicou que o isolado *Hawksworthiomyces* sp. (CMRP 3102) não se agrupou com nenhum taxon anteriormente descrito, o que pode indicar se tratar de uma nova espécie, contudo, uma análise mais específica é necessária para assegurar a posição taxonômica deste isolado.

Com relação ao gênero *Hawksworthiomyces*, as espécies relacionadas foram isoladas de madeira ou outros materiais vegetais em decomposição e de solo, sendo que os autores supõem que todas as espécies do gênero possuem capacidade de degradar componentes da madeira. O que é mais um indicativo de que essas espécies pertencem a um gênero distinto, pois os demais indivíduos da família Ophiostomatales colonizam plantas vivas ou solo, apresentam pequena capacidade de degradação de lignina, além de algumas espécies serem patógenos humanos e de felinos, causando a esporotricose (de Beer et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Com base nos achados deste estudo pode-se afirmar que, apesar da frequência de isolamento não ser alta, o que está de acordo com a literatura consultada, leveduras negras consideradas oportunistas para humanos, incluindo *Fonsecaea pedrosoi*, principal causador de cromoblastomicose no Brasil, estão presentes no exoesqueleto de insetos sociais, e também em seus ninhos, sendo que estes podem desempenhar o papel de vetores, contribuindo para a dispersão destes fungos na natureza.

REFERÊNCIAS

- AANEN, D. K. et al. Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 115, 2007. doi:10.1186/1471-2148-7-115.
- ATTILI-ANGELIS, D. et al. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, v. 65, p. 65-75, 2014.
- BABIC, M. N. et al. Ecology of the Human Opportunistic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Indicates Preference for Human-Made Habitats. **Mycopathologia**, 2017. DOI 10.1007/s11046-017-0134-8.
- BARON, N. C. Micro-fungos de interesse para o setor de petróleo, gás e biocombustíveis. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.
- BRANDT, M. The scent of supercolonies: the discovery, synthesis and behavioural verification of ant colony recognition cues. **BMC Biology**, v. 7, p. 71, 2009.
- DE BEER, W., et al., *Hawksworthiomyces* gen. nov. (Ophiostomatales), illustrates the urgency for a decision on how to name novel taxa known only from environmental nucleic acid sequences (ENAS). **Fungal Biology**, v. 120, p. 1323-40, 2016.
- DE HOOG, G.S., et al., *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90(3), p. 257-68, 2006.
- DE HOOG, G. S., et al. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded Animals. **Persoonia**, v. 27, p. 46-72, 2011.
- DUARTE, A. P. M., et al., Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2014, doi:10.1007/s10482-014-0215-3.
- FENG, P. et al. *Cyphellophora* and its relatives in *Phialophora*: biodiversity and possible role in human infection. **Fungal diversity**, 2012. doi 10.1007/s13225-012-0194-5.
- FIGEL, I. C. et al. Black yeasts-like fungi isolated from dialysis water in hemodialysis units. **Mycopathologia**, v. 175(5-6), p. 413-20, 2013. doi: 10.1007/s11046-013-9633-4.
- GAO, L. et al. Three New Species of *Cyphellophora* (Chaetothyriales) Associated with Sooty Blotch and Flyspeck. **PLoS One**, v. 10 (9): e0136857, 2015.
- GILLIAM, M; PREST, D. B.; MORTON, H. L. Fungi Isolated from Honey Bees, *Apis*

mellifera, Fed 2,4-D and Antibiotics. **Journal of invertebrate pathology**, v. 21, 213-17, 1974.

GOMES, R. R. et al., Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10(11): e0005102, p. 1-20, 2016, doi:10.1371/journal.pntd.0005102.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5 (10), p. R245-R249, 1998.

HEIDRICH, D. et al. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report. **Medical Mycology Case Reports**, v. 16, p. 25-27, 2017.

IWATSU, T.; MIYAJI, M; OKAMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, v. 75 (3), p. 149-58, 1981.

JAGIELSKI, T., et al., Molecular taxonomy of scopulariopsis-like fungi with description of new clinical and environmental species, **Fungal Biology**, v. 120(4), p. 586-602, 2016, doi: 10.1016/j.funbio.2016.01.014.

KAMPIRAPAP, K et al. Chromoblastomycosis masquerading as dermatophytosis, with the description of a new opportunistic species. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 46(1), p. 105-09, 2015.

KELLER, K. M. et al. Fungi infection in honeybee hives in regions affected by Brazilian sac brood. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66 (5), p.1471-78, 2014.

KRZYSCIĄK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, P.; PIASZCZYŃSKI, M., Chromoblastomycosis, **Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 5, p. 310-21, 2014.

