

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**Caroline Souza e Vilasboas**

**“MORFOLOGIA E CLONABILIDADE DE  
*Paracoccidioides brasiliensis*”**

São José dos Campos, SP

2005

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**Caroline Souza e Vilasboas**

**“MORFOLOGIA E CLONABILIDADE DE  
*Paracoccidioides brasiliensis*”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega

São José dos Campos, SP

2005

V752m

Vilasboas, Caroline Souza e  
Morfologia e clonabilidade de *Paracoccidoides brasiliensis*  
Caroline Souza e Vilasboas. São José dos Campos: UniVap, 2005.  
105f.: il.; 30cm.

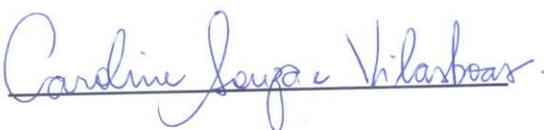
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa  
e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

1. Microbiologia 2. Biologia molecular I Nóbrega,  
Francisco Gorgônio, Orient. II Título

CDU: 579.2

Autorizo, exclusivamente par fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou  
parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:



São José dos Campos, 06 de dezembro de 2005.

**“MORFOLOGIA E CLONABILIDADE DE PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS”**

Caroline Souza e Vilasboas

Banca Examinadora:

Profa. Dra. MARIA ANGÉLICA GARGIONE CARDOSO (UNIVAP)



Prof. Dr. FRANCISCO G. DA NOBREGA (UNIVAP)



Profa. Dra. FLAVIA VILLAÇA MORAES (UNIVAP)



Prof. Dr. WALDEREZ GAMBALE (USP)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap  
São José dos Campos, 09 de setembro de 2005.

Dedico este trabalho aos meus maravilhosos pais, Angela e Antônio, e ao João Paulo.

## Agradecimentos

À FAPESP, pelo auxílio financeiro;

Ao meu orientador, Nóbrega, por acreditar em mim, incentivar, pelo modelo exemplar de pessoa e profissional.

Aos meus pais, sem o cuidado deles eu jamais estaria hoje onde estou;

Ao João Paulo (JP), por me incentivar e motivar sempre, principalmente quando as coisas não pareciam dar certo, pelos finais de semana que me ajudou no laboratório, pelos dias em que ficou até tarde comigo me ajudando nas “preps”, por tudo que me ensinou no laboratório, pela paciência! Mas principalmente pelo carinho, risadas, atenção e cuidado comigo!

Às minhas grandes amigas do laboratório: Flávia, Nami e Maria Angélica, pessoas com quem eu sempre pude contar, tanto no trabalho quanto na vida pessoal, e com quem eu aprendi e aprendo muito;

À Sônia, minha grande e inesquecível amiga, que me ajudou muito com sua amizade, competência e profissionalismo, transformando nosso ambiente de trabalho em um local bem descontraído;

À Elaininha, por sempre me ajudar quando precisei, com carinho;

À Kátia pelo auxílio nos microscópios, risadas e palavras de conforto nos momentos de estresse;

Ao Humberto pelas dicas, bom humor e leveduras emprestadas;

À Raquel pelo coleguismo, momentos de descontração e também pelas leveduras emprestadas;

À Professora Cristina e ao professor Newton, do Laboratório de Cultura de Células pela auxílio essencial na microscopia de fluorescência;

À Maria e Maria Alice pela amizade sincera, palavras de conforto e pelos momentos de descontração, sem esquecer do cafezinho da Maria, sem ele o laboratório não funciona!

Aos colegas: Chico, Tati, Carolina, Diógenes, Amanda, Adam e Andréa, pela convivência agradável, benéfica e pacífica no laboratório.

*Não deixe de fazer algo que gosta  
devido à falta de tempo, a única falta  
que terá, será desse tempo  
que infelizmente não voltará mais.*

*Mário Quintana*

# “MORFOLOGIA E CLONABILIDADE DE *Paracoccidioides brasiliensis*”

## Resumo

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico agente etiológico da paracoccidioidomicose, micose sistêmica de grande importância médica em vários países da América latina, em especial o Brasil, onde tem sido amplamente pesquisado. Neste trabalho, estudou-se a morfologia e fisiologia do fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* em diversos meios de cultivo e temperaturas, visando principalmente identificar condições ideais para obter células com morfologia de fácil dispersão e que se aplique à obtenção de clones via micromanipulação. Esta análise possibilitou a observação de diversas peculiaridades no desenvolvimento leveduriforme e filamentoso deste fungo, incluindo a observação de padrões atípicos de dimorfismo em determinadas condições de cultivo, bem como a escolha de determinados meios que induzem o desenvolvimento de células com a morfologia ideal à micromanipulação. Entre os clones obtidos, foi possível observar características morfológicas distintas, o que poderia apresentar uma evidência de que um isolado pode ser composto de colônias policlonais ou mesmo de mais de um tipo de isolado do mesmo fungo. Com a finalidade de detectar eventuais alterações genéticas que justificassem essas diferenças morfológicas, alguns clones morfológicamente distintos de Pb 18 foram selecionados e submetidos à extração de DNA para sua análise. Para tal, foram escolhidas 3 regiões, sendo uma referente ao DNA nuclear (pbGP43, gene que codifica para o principal antígeno deste fungo), e outras duas ao DNA mitocondrial, (região codificadora da proteína COX 2, subunidade 2 da citocromo oxidase e da região intergênica, entre os genes COX 1 e ATP 9). Ao final, comparando-se as seqüências dos clones entre si e seu isolado de origem, o Pb 18, não foram identificadas alterações nas regiões analisadas, mostrando que a análise destas regiões é insuficiente para fornecer justificativas moleculares para a morfologia distinta dos clones.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, morfologia, clonabilidade, variabilidade.