MADRID, H. et al. New and interesting chaetothyrialean fungi from Spain. **Mycol Progress**, 2016. doi 10.1007/s11557-016-1239-z.

MARQUES, S. M. et Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47(4), p. 305-11, 2006.

MATHEW, G. M. et al. Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes formosanus*: the implication of *Bacillus* as mutualists. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 79, p. 504-17, 2012.

MENEZES, C. P.; PÉREZ, A. L. A. L.; LIMA, E. O. *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis** v. 1(1), p. 23-27, 2017.

MORIO, F. et al. Phaeohyphomycosis due to *Exophiala xenobiotica* as a cause of fungal arthritis in an HIV-infected patient. **Medical Mycology**, v. 50, p. 513-17, 2012.

- NASCIMENTO, M. M. F. et al. Diversity of opportunistic black fungi on babassu coconut shells, a rich source of esters and hydrocarbons. **Fungal Biology**, v.121, p. 488-500, 2017.
- PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, pg. 517-26, 2008.
- PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. et al. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. **Mycological Research**, v. 105, n. 4, p. 477–484, 2001.
- PRENAFETA-BOLDU, F. X.; SUMMERBELL, R.; DE HOOG, G. S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? **Federation of European Microbiological Societies**, v. 30, p. 109-130, 2006.
- QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, 2017.
- SALGADO, C. G., et al., Isolation Of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa Pudica*, a Probable Natural Source of Chromoblastomycosis, **Rev. Inst. Med Trop S. Paulo**, v. 46(1), p. 33-36, 2004.
- SAMAL, D.; SETHY, J.; SAHU, H.K. Isolate of Fungi Associated with Dead Honey Bee. **Journal of Wildlife Research**, v. 2(4), p. 31-38, 2014.
- SANDOVAL-DENIS, M. et al. *Cladosporium* Species Recovered from Clinical Samples in the United States. **J Clin Microbiol.**, v. 53(9), p. 2990-3000, 2015. doi: 10.1128/JCM.01482-15.
- SANDOVAL-DENIS, M., et al., New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections, **Persoonia**, v. 36, p. 281-98, 2016.
- VASSE, M. et al. A phylogenetic perspective on the association between ants (Hymenoptera Formicidae) and black yeasts (Ascomycota: Chaetothyriales). **Proc. R. Soc. B**, v. 284: 20162519, 2017.
- VICENTE, V. A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–44, 2008. doi:10.3114/sim.2008.61.14.
- VICENTE, V. A. et al. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 109-22, 2012.
- VICENTE, V. A. et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2013. doi: 10.1007/s13225-013-0246-5.
- VINHA, G. G. SISTEMÁTICA MOLECULAR de *Atta laevigata* (Smith 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

- TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology** v. 86, p. 1–28, 2017.
- WOUDENBERG, J. H. C., et al., *Scopulariopsis* and scopulariopsis-like species from indoor environments, *Studies in Mycology*, v. 88, p. 1-35, 2017.
- ZENG, J. S. et al. Spectrum of Clinically Relevant *Exophiala* Species in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45(1), p. 3713-20, 2007.
- ZENG, J. S.; DE HOOG, G. S. *Exophiala spinifera* and its allies: diagnostics from morphology to DNA barcoding. **Medical Mycology**, v. 46, p. 193-208, 2008.
- ZIJLSTRA, E. E. et al. Mycetoma: a unique neglected tropical disease. *Lancet Infect Dis*, v. 16, p. 100-12, 2016.
- ZOBERI, M. H.; GRACE, K. Fungi associated with the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* in Ontario. **Mycologia**, v. 82(3), p. 289-94, 1990.

CAPÍTULO III: DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo dessa dissertação foi avaliar a ocorrência de leveduras negras, principalmente as espécies causadoras de cromoblastomicose, como as pertencentes aos gêneros *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Cyphellophora*, *Rhinochadiella* e *Phialophora*, em insetos sociais, especificamente formigas (*Atta laevigata*), abelhas (*Melipona flavolineata* e *Scaptotrigona postica*) e cupins (*Nasutitermes* sp.), além de material associado ao ninho de cupins, coletados nos estados do Maranhão e do Pará, áreas endêmicas para a doença.

No capítulo II da presente dissertação é detalhado o isolamento de leveduras negras e fungos dematiáceos a partir dos insetos analisados, apresentando um total de oito isolados, sendo cinco leveduras negras e três fungos dematiáceos.

Dentre as leveduras negras isoladas, quatro são consideradas patogênicas ou apresentam potencial patogênico, são elas: *Fonsecaea pedrosoi*, *Rhinochadiella similis*, *Exophiala xenobiotica* e *Cyphellophora* sp. *F. pedrosoi* e *R. similis* são conhecidos patógenos causadores de cromoblastomicose em humanos, sendo *F. pedrosoi* o principal agente causador da doença no Brasil (VICENTE et al., 2013; GOMES et al., 2016; HEIDRICH et al., 2017). Também estão associadas à cromoblastomicose leveduras negras dos gêneros *Exophiala* e *Cyphellophora*, principalmente *E. dermatitidis* e *C. ludoviensis* (GOMES et al., 2016; DE AZEVEDO et al., 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Uma das leveduras negras isoladas, *Cladosporium* sp., não apresenta relatos na literatura como causadora de cromoblastomicose, contudo algumas espécies do gênero são consideradas oportunistas, inclusive relacionadas com casos de feohifomicose, como *C. cladosporioides* e *C. oxysporum* (SANDOVAL-DENIS et al., 2016; MENEZES; PÉREZ; LIMA, 2017). Apesar disso, a maioria dos relatos de isolamento de *Cladosporium* sp. são a partir de amostras ambientais, sendo esse gênero isolado de diversos ambientes, principalmente de solo e material vegetal (SANDOVAL-DENIS et al., 2015; 2016). Também é um dos principais gêneros isolados de insetos e substratos associados a eles, como formigas (BARON, 2011; Duarte et al., 2014), cupins (ZOBBERI e GRACE, 1990) e abelhas (GILLIAM, PREST e MORTON, 1974; KELLER et al., 2014).

Dos outros três fungos dematiáceos isolados dois foram identificados preliminarmente como *Canariomyces* sp. e um como *Hawksworthiomyces* sp. Contudo, mais análises são necessárias para embasar a posição taxonômica destes isolados e se são espécies não descritas até o presente momento. Com relação ao

isolado identificado como *Hawksworthiomyces* sp., trata-se de um gênero recentemente descrito e se acredita que esteja fortemente relacionado com a capacidade de degradação de madeira e substratos ambientais, uma vez que as espécies deste gênero foram isoladas de madeira ou outros materiais vegetais em decomposição, e também, do solo (de Beer et al., 2016). Essa capacidade de degradação pode ter relação com o isolamento desse fungo a partir do exoesqueleto de cupins neste estudo, já que se sabe que cupins estabelecem relações de simbiose com micro-organismos capazes de degradar lignina e outros componentes da madeira para otimização do processo de obtenção de alimentos (AANEN et al., 2007).

A fim de obter a identificação completa dos quatro isolados em que não foi possível determinar a espécie com o sequenciamento da região ITS serão utilizadas regiões gênicas complementares específicas sendo utilizados os iniciadores *BT2*, *CAL*, *TEF1* e *ACT*.

O isolamento de leveduras negras a partir de insetos é complexo e estudos relatam que mesmo utilizando técnicas de isolamento seletivo, como flotação em óleo mineral (DUARTE et al., 2014) e enriquecimento seletivo com hidrocarbonetos (tolueno) (NASCIMENTO et al., 2017), ocorre o desenvolvimento de fungos hialinos e dematiáceos, que não leveduras negras, o que é um complicador visto que esses micro-organismos geralmente apresentam crescimento rápido em cultura, o que pode impedir o crescimento de leveduras negras, devido ao crescimento por toda a superfície do meio, ou tornar o processo de purificação bastante árduo.

Para estudar a patogenicidade do isolado CMRP 3076 (*F. pedrosoi*) será feita uma suspensão de esporos do isolado (10^6), além de dois grupos controle (sem inóculo e com inóculo de PBS). A suspensão será inoculada em larvas de *Tenebrio molitor* e as larvas serão mantidas no escuro e a 37°C até a metamorfose até besouro, sendo realizada a análise de sobrevivência e mortalidade, de melanização, número de unidades formadoras de colônias e de histologia, após 4, 24, 72, 168, 240 horas. Após a metamorfose, serão coletados 3 besouros por grupo e após a maceração dos insetos será procedido o isolamento pela técnica de flotação em óleo mineral. Espera-se a recuperação do isolado inoculado após o ciclo de vida de *T. molitor* estar completo.

Também será procedido um estudo da virulência em ratos visando obter corpos muriformes no tecido murino a partir da inoculação do isolado CMRP 3076 no

tecido subcutâneo dos ratos, assim confirmando o potencial patogênico, como agente de cromoblastomicose, do isolado em questão.