|

## "MORPHOLOGY AND CLONABILITY IN *Paracoccidioides brasiliensis* "

### **Abstract**

*Paracoccidioides brasiliensis* is a thermodimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis, a clinically important systemic mycosis in Latin America, especially in Brazil, where it has been widely investigated. In the present study, morphological and physiological aspects of this fungus were studied at various temperatures and different culture media, aiming to point the ideal conditions to obtaining cells presenting easy-dispersion morphology, what could be used for clone obtaining via micromanipulation. In this analysis was possible to observe some peculiarity in the yeast and filamentous development form of this fungus, including atypical dimorphism patterns at some specific culture conditions, as well as the choice of micromanipulation suitable morphological cell development inductive culture media. Also, it was possible to observe distinct morphological characteristics among the clones obtained, what could introduce the evidence that an isolate could be consisting of polyclonal colonies or even consisting of more than one isolate kind of the same fungus. With the purpose of detect genetic alterations that could justify these morphological differences, some morphologically distinct Pb 18 clones was selected and submitted to DNA extraction for analysis. For that, three DNA regions were chosen, being one in the nuclear DNA (pbGP43, main antigen codifying gene of this fungus), and two others in the mitochondrial DNA, (the protein COX 2 codifying region, the sub-unity 2 of cytochrome oxidase, and the intergenic region, between COX 1 and ATP 9). After comparing each other clone sequences and his original isolate, the Pb 18, any sequence alterations was detected, showing that the analysis of these regions was insufficient to provide any molecular evidence to justify the clones distinct morphology.

**Key-words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, morphology, clonability, variability.

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 1.1:** Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose. Fonte: Franco et al, 1994.

**Figura 3.1** - Mapa físico do genoma mitocondrial de *P. brasiliensis*.

**Fig. 4.1-** Aparência de *P. brasiliensis* nos 12 meios de cultura após cultivo por 15 dias a 36°C.

**Fig. 4.2-** Morfologia das colônias em fase miceliana de *P. brasiliensis*, cultivadas em diferentes meios após cerca 4 semanas.

**Fig. 4.3-** Colônias micelianas de *P. brasiliensis* em meio YPD10% Dextrose.

**Fig 4.4-** Principais características micromorfológicas de *P. brasiliensis* observadas nos meios sólidos a 36°C.

**Fig. 4.5-** Morfologia apresentada por *P. brasiliensis* em sua fase filamentosa em diferentes meios de cultivo

**Fig.4.6-** Colônia de *P. brasiliensis* originada por reversão a 36°C em meio de cultura ágar- Batata (20 dias).

**Fig. 4.7.** Acompanhamento da reversão em ágar batata.

**Fig. 4.8.** Acompanhamento da reversão em ágar- WO.

**Fig. 4.9-** *P. brasiliensis* cultivado em meio YPS sólido.

**Fig. 4.9-** *P. brasiliensis* cultivado em meio YPM sólido.

**Fig. 4.10-** *P. brasiliensis* cultivado em meio YPS líquido.

**Fig. 4.11-** *P. brasiliensis* cultivado em meio YPM líquido.

**Fig. 4.12-** Cultivo de *P. brasiliensis* em meio YPGal

**Fig. 4.13-** Variação micromorfológica de alguns clones obtidos de *P. brasiliensis* (isolado Pb 18) em sua fase leveduriforme cultivados por 5 dias em meio condicionado YPD líquido.)

**Fig. 4.14-** Isolado Pb 339 em sua fase leveduriforme.

**Fig. 4.15-** Isolado Pb AP em sua fase leveduriforme.

**Fig. 4.16-** Isolado Pb SS em sua fase leveduriforme.

**Fig. 4.17-** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo ampliações da região do DNA mitocondrial COX2 de 698pb.

**Fig. 4.18-** Gel de agarose 1% contendo ampliações do gene GP43 de 1326pb e da região intergênica mitocondrial de 875 pb.

**Fig. 4.19-** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, contendo material de amostras referentes à uma das minipreparações de DNA plasmidial realizadas e descritas em material e métodos.

**Fig. 4.20-** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, contendo o vetor recombinante ligado ao inserto COX2.

## LISTAS DE TABELAS

**Tabela 3.1-** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de amplificação (S)- Senso, (AS)- Anti-senso.

**Tabela 3.2-** Condições otimizadas para as reações de amplificação das regiões escolhidas.

**Tabela 4.1-** Características de *P. brasiliensis* (PB18) cultivado nos meios de líquidos indicados, a 36°C.

**Tabela 4.2-** Principais características macromorfológicas de *P. brasiliensis* em sua fase filamentosa, observadas durante o desenvolvimento em diferentes meios de cultura sólidos mantidos à temperatura ambiente.

**Tabela 4.3-** Principais características micromorfológicas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* cultivada a 36°C .

**Tabela 4.4-** Características morfológicas observadas nos diversos meios de cultivo sólidos.

**Tabela 4.5-** Principais características micromorfológicas observadas na fase filamentosa de *P. brasiliensis*.

**Tabela 4.6-** Variabilidade morfológica observada em alguns clones do isolado Pb18 em sua fase leveduriforme.

**Tabela 4.7-** Relação de clones de alguns isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* obtidos via micromanipulação e ultra-som.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
µg	microgramas
µL	microlitros
Amp	ampicilina
DIC	contraste diferencial de interferência
DAPI	4', 6- diamidino-2,4 fenilindol
dNTP	desoxinucleotídeo-trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
g	gramas
Kb	quilo bases
M	molar
mDNA	DNA mitocondrial
mg	miligrama
mL	mililitros
mM	milimolar
nuDNA	DNA nuclear
pb	pares de bases
PBS	saline fosfate buffer
PCR	reação de polimerização em cadeia
SDS	diodecil sulfato de sódio
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TE	tampão tris- EDTA
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
U.V	ultra violeta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

# SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Micoses Sistêmicas	1
1.2 Histórico da Paracoccidioidomicose	1
1.3 Epidemiologia da Paracoccidioidomicose	3
1.4 A Paracoccidioidomicose infecção	7
1.5 A Biologia de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : Dimorfismo, Reprodução e Cultivo	9
<b>2. Objetivos</b>	15
<b>3. Material e Métodos</b>	
3.1 Isolado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Empregado e sua Manutenção <i>in vitro</i> .	17
3.2. Meios de Cultura Utilizados	17
3.3 Cultivo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	24
3.4 Avaliação do Crescimento e Morfologia das Culturas	24
3.5 Obtenção de clones de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	27
3.5.1 Clonagem via micromanipulação	27
3.5.2 Clonagem via ultra-som e plaqueamento	28
3.6 Cultura e obtenção de massa leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>	29
3.7 Extração de DNA total de <i>P. brasiliensis</i>	30
3.8 Purificação do DNA com gradiente de cloreto de céσιο- separação do DNA nuclear do DNA mitocondrial	31
3.9 Quantificação do DNA	33
3.10 Amplificação de DNA por PCR (“polymerase chain reaction”)	34

3.11 Purificação do DNA	36
3.12 Clonagem	37
3.13 Preparo de células bacterianas competentes	37
3.14 Transformação bacteriana	38
3.15 Minipreparação de DNA plasmidial	40
3.16 Seqüenciamento do DNA	41
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>42</b>
4.1 Avaliação do crescimento e desenvolvimento da fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> em meios de cultura líquidos à 36°C.	42
4.2 Avaliação do crescimento de <i>P. brasiliensis</i> em fase miceliana	46
4.3 Análise Comparativa da Fase Leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> obtida nos 12 Diferentes Meios de Cultura Líquidos a 36°C.	51
4.4 Análise comparativa da fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> obtida nos diferentes meios de cultivo sólidos a 36°C.	57
4.5 Avaliação da micromorfologia de <i>P. brasiliensis</i> em sua fase filamentosa cultivada em diferentes meios sólidos à temperatura ambiente.	65
4.6 Dimorfismo incomum em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	74
4.7 Obtenção de Clones de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	82
4.8 Análise Molecular dos Clones de Pb 18	91
<b>5- Conclusões</b>	<b>96</b>
<b>Referências</b>	<b>98</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Micoses Sistêmicas

Os fungos que causam micoses sistêmicas são caracterizados por sua disseminação em todos os sistemas orgânicos. Porém as manifestações cutâneas causadas pelos fungos sistêmicos podem criar alguma confusão: os organismos podem ter produzido uma infecção sistêmica que se disseminou para a pele; ou então são capazes de provocar infecções cutâneas primárias sem manifestações sistêmicas evidentes. Muitos fungos oportunistas podem provocar doenças sistêmicas em condições favoráveis; por exemplo, em pacientes debilitados ou imunodeprimidos (KERN ; BLEVINS, 1999).

Os fungos mais associados às micoses sistêmicas são: *Blastomyces dermatitis*, agente da blastomicose; *Histoplasma capsulatum*, agente da histoplamose; *Coccidioides immitis*, agente da coccidioidomicose e, *Paracoccidioides brasiliensis*, causador da paracoccidioidomicose. Estes fungos apresentam dimorfismo, uma característica genética associada à sua patogenicidade, que consiste em uma adaptação morfofisiológica dependente de fatores intrínsecos e principalmente extrínsecos- os quais podem ser temperatura, alimento ou disponibilidade de oxigênio (MARESCA ; KOBAYASHI, 2000; SAN-BLAS *et al.*, 2002).

## 1.2 Histórico da Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose foi descrita inicialmente em 1908 por Adolpho Lutz na cidade de São Paulo no Brasil, o qual publicou suas observações na revista “Brasil Médico”, afirmando ter obtido o cultivo do parasita, a partir de lesões

ocorridas em indivíduos infectados. Após a descoberta da doença, iniciaram-se inúmeros registros de casos e tentativas de isolamento do fungo para sua caracterização (LACAZ, 1982).

De 1908 até 1915 Alfonso Splendore estudou numerosos casos de PCM, caracterizando melhor as culturas fúngicas e sugerindo em 1912 o nome *Zymonema brasiliensis* ao agente etiológico da paracoccidioidomicose (LACAZ, 1994). A doença passou então a ser denominada “blastomicose brasileira” e logo após, “blastomicose sul - americana”, devido aos casos observados em outros países da América do Sul. Outras sinônimas foram criadas como granulomatose blastomicóide neotropical, granuloma paracoccidióidico, adenomicose, doença de Lutz, estando hoje definida como paracoccidioidomicose (LACAZ, 1991).

Em 1927, o médico Floriano Paulo de Almeida passou a estudar o agente etiológico desta micose, diferenciando-o do fungo também patogênico *Coccidioides immitis* com o qual vinha sendo confundido. Em 1930, Almeida criou um novo gênero dentro do Reino Fungi- *Paracoccidioides*, revalidando a espécie *brasiliensis* criada anteriormente por Splendore. A partir de 1930, os estudos sobre a paracoccidioidomicose se intensificaram, devido a vários fatores como os avanços da imunologia; o aparecimento de drogas para o tratamento da doença; descoberta do dimorfismo de *P. brasiliensis*, o qual passou a ser analisado também pela microscopia eletrônica- o que possibilitou a visualização de estruturas internas auxiliando também na compreensão de sua biologia celular. Também, inúmeros estudos sobre a etiologia e etiopatogenia foram realizados (LACAZ, 1994).

Atualmente já há uma bibliografia expressiva (cerca de 950 trabalhos mencionam o nome do organismo, no PubMed do NCBI, setembro de 2005) sobre a

paracoccidioidomicose e seu agente etiológico, porém ainda existem muitos aspectos sobre sua biologia e fisiologia a serem explorados, em estudos clássicos ou moleculares. O gênero *Paracoccidioides* foi inserido por Ciferri e Redaelli (1936) na família Paracoccidioidaceae, porém Ajello (1977) classificou-o na família Moniliaceae, a qual compreende fungos mitospóricos como *Candida albicans*, *Oidium dermatitis*, *Aspergillus* e *Penicillium*, cujos conidióforos e conídios são hialinos e de cor brilhante (SILVEIRA, 1995).