Como conclusão, a hipótese de que os insetos podem transportar leveduras negras, funcionando como vetores desses micro-organismos, pode ser confirmada uma vez que, apesar da baixa frequência de isolamento, foi possível isolar e identificar espécies de leveduras negras conhecidas como agentes causais de cromoblastomicose a partir do exoesqueleto dos insetos estudados e de material do ninho, notoriamente *Fonsecaea pedrosoi*, que é o principal causador da doença no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AANEN, D. K. et al. The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99 (23), p. 14887-92, 2002.
- AANEN, D. K. et al. Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 115, 2007. doi:10.1186/1471-2148-7-115.
- ALMEIDA, C. S. Forrageio Em *Nasutitermes Aff. Coxipoensis*: Comportamento e Estratégias Em Relação À Disponibilidade De Recursos. 2016. Disponível em: https://www.sigaa.ufs.br/sigaa/public/programa/noticias_desc.jsf?lc=lc=lc=pt_BR&id=225¬icia=183117664. Acesso em: 05 mar. 2018.
- ATTILI-ANGELIS, D. et al. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, v. 65, p. 65-75, 2014.
- BABIC, M. N. et al. Ecology of the Human Opportunistic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Indicates Preference for Human-Made Habitats. **Mycopathologia**, 2017. DOI 10.1007/s11046-017-0134-8.
- BARON, N. C. Micro-fungos de interesse para o setor de petróleo, gás e biocombustíveis. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.
- BONIFAZ, A. et al. Tinea nigra by *Hortaea werneckii*, a report of 22 cases from Mexico. **Stud. Mycol.**, v. 61, p. 77-82, 2008.
- BRANDT, M. The scent of supercolonies: the discovery, synthesis and behavioural verification of ant colony recognition cues. **BMC Biology**, v. 7, p. 71, 2009.
- CALDERA, E. J. Insect Symbioses: A Case Study of Past, Present, and Future Fungus-growing Ant Research. **Entomological Society of America**, v. 38(1), p. 78-92, 2009.
- COLDIRON, B.M., WILEY, E.L. & RINALDI, M.G. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by a rare fungal pathogen, *Hormonema dematioides*: successful treatment with ketoconazole. **J. Am. Acad. Derm.**, v. 23, p. 363-67, 1990.
- CASTRO, R. J. A. et al. The Major Chromoblastomycosis Etiologic Agent *Fonsecaea pedrosoi* Activates the NLRP3 Inflammasome. **Frontiers in Immunology**, v. 8:1572, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01572.
- COSTA, A. N. Efeitos Diretos e Indiretos das Formigas Cortadeiras de Folha (*Atta*) sobre a Dinâmica da Vegetação de uma Savana Neotropical. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- DE AZEVEDO, C. M. P. S. et al. *Fonsecaea pugnacius*, a Novel Agent of

Disseminated Chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53 (8), p. 2674-85, 2015.

DE BEER, Z. W. et al. *Hawksworthiomyces* gen. nov. (Ophiostomatales), illustrates the urgency for a decision on how to name novel taxa known only from environmental nucleic acid sequences (ENAS). **Fungal Biology**, v. 120, p. 1323-40, 2016.

DE BRITO, J. S. et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3 (2), p. 11-92, 2016.

DE HOOG, G.S., et al., *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90(3), p. 257-68, 2006.

DE HOOG, G. S. et al. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 219–34, 2007. doi:10.3114/sim.2007.58.08.

DE HOOG, G. S., et al. Waterborne Exophiala species causing disease in cold-blooded Animals. **Persoonia**, v. 27, p. 46-72, 2011.

DE HOOG, G. S., et al. Atlas of Clinical Fungi, 4^a ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht/Universitat. **Rovira i Virgili, Reus**. 2014.

DEVELOUX, M. et al. Madura foot caused by *Rhinochlamydia atrovirens*. **Abstr. 12th ISHAM Congr.**, Adelaide, p. D79. 1994.

DUARTE, A. P. M., et al., Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2014, doi:10.1007/s10482-014-0215-3

ELEOTÉRIO, E. S. R. Levantamento E Identificação De Cupins (Insecta: Isoptera) Em Área Urbana De Piracicaba, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

FENG, P. et al. *Cyphellophora* and its relatives in *Phialophora*: biodiversity and possible role in human infection. **Fungal diversity**, 2012. doi 10.1007/s13225-012-0194-5.

FIGEL, I. C. et al. Black yeasts-like fungi isolated from dialysis water in hemodialysis units. **Mycopathologia**, v. 175(5-6), p. 413-20, 2013. doi: 10.1007/s11046-013-9633-4.

FRIZZO, T. L. M. Mudanças do uso da terra sobre a comunidade de formigas e a retenção dos serviços ecossistêmicos no Cerrado. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2016.

FURUIE, J. L. Desenvolvimento De Sonda Cadeado Para Diagnóstico Molecular De *Histoplasma capsulatum* Baseado Na Técnica De Amplificação Em Círculo Rolante (Rca). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal do Paraná, 2014.

GAO, L. et al. Three New Species of *Cyphellophora* (Chaetothyriales) Associated with Sooty Blotch and Flyspeck. **PLoS One**, v. 10 (9): e0136857, 2015.

GIOVANELLA, R. Influência Do Campo Eletromagnético No Comportamento De Cupins De Madeira Seca (*Cryptotermes Brevis*). Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2013.

GILLIAM, M; PREST, D. B.; MORTON, H. L. Fungi Isolated from Honey Bees, *Apis mellifera*, Fed 2,4-D and Antibiotics. **Journal of invertebrate pathology**, v. 21, 213-17, 1974.

GOMES, M. R. Características Da Infestação de Cupins (insecta, isoptera) Em Área de Preservação Ecológica E Sugestões De Medidas de Manejo. Monografia (Especialização em Entomologia Urbana) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2010.

GOMES, R. R. et al., Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10(11): e0005102, p. 1-20, 2016, doi:10.1371/journal.pntd.0005102.

HAIFIG, I. Morfofisiologia Das Castas E Forrageamento Do Cupim De Cerrado *Velocitermes heteropterus* (Isoptera: Termitidae). 2013. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/106578/haifig_i_dr_rcla.pdf?sequence=1

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5 (10), p. R245-R249, 1998.

HE, F. et al. *Knufia aspidiotus* sp. nov., a new black yeast from scale insects. **Phytotaxa**, v. 153 (1), p. 39-50, 2013.

HEIDRICH, D. et al. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report. **Medical Mycology Case Reports**, v. 16, p. 25-27, 2017.

ITO, M.; IWATSU, T. A case of chromoblastomycosis caused by *Phialophora verrucosa*. **Jpn. J. Clin. Dermatol.**, v. 39, p. 435-39, 1985.

IWATSU, T.; MIYAJI, M; OKAMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, v. 75 (3), p. 149-58, 1981.

JAGIELSKI, T., et al., Molecular taxonomy of scopulariopsis-like fungi with

description of new clinical and environmental species, **Fungal Biology**, v. 120(4), p. 586-602, 2016, doi: 10.1016/j.funbio.2016.01.014.

KAMPIRAPAP, K et al. Chromoblastomycosis masquerading as dermatophytosis, with the description of a new opportunistic species. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 46(1), p. 105-09, 2015.

KELLER, K. M. et al. Fungi infection in honeybee hives in regions affected by Brazilian sac brood. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66 (5), p.1471-78, 2014.

KENT, D., et al. Fungemia due to *Hormonema dematioides* following intense avian exposure. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 759-60, 1998.

KHAN, S. et al. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: an old wine in a rare bottle. **The Journal of infection in Developing Countries**, v. 9(3), p. 325-329, 2015. doi:10.3855/jidc.5312.

KIMURA, M. et al. Multifocal subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Phialophora verrucosa*. **Arch. Path. Lab. Med.**, v. 127, p. 91-93, 2003.

KRZYSCIAK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYNSKA, P.; PIASZCZYNSKI, M., Chromoblastomycosis, **Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 5, p. 310-21, 2014.

KOO, S.; KLOMPAS, M.; MARTY, F. M. *Fonsecaea monophora* cerebral phaeohyphomycosis: case report of successful surgical excision and voriconazole treatment and review. **Medical Mycology**, v. 48(5), p. 769-74, 2010. doi:10.3109/13693780903471081.

LI, D. M. et al. *Coniosporium epidermidis* sp. nov., a new species from human skin. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 131–36, 2008. doi:10.3114/sim.2008.61.13.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black Yeast Symbionts Compromise the Efficiency of Antibiotic Defenses in Fungus-Growing Ants. **Ecology**, v. 89, n. 5, p. 1216–1222, 2008.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology letters**, v. 3, n. 5, p. 501–504, 2007.

LIU, X. Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Stud. Mycol.**, v. 81, p. 85-147, 2015.

MACEDO, R. C. Toxicidade Do Acetamiprido E Dimetoato Para Abelha *Scaptotrigona postica* Latreille, 1804. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MADRID, H. et al. New and interesting chaetothyrialean fungi from Spain. **Mycol Progress**, 2016. doi 10.1007/s11557-016-1239-z.

MAKONDE, H. A. et al. Diversity of *Termitomyces* Associated with Fungus-Farming Termites Assessed by Cultural and Culture-Independent Methods. **Proceedings of**

the **National Academy of Sciences**, v. 8 (2): e56464, 2013. e56464.
doi:10.1371/journal.pone.0056464.