Recentemente vem se aplicando técnicas de biologia molecular para o estudo do *P. brasiliensis*, estudos esses relevantes para o diagnóstico da paracoccidioidomicose, epidemiologia, fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, caracterização de alvos moleculares para a ação de antifúngicos e também contribuíram para a taxonomia (CISALPINO ; TRAVASSOS, 2002).

O emprego dessas técnicas, que iniciou-se principalmente a partir da década de 90 foi fator determinante para a reclassificação taxonômica de *P. brasiliensis*. Atualmente *P. brasiliensis* é classificado como um fungo mitospórico pertencente à ordem Onygenales (Mitosporic Onygenales, Onygenales, Eurotiomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi – NCBI TAXONOMY ID: 121759)

### **1.3 Epidemiologia da Paracoccidioidomicose**

Ao estudar a distribuição geográfica (Fig. 1.1) e comportamento epidemiológico da PCM, infere-se que esta é uma micose restrita ao continente americano, sendo circunscrita aos países latino-americanos (GREER; RESTREPO,1977), onde distribui-se de forma heterogênea, mesmo dentro das áreas endêmicas (WANKE ; LONDERO, 1994).

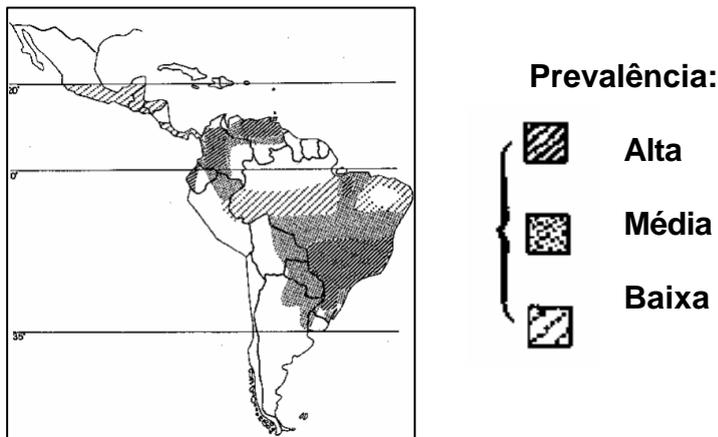


Fig. 1.1: Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose. Fonte: Franco *et al.*, 1994.

De acordo com Blotta *et al* (1999), o Brasil é o país onde registra-se o maior número de casos de paracoccidioidomicose, onde estima-se haver uma incidência anual de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes e uma significativa mortalidade de 0,14:100.000 habitantes (LAZERA *et al*, 1998)

Foi sugerido que as exigências ambientais para o crescimento do *P. brasiliensis* na natureza explicam sua distribuição heterogênea ou a não ocorrência da micose em determinadas regiões do continente. A inexistência de fatores climáticos propícios ao desenvolvimento do fungo na natureza explica a ausência da PCM no Chile (ALLISON *et al.*, 1979). Por outro lado, a existência de condições favoráveis ao crescimento do fungo na natureza tornam a não ocorrência da doença inexplicável em países como El Salvador (BLOCH *et al.*, 1975).

A partir de 1987, notificaram-se casos nas ilhas caribenhas de Trinidad, Grenada e Guadalupe (WANKE, 1999).

Todos os casos observados fora da área endêmica (Europa, Estados Unidos, África, Ásia, Oriente Médio, são de pessoas que adquiriram a micose na América Latina, onde viveram ou visitaram anteriormente ( WANKE ; LONDERO, 1994).

No Brasil há incidência em vários estados, somando 80% dos casos conhecidos, sendo a maioria descrita no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do País. Embora se acreditasse que a PCM era rara na Amazônia, testes realizados no Pará (1988) e Rondônia (1994), mostraram alta prevalência de infecção nessa região, demonstrando que a mesma poderia vir a ser uma importante zona endêmica. Simultaneamente, verificou-se o crescimento do número de pacientes diagnosticados com PCM na última década no Hospital de Doenças Infecto Contagiosas, HDIC, em Teresina, Piauí. Em dezembro de 1994, 115 casos de PCM foram diagnosticados no HDIC, incluindo a Amazônia como uma zona endêmica para esta micose. Casos não autóctones foram identificados nos estados do Piauí, onde todos os pacientes eram provenientes do Maranhão, Pará ou Tocantins.

A ruralização, desmatamento e revolvimento do solo em regiões onde o fungo é nativo seriam as causas do aumento de casos de PCM em determinadas regiões. No Sul, Sudeste e Centro-Oeste – áreas antigas de endemicidade no Brasil, a incidência se apresenta estável ou em declínio, devido ao avanço da urbanização da população. Todavia nas áreas com recente implantação da agricultura, envolvendo o desmatamento da floresta nativa, como observado nos estados de Tocantins, Pará, Mato Grosso, Rondônia e Acre, a incidência é alta e crescente, caracterizando esta infecção como uma micose emergente na região amazônica brasileira e consagrando-a como um importante problema de saúde no Brasil (WANKE, 1999).

A PCM que ocorre nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins - colonizados nas últimas três décadas, apresenta uma peculiaridade interessante: a alta prevalência de casos registrados em crianças, comparecendo em percentuais duas a três vezes maiores que os observados em outras regiões endêmicas do País. Isto

ocorre devido às atividades das crianças em áreas limitadas e à permanência duradoura das famílias em tais regiões. Presume-se que casos de crianças de baixa idade com PCM possam ser ótimos indicadores de áreas restritas onde a infecção tenha sido adquirida (FONSECA *et al.*, 1999).