MARQUES, S. M. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47(4), p. 305-11, 2006.

MATHEW, G. M. et al. Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes formosanus*: the implication of *Bacillus* as mutualists. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 79, p. 504-17, 2012.

MAYER, V. E., VOGLMAYR, H., Mycelial Carton Galleries Of *Azteca brevis* (Formicidae) As A Multi-Species Network, **Proceeding Of The Royal Society B**, v. 276, p. 3265-73, 2009, doi:10.1098/rspb.2009.0768.

MENEZES, C. P.; PÉREZ, A. L. A. L.; LIMA, E. O. *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis** v. 1(1), p. 23-27, 2017.

MOREIRA, S. M. Morfometria de Rainhas do Gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae), Arquitetura Interna e Infecção Pelo Fungo Parasita *Escovopsis* de Ninhos Iniciais. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2013.

MORENO, L., F.; FENG, P.; WEISS, V. A.; VICENTE, V. A.; STIELOW, B.; DE HOOG, S. Phylogenomic analyses reveal the diversity of laccase-coding genes in *Fonsecaea* genomes. **PLoS ONE**, v. 12, e0171291, 2017.

MORETTI, C. J. Dinâmica populacional em populações de abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) no nordeste brasileiro. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

MORIO, F. et al. Phaeohyphomycosis due to *Exophiala xenobiotica* as a cause of fungal arthritis in an HIV-infected patient. **Medical Mycology**, v. 50, p. 513-17, 2012.

NAJAFZADEH, M.J. et al. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data, **Med Mycol**, v. 48(6), p. 800-6, 2010, doi: 10.3109/13693780903503081.

NAJAFZADEH, M. J. et al. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of Chaetothyriales isolated from a feline cerebral abscess. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1066-76, 2011a.

NAJAFZADEH, M. J. et al. Rapid identification of fungal pathogens by rolling circle amplification using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**, v. 54: e577–e582, 2011b.

NAJAFZADEH, M. J. et al. Molecular Epidemiology of *Fonsecaea* Species. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17(3), p. 464-69, 2011c.

NASCIMENTO, M. M. F. Ecologia Molecular de Leveduras Negras. Dissertação

(Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NASCIMENTO, M. M. F. et al. Diversity of opportunistic black fungi on babassu coconut shells, a rich source of esters and hydrocarbons. **Fungal Biology**, v.121, p. 488-500, 2017.

NEIVA, I. S. Diversidade e Comportamento de Abelhas (Hymenoptera: Apidae) Associadas aos Capítulos Florais de *Helianthus annuus* (Asterales: Asteraceae) em Ambientes Urbano e Rural. Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

NETO, C. M. S. A Importância Das Abelhas Para A Cultura Do Tomateiro. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

Ng, K.P. et al. The mycological and molecular study of *Hortaea werneckii* isolated from blood and splenic abscess. **Mycopathologia**, v. 159, p. 495-500, 2005.

OLIVEIRA, G. F. S. Controle Biológico De *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera:Termitidae) Por Fungos Entomopatogênicos: *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) (Sorokin), *Beauveria bassiana* (Balssamo) (Vuillemin), *Isaria javanica* (Frieder E Bally) E *Penicillium* sp. (Fleming) No Amazonas. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

OSTER, G. F.; WILSON, E. O. *Castes and Ecology in the Social Insects*. Princeton University Press, Princeton, 1978.

PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, pg. 517-26, 2008.

PARENTE J. N. et al. Subcutaneous phaeohyphomycosis in immunocompetent patients: two new cases caused by *Exophiala jeanselmei* and *Cladophialophora carrionii*. **Mycosis**, v. 54(3), p. 265-69, 2011.e

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. et al. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. **Mycological Research**, v. 105, n. 4, p. 477–484, 2001.

PRENAFETA-BOLDU, F. X; SUMMERBELL, R.; DE HOOG, G. S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? **Federation of European Microbiological Societies**, v. 30, p. 109-130, 2006.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: A Neglected Tropical Disease. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 57(19), p. 46-50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. DE C. L. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 477–488, 2013.

REIS, B. M. S. Fungal communities in gardens of the leafcutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of southern Bahia State (Brazil). **Fungal Biology**, v. 119, p. 1170-78, 2015.

REVANKAR, S. G. *Cladophialophora bantiana* brain abscess in an immunocompetent patient. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 22(4), p. 149-150, 2011.

REVANKAR, S. G., SUTTON, D. A., Melanized Fungi in Human Disease, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23(4), p. 884-928, 2010, doi:10.1128/CMR.00019-10.

RIBEIRO, P. L. Insetos Eusociais e o Desafio Para a Ideia de Seleção Natural. **Revista da Biologia**, v. 3, p. 6-8, 2009.

RICCI, I. et al. Mosquito/microbiota interactions: From complex relationships to biotechnological perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 278–284, 2012.

ROJAS, O. C. Chromoblastomycosis by *Cladophialophora carrionii* Associated with Squamous Cell Carcinoma and Review of Published Reports. **Mycopathologia**, v. 179 (1-2), p. 153-57, 2015.

ROULAND-LEFEVRE, C. Symbiosis with Fungi. In: Abe, T., Bignell, D.E. and Higashi, M., Eds., *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 289-306, 2000.

SALGADO, C. G., et al., Isolation Of *Fonsecaea pedrosoi* From Thorns of *Mimosa pudica*, A Probable Natural Source Of Chromoblastomycosis, **Rev. Inst. Med Trop S. Paulo**, v. 46(1), p. 33-36, 2004.

SAMAL, D.; SETHY, J.; SAHU, H.K. Isolate of Fungi Associated with Dead Honey Bee. **Journal of Wildlife Research**, v. 2(4), p. 31-38, 2014.

SANDOVAL-DENIS, M. et al. *Cladosporium* Species Recovered from Clinical Samples in the United States. **J Clin Microbiol.**, v. 53(9), p. 2990-3000, 2015. doi: 10.1128/JCM.01482-15.

SANDOVAL-DENIS, M., et al., New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections, **Persoona**, v. 36, p. 281-98, 2016.

SANTOS, A. A. Óleos Essenciais E Seus Constituintes Para O Controle De *Cryptotermes brevis* e *Nasutitermes corniger*: Vias De Exposição E Respostas Comportamentais. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.

SANTOS, A. L. S. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 31, p. 570–91, 2007.

SAUNTE, D. M. et al. Black yeast-like fungi in skin and nail: it probably matters. **Mycoses**, v. 55, p. 161–67, 2011. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02055.x.

SCHOCHA, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109(16), p. 6241–46, 2012.

SEYEDMOUSAVI, S. et al. Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27(3), p. 527–42, 2014.

SILVA, A. C. C., et al., Cromoblastomicose Produzida Por *Fonsecaea pedrosoi* No Estado Do Maranhão. I – Aspectos Clínicos, Epidemiológicos E Evolutivos, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25(1), p. 37-44, 1992.

SILVA, V. S. G. Comportamento De Forrageamento De *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) E Sua Ocorrência Em Áreas Urbanas. 2008. Disponível em:
http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PRODVEGETAL_3434_1223924180.pdf.

SILVEIRA F. A.; MELO, G. A. R; ALMEIDA, E. A. B. ABELHAS BRASILEIRAS: Sistemática e Identificação. Belo Horizonte, 2002.

SIQUEIRA, I. M. et al. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11(3): e0005461, 2017.

SLESÁK, G. et al. Chromoblastomycosis after a leech bite complicated by myiasis: a case report. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 14, 2011.

STEFANINI, I. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109 (33), p. 13398-03, 2012.

STERFLINGER, K. Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification. In: Péter G., Rosa C. (eds) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. doi: 10.1007/3-540-30985-3_20.

SUN, J. et al., Rapid Detection of Pathogenic Fungi Using Loop-Mediated Isothermal Amplification, Exemplified By *Fonsecaea* Agents Of Chromoblastomycosis, **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 19-24, 2010.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Cerebral phaeohyphomycosis due to *Rhinocladiella mackenziei* (formerly *Ramichloridium mackenziei*): a taxonomic update and review of the literature. **Med. Mycol.**, v. 48, p. 546-56, 2010.

TEIXEIRA, M. M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology** v. 86, p. 1–28, 2017.

THANH, V. N. et al. *Moniliella carnis* sp. nov. and *Moniliella dehoogii* sp. nov., two novel species of black yeasts isolated from meat processing environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 3088–94, 2012.

TURIANSKY, G.W. et al. *Phialophora verrucosa*: a new cause of mycetoma. **J. Am. Acad. Derm.**, v. 32, p. 311-15, 1995.

VASCONCELLOS, A. Ecologia e biodiversidade de cupins (Insecta, Isoptera) em remanescentes de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

VASSE, M. et al. A phylogenetic perspective on the association between ants (Hymenoptera Formicidae) and black yeasts (Ascomycota: Chaetothyriales). **Proc. R. Soc. B**, v. 284: 20162519, 2017.

VEIGA, J. C. Aptidão Reprodutiva e Acasalamentos em Condições Artificiais na Abelha sem Ferrão *Melipona flavolineata* Friese (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2015.