O habitat natural e a ecologia do *P. brasiliensis* ainda não se encontram definidos. Aceita-se que tais fungos dimórficos vivem saprofiticamente em solos úmidos, locais ricos em proteínas e com variações mínimas na temperatura. Nesses locais o fungo cresce como micélio, produzindo conídios compatíveis com a dispersão aérea (aleurioconídios), e que uma vez inalados, penetram pelas vias respiratórias alojando-se nos alvéolos pulmonares (BORELLI, 1972).

Sabe-se que o isolamento de *P. brasiliensis* do solo ou de vegetais é difícil; quando bem sucedido, o re-isolamento na mesma região torna-se ainda mais raro (FRANCO *et al.*, 2000). No entanto, poucas são as tentativas bem sucedidas deste procedimento, acredita-se que a presença de fungicidas, herbicidas e inseticidas no solo das plantações interfiram no isolamento do fungo (SILVA-VERGARA *et al.*, 1998). Em 1986, *P. brasiliensis* foi isolado a partir de vísceras do tatu *Dasypus novemcinctus* (NAIF *et al.*, 1986). A partir de então, foram realizados vários isolamentos do fungo a partir desta espécie de tatu em várias regiões endêmicas do Brasil (MARQUES, 2003).

Além de tatus, cães também têm sido apontados como possíveis reservatórios de *P. brasiliensis*, Ono *et al.* (2001), utilizando metodologia tipo Elisa, investigaram a prevalência de sorologia anti-Pb em 305 cães da zona urbana, periurbana e rural de Londrina, PR, detectando nessas regiões índices de positividade de 14%, 48,8% e 89,5% respectivamente. Fagundes (2002), utilizou

metodologia semelhante à de ONO para investigar 282 cães da zona rural de área endêmica em Botucatu, SP, onde observou-se 35% de sorologia positiva nos animais. A técnica de PCR para tentativa de isolamento do fungo diretamente de amostras do solo de áreas endêmicas vem, recentemente, revelando-se promissora (RESTREPO *et al*, 2001).

#### **1.4 A Paracoccidioidomicose Infecção**

A infecção é adquirida pela inalação dos propágulos de *P. brasiliensis* que se encontram em seus micronichos como o solo e detritos vegetais, sob condições apropriadas. Nesses locais, o fungo vegetaria livre, ou hipoteticamente associado a um vetor, possivelmente um artrópode. A infecção também pode ocorrer, menos freqüentemente via cutânea ou através de mucosas (LONDERO, 1982). Após a infecção, os propágulos são fagocitados pelos macrófagos alveolares, iniciando-se um processo inflamatório no parênquima pulmonar. Nessa fase ocorre disseminação hematogênica para outros locais. Se o hospedeiro apresenta-se em bom estado de saúde, todos esses focos começam a regredir com o estabelecimento da imunidade celular, ocorrendo necrose envolvida por fibrose. Estas lesões regredem espontaneamente, tornam-se residuais, podendo abrigar fungos viáveis latentes (BÁRTHOLO *et al.*, 2000).

A incidência é menor em crianças com idade inferior a 10 anos: o mais jovem e o mais velho paciente que desenvolveram a PCM tinham respectivamente 3 e 102 anos de idade (MARTINS *et al.*, 1986, LONDERO ; RAMOS, 1990).

A manifestação clínica da PCM é mais freqüentemente observada em homens que em mulheres, constituindo a proporção de homens/mulheres de 13:1,

sendo 80 a 90% dos portadores homens adultos na faixa etária de 30-60 anos (ARISTIZABAL *et al.*, 1998). Esse número diminui em pacientes com menos de trinta anos de idade; em crianças ambos os sexos são igualmente afetados (LONDERO ; RAMOS, 1990). No sexo feminino, a ocorrência da forma disseminada se dá apenas em meninas antes da menarca e em mulheres após a menopausa (SIDRIM ; MOREIRA, 1999).

Nicol *et al.*, em 1965 relatam uma das primeiras observações de que as mulheres seriam menos susceptíveis à PCM que os homens, provavelmente devido a fatores hormonais. Salazar *et al.* (1988), em um estudo *in vitro* demonstraram que a administração de quantidades de estradiol acima das concentrações fisiológicas inibe a transformação de conídios em leveduras, ou seja, a forma infectante na forma parasitária. Stover *et al.*, (1986), descreveram uma proteína no citoplasma de *P. brasiliensis*, em ambas as fases de desenvolvimento, que se liga ao estrogênio, ou seja, um provável receptor do hormônio.

Os trabalhadores rurais são os mais atingidos, principalmente aqueles que trabalham com atividades relacionadas ao solo e à agricultura (RESTREPO, 1985). No Uruguai a micose é reconhecida como uma doença tipicamente ocupacional, ocorrendo apenas em madeireiros (CONTI-DIAZ *et al.*, 1989).

A doença geralmente apresenta-se sob duas formas: aguda (tipo juvenil) e crônica (tipo adulto). A forma aguda é responsável por 3 a 4% dos casos com disseminação hematogênica ou linfática, com o comprometimento sistêmico e hipertrofia do baço (BRUMMER, *et al.*, 1993; MONTENEGRO, 1986). Caracteriza-se também por um curso mais rápido (semanas ou meses) e por marcante envolvimento do fígado, gânglios e medula óssea. A maioria dos pacientes é

constituída por crianças ou adultos jovens com função imune gravemente deprimida (BÁRTHOLO, *et al.*, 2000).

A forma crônica representa mais que 90% dos casos, sendo a maioria constituída por homens adultos. Em aproximadamente 25% dos casos, o pulmão é o único órgão afetado. Em outros casos, o envolvimento pode ser silencioso, e quando o paciente procura assistência médica, a doença já se apresenta disseminada (ANGULO- ORTEGA, 1972). A PCM é uma doença com tendência à disseminação, sendo pouco freqüente quadros isolados. Nos casos de PCM crônica é freqüente o envolvimento da pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos. Também podem ocorrer graves complicações como a neuroparacoccidiodomicose, caracterizada pelo comprometimento do sistema nervoso, e insuficiência respiratória crônica devido à evolução do comprometimento pulmonar (BÁRTHOLO *et al.*, 2000).