VICENTE, V. A. et al. Isolation of herpotrichiellacious fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 47-51, 2001.

VICENTE, V. A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–44, 2008. doi:10.3114/sim.2008.61.14.

VICENTE, V. A. et al. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 109-22, 2012.

VICENTE, V. A. et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2013. doi: 10.1007/s13225-013-0246-5.

VICENTE, V. A. et al. Comparative Genomics of Sibling Species of *Fonsecaea* Associated with Human Chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8:1924, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01924.

VINHA, G. G. SISTEMÁTICA MOLECULAR de *Atta laevigata* (Smith 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

VOGLMAYR, H. et al. The diversity of ant-associated black yeasts: Insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1077-91, 2011.

WILSON, E. O.; HÖLLDOBLER, B. Eusociality: Origin and consequences.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 102(38), p. 13367-13371, 2005. doi:10.1073/pnas.0505858102.

WOUDENBERG, J. H. C., et al., *Scopulariopsis* and scopulariopsis-like species from indoor environments, **Studies in Mycology**, v. 88, p. 1-35, 2017.

ZENG, J. S. et al. Spectrum of Clinically Relevant *Exophiala* Species in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45(1), p. 3713-20, 2007.

ZENG, J. S.; DE HOOG, G. S. *Exophiala spinifera* and its allies: diagnostics from morphology to DNA barcoding. **Medical Mycology**, v. 46, p. 193-208, 2008.

ZOBERI, M. H.; GRACE, K. Fungi associated with the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* in Ontario. **Mycologia**, v. 82(3), p. 289-94, 1990.

APÊNDICE

REAGENTES UTILIZADOS

Ágar Sabouraud Dextrose

Dextrose 40 g
Peptona 10 g
Ágar 15 g
Água destilada 1000 mL
Autoclavar por 20 min a 121°C.

Ágar Micosel

Dextrose 40g
Peptona 10g
Ágar 15g
Cicloheximida 0,5g
Cloranfenicol 0,05g
Água destilada 1000 mL
Autoclavar por 20 min a 121°C.

Ágar Aveia

Farelo de aveia 60 g
Ágar 15 g
Água destilada 1000 mL

Bater no liquidificador o farelo de aveia com a água destilada.
Filtrar com gaze.
Acrescentar o ágar.
Autoclavar por 20 min a 121°C.

CTAB

CTAB 2 g
NaCl 8,12 g
EDTA 4 mL
Tris 10 mL
PVP 10g
Água destilada 100 mL

CIA – Clorofórmio-álcool isoamílico

Clorofórmio 96 mL
Álcool isoamílico 4 mL

TBE 5X

Tris 54 g
Ácido bórico 27,5 g
EDTA 0,5M 20 mL

TBE 1X

TBE 5X 100 mL
Água ultrapura 400 mL

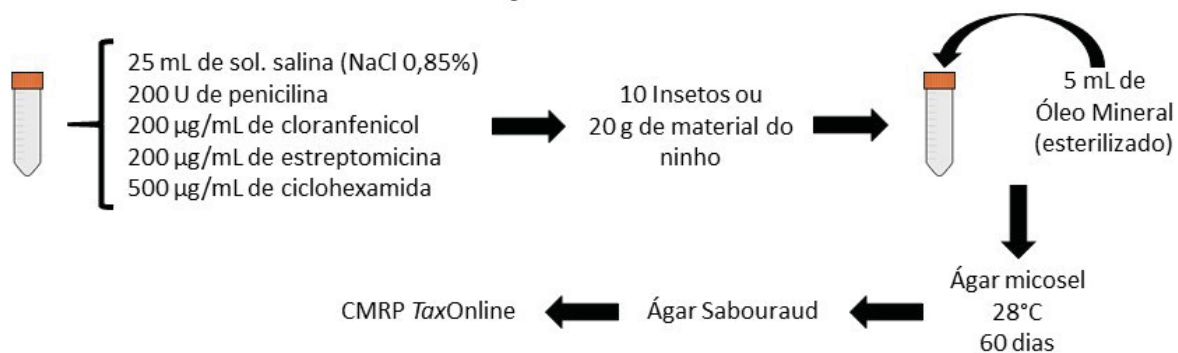
PBS

NaCl 137 mM;
KCl 2,7 mM;
Na₂HPO₄ 10 mM;
KH₂PO₄ 2 mM
Água destilada 1000mL

APÊNDICE

DIAGRAMA METODOLÓGICO – ISOLAMENTO

Flotação em Óleo Mineral



Enriquecimento Seletivo em compostos aromáticos voláteis