Para combater e controlar a PCM, são empregadas drogas antifúngicas como Itraconazol, Anfotericina B, Cetoconazol, Sulfadiazina, Terbinafina, Caspofungina, Fluconazol, Sulfametoxazol, os quais podem ser utilizados isolados ou associados, o que depende de cada caso. O tratamento inclui uma fase de ataque e outra de manutenção. A duração do tratamento está relacionada a progressão e resposta individual do paciente ao tratamento (MARQUES, 2003).

### **1.5 A Biologia de *Paracoccidioides brasiliensis*: Dimorfismo, Reprodução e Cultivo.**

O *P. brasiliensis*, é um organismo pleomórfico dependente da temperatura para manifestar sua morfologia (SAN BLAS ; SAN BLAS, 1994), apresenta duas

formas de crescimento, a forma leveduriforme que se manifesta em temperatura de 37°C ou no tecido do hospedeiro (homem), e a forma de micélio, ou bolor, que cresce em temperatura ambiente ou em seu habitat (solo), sendo por isso denominado termodimórfico (MEDOFF *et al.*,1987).

A transição micélio-levedura mediada pelo aumento da temperatura é afeta a fisiologia mitocondrial e foi dividida em três estágios: declínio parcial da fosforilação oxidativa, nos níveis celulares de ATP, da respiração e da concentração de componentes da cadeia transportadora de elétrons; interrupção da respiração e o estágio de recuperação, culminando com a transformação para a morfologia leveduriforme ( MEDOFF *et al.*,1987).

Segundo San Blas e San Blas, (1994), os fatores que afetam o dimorfismo dos fungos causadores de micoses sistêmicas são os nutrientes, temperatura e disponibilidade de oxigênio. Em *P. brasiliensis*, a transformação ocorre tanto em meios ricos em nutrientes como meios definidos, ocorrendo o dimorfismo independente do meio em que ele se encontra.

A transformação da hifa em células leveduriformes se inicia com o aumento do diâmetro da hifa nas regiões interseptadas e rompimento da parede externa, a qual passa a permanecer em contato direto com o meio externo. Com esse aumento, os espaços interseptais tendem a se separar, formando células isoladas. A transformação de levedura para hifa ocorre basicamente com a formação de uma gema alargada, a qual desenvolve vários septos enquanto aumenta seu comprimento e conseqüentemente diminui seu diâmetro (CARBONELL; GIL, 1982).

*P. brasiliensis* apresenta diversos tipos morfológicos principalmente em sua fase leveduriforme, os quais ocorrem de acordo com o tipo de brotamento que

sofrem. De acordo com Lacaz, (1982) tais formas consistem basicamente em células pequenas, isoladas medindo de 1 a 5µm independentes umas das outras; elementos esféricos de 6 a 20µm contendo granulações espessas de cromatina, difusas ou em filamentos; células rodeadas por coroa de gemas, conferindo a característica “roda-de-leme” (formada pela exoesporulação múltipla da célula mãe) e formas catenuladas, que consistem em cadeia de três ou mais elementos formadas pelo brotamento de gemas e a não separação das mesmas, caracterizando pseudo hifas.

Até o momento não se conhece a forma sexuada de reprodução desse microorganismo, o que o caracteriza como um ser anamorfo, sendo a sua reprodução assexuada realizada unicamente por intermédio de esporos (SIDRIM ; MOREIRA, 1999).

Utilizando ágar Sabouraud em temperatura ambiente, Lutz (1908) e logo a seguir Splendore (1910), foram os primeiros a isolar *P. brasiliensis*, obtendo colônias micelianas, semelhantes a algodão.

Assim como outros fungos, *P. brasiliensis* apresenta variações morfológicas nas colônias de acordo com o meio de cultivo e principalmente com a temperatura de incubação. Este fato levou Moore (1935) à criação de novas espécies desse fungo: *P. cerebriformis* e *P. tenuis*, que logo foram consideradas como variantes da mesma espécie (LACAZ, 1991).

No início dos estudos de *P. brasiliensis*, foram propostos e utilizados vários meios de cultura, visando isolar e cultivar esse fungo. Foram muito utilizados meios como ágar sangue, ágar-chocolate, ágar-Saboraud com extrato de malte, ágar-

Saboudaud com extrato de mel, ágar-Sabouraud-sangue, dentre outros (LACAZ, 1977).

Para o isolamento de *P. brasiliensis* de lesões ou material proveniente destas, são utilizados meios de cultura contendo antibióticos ou outros fármacos que impedem o crescimento de outros fungos contaminantes e de bactérias (LACAZ, 1991).

O armazenamento de *P. brasiliensis* é bem sucedido em meio ágar-Sabouraud, com repiques trimestrais em temperatura ambiente ou protegida por uma camada de óleo mineral, por aproximadamente um ano (LACAZ, 1994). SILVA *et al.*, (1994), demonstraram que para se preservar tais culturas protegidas por óleo mineral, são necessários repiques com menor espaço de tempo, para que não haja alterações fisiológicas, principalmente no que se refere ao dimorfismo.

O crescimento de *P. brasiliensis* em meio ágar-Sabouraud se dá aproximadamente de 20 a 30 dias de incubação em temperatura ambiente, sob forma de colônias brancas aderentes ao meio. As hifas nessas condições se apresentam delgadas, septadas, com esporos intercalares ou terminais (LACAZ, 1982).

A 37 °C, principalmente quando em meios enriquecidos com determinados nutrientes, há a produção de colônias chamadas cerebriformes ou leveduriformes, e o exame microscópico destas revela células de várias formas, contendo tubos germinativos (LACAZ, 1982).

Meios líquidos mantidos em temperatura ambiente ou a 37°C são muito utilizados para o cultivo de *P. brasiliensis*, pois além de apresentar um bom crescimento, emprega-se esses meios para determinação da concentração inibitória

mínima de drogas antifúngicas (LACAZ, 1991). Além de também serem úteis para o crescimento e filtração do cultivo, obtendo-se o extrato de levedura, no qual são realizadas culturas posteriores.

Borba *et al.*, 1999, cultivaram o isolado Pb 3698R em meio YPD sólido e líquido e analisaram ultraestruturalmente as células oriundas de tais cultivos. Estes experimentos os levaram à conclusão de que os meios sólidos por conter ágar, de alguma maneira proporcionam o melhor desenvolvimento de células leveduriformes em relação ao cultivo em meios líquidos, pois as células observadas provenientes dos meios sólidos apresentaram-se nitidamente mais viáveis.

Quando certos isolados de *P. brasiliensis* são cultivados em meios escassos em nutrientes, produzem diversos tipos de propágulos, como artroconídios, conídios pedunculados e isolados. Quando estes conídios são submetidos à temperaturas mais altas (36-37°C), exibem o termodimorfismo normalmente, produzindo células leveduriformes com multibrotamentos, estando ligados à reprodução assexuada (Revisão em Restrepo *et al*, 1993.)

Clamidósporos (chamados por alguns autores de clamidoconídios) são as estruturas mais observadas no cultivo *in vitro* da fase filamentosa de *P. brasiliensis*. Estes clamidósporos constituem-se de estruturas de resistência desenvolvidas sob condições adversas como baixos níveis de nutrientes, baixa concentração de oxigênio ou ambos, e possuem espessa parede celular, citoplasma condensado, numerosas mitocôndrias e podendo ser uni ou multinucleados. (FRANCO *et al*, 1989)

Em ágar-água a temperatura ambiente, *P. brasiliensis* produz em sua forma miceliana vários tipos de estruturas de reprodução: artroconídios, conídios piriformes

e aleurioconídios (TELLES, 1994. O ágar traz elementos fisiologicamente importantes, como Zinco, entre outros elementos traço. Esses fatores explicariam porquê de muitos fungos crescem em ágar- água (LILLY;BARNETT, 1951).

Restrepo *et al*, 1986, desenvolveram uma técnica para coletar conídios do isolado Pb Gr em colônias com 3 a 4 semanas de cultivo. O desenvolvimento morfológico dos conídios desse fungo foi acompanhado por Restrepo *et al*, 1986. A ultraestrutura da formação de esporos do isolado IVIC Pb73 foi elucidada por San-Blas(1986.).

*P. brasiliensis* também apresenta um pequeno crescimento em água destilada estéril, neste caso, os nutrientes passam a ser provenientes das hifas mortas (LACAZ,1991).

Meio mínimo com sais minerais, metionina, tiamina e glicose compõem as condições básicas para o cultivo *in vitro* de *P. brasiliensis* (SAN BLAS ; SAN BLAS, 1994).

O caráter multinucleado das células leveduriformes de *P. brasiliensis*, sua capacidade de brotar em forma múltipla (“roda de leme”) e sua tendência a permanecerem agrupadas dificulta o processo de clonagem. Quando são isoladas por micromanipulação, não há o desenvolvimento de colônias, pois sabemos que fatores de crescimento liberados por células próximas no meio de cultivo são necessários para o desenvolvimento de colônias a partir de células isoladas (SAN-BLAS;CASTAÑEDA, 1990).

Castañeda *et al* (1988), descreveram um meio de cultivo que contém um filtrado de um cultivo prévio de *P. brasiliensis* capaz de incrementar a porcentagem de recuperação da forma leveduriforme medida como unidades formadoras de

colônia. Estes autores sugerem que este estímulo seria devido à presença de sideróforos contidos no filtrado.

Pesquisas adicionais são necessárias para avaliar outros aspectos sobre o cultivo e biologia de *P. brasiliensis*, em particular buscar elementos para compreender melhor as bases da diversidade morfológica entre isolados e se há evidência de que isolados sejam heterogêneos.

## 2. OBJETIVOS

Atualmente existem poucos estudos publicados sobre o comportamento de um isolado único de *P. brasiliensis* em diferentes meios e temperaturas de cultivo. Há uma necessidade de examinar de maneira comparativa o comportamento de um isolado definido em diferentes meios e condições de cultivo, visando identificar condições ideais para obter uma morfologia com células de fácil dispersão e que se aplique à obtenção de clones via micromanipulação. A avaliação de meios definidos dará uma base para pesquisas no sentido de tentativas de introdução de marcas genéticas em *P. brasiliensis* assim como será importante para futuras manipulações para a seleção de clones complementados por genes induzidos via transformação e fixados devido à integração homóloga ou a futuros plasmídeos replicativos compatíveis. A análise comparada da morfologia nos diversos meios e temperaturas de cultivo poderá revelar inclusive outros determinantes fisiológicos. Os objetivos principais propostos para este trabalho são:

2.1 Verificar sob diferentes condições nutricionais a morfologia macroscópica e microscópica apresentado pelo desenvolvimento das formas miceliana e leveduriforme cultivadas respectivamente em meios sólidos e líquidos.

2.2 Observar de maneira qualitativa e quantitativa o crescimento dessas culturas.

2.3 Micromanipular células individuais para verificar a clonabilidade de *P. brasiliensis* (em particular o isolado Pb18) em diferentes condições de crescimento;

2.4 Se a obtenção dos clones de *P. brasiliensis* for possível, caracterizar os mesmos.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* Empregado e sua Manutenção *in vitro*.**

Para o presente estudo, utilizou-se o isolado Pb 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*, fornecido pela UNIFESP (Dra. Rosana Puccia) em 1999, com características de PCM crônica.

O isolado Pb 18 foi mantido individualmente em meio ágar- YPD em uma estufa bacteriológica (MA 032) aquecida a 36°C, destinada ao cultivo exclusivo deste fungo na fase leveduriforme, com repiques sendo realizados a cada 15 dias. Todos isolados juntamente do Pb 18 também são mantidos em sua forma filamentosa em ágar YPD e Sabouraud sob temperatura ambiente, em geladeira sob a forma leveduriforme e também a – 80°C em meio YPD líquido acrescido de 10% de Glicerol.

#### **3.2 Meios de Cultura Utilizados**

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem durante 20 minutos sob a temperatura de 120°C. Para os meios sólidos adiciona-se 2% de Bacto ágar (DIFCO).

Após a distribuição dos meios em placas de Petri médias (90 x 15mm), estas foram secas em estufa a 36°C e armazenadas em refrigerador comum. Os meios

líquidos após a autoclavagem foram mantidos em frascos apropriados em temperatura ambiente.

Foram utilizados 12 meios de cultivo principais para a análise da fase leveduriforme e miceliana: YPD, YPD 0,5%, YPD10%, YPD 2%G, YPG, YPE, EG, Batata, Sabouraud, Wo, KAc, e SC. Alguns meios adicionais foram utilizados para analisar unicamente a utilização de carboidratos e sua relação com o dimorfismo, como YPM, YPS, YP, e YPGal

### **3.2.1 Meio YPD (meio completo para leveduras contendo dextrose)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, Bacto Peptona (DIFCO) 2%, Bacto Dextrose (OXOID) 2%

### **3.2.2 Meio EG (meio contendo etanol e glicerol)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, Bacto Peptona (DIFCO) 2%, Glicerol (MERCK) 2%  
Etanol (MERCK) 2%

### **3.2.3 Meio YPE (meio completo com etanol)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, Bacto Peptona (DIFCO) 2%, Etanol (MERCK) 2%

### **3.2.4 Meio YPG (meio completo com glicerol)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, Bacto Peptona (DIFCO) 2%, Glicerol (MERCK) 2%

### **3.2.5 Meio YPD10% (meio completo para levedura com 10% de dextrose)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, Bacto Peptona (DIFCO) 2%, Bacto Dextrose (OXOID)10%

### **3.2.6 Meio YPD 0,5% (meio completo para levedura com 0.5% de dextrose)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, Bacto Peptona (DIFCO) 2%, Bacto Dextrose (OXOID)0,5%

### **3.2.7 Meio YPD2%G (meio completo para levedura com 2% de dextrose e glicerol)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, Bacto Peptona (DIFCO) 2%, Bacto Dextrose (OXOID) 2%, Glicerol (MERCK) 2%

### **3.2.8 Meio Sabouraud (Bacto neopeptona 10g/L e Bacto dextrose 20g/L- meio de cultivo para fungos)**

Meio Sabouraud (DIFCO)

### **3.2.9 Meio Batata (Infusão de Batata 200g/L e Bacto dextrose 20g/L)**

Meio batata (DIFCO)

### **3.2.10 Meio Batata acrescido de dextrose**

Meio batata (extrato sólido de batata)(DIFCO), dextrose (DIFCO) 2%.

### **3.2.10 WO (meio mínimo para levedura)**

YNB s/ amino ácidos e sulfato de amônio (DIFCO) 0,17%, sulfato de amônio 0,50%

dextrose(DIFCO) 2%

### 3.2.11 KAc (meio para esporulação de leveduras)

Extrato de levedura (DIFCO) 0,1%, acetato de potássio (MERCK) 1%, Bacto dextrose (DIFCO) 0,05%

### 3.2.12 SC (meio sintético com 10 aminoácidos)

#### (a) Mix I

YNB sem aminoácidos e sulfato de amônio(DIFCO).....	1,67g
Tirosina (SIGMA).....	12,5mg
Adenina(SIGMA) .....	2,5mg
Uracil .....	10mg
Água destilada .....	125mL

Para meio sólido, adiciona-se 7,5g de Bacto ágar (DIFCO)

Esteriliza-se o Mix I por autoclavagem durante 20 minutos sob a temperatura de 120°C.

#### (b) Mix II – aminoácidos

Arginina (SIGMA).....	50mg
Histina (SIGMA).....	50mg
Isoleucina (SIGMA).....	150mg
Leucina (SIGMA).....	150mg
Lisina(SIGMA).....	150mg
Fenilalanina(SIGMA).....	150mg

Treonina (SIGMA).....	250mg
Triptofano (SIGMA).....	100mg
Água destilada.....	25mL

Esteriliza-se o *Mix II* com o uso de filtro Millipore® previamente esterilizado.

Após a autoclavagem do *Mix I*, ( 125 mL) adiciona-se neste :

Água destilada autoclavada aquecida.....	108,75mL
<i>MixII</i> .....	2,5mL
Solução estéril de Dextrose (DIFCO) 40%.....	2,5mL
1M Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7).....	1,25mL

Total: 250mL

### 3.2.13 Meio BHI (Brain Heart Infusion)

Infusão de cérebro e coração acrescidos de dextrose e peptona. (DIFCO)

### 3.2.14 Meio condicionado ou "spent" – YPD e BHI

Em um erlenmeyer de 1L adiciona-se 800mL de meio líquido YPD e autoclava-se este material, posteriormente inoculando neste uma considerável massa leveduriforme (correspondente a uma colônia leveduriforme madura de 7 dias proveniente de meio YPD ou mesmo "spent"), o qual é mantido em uma incubador giratória 36°C e 140 rpm por 7 dias. Este material é filtrado para separar a massa celular do meio líquido, então esteriliza-se este por filtração a vácuo utilizando filtro Nalgene® 0,2µm. Este filtrado denominado meio condicionado ou "spent", do inglês "usado", é armazenado em geladeira. Posteriormente prepara-se o meio condicionado da seguinte maneira: 25% de meio YPD e 2% de ágar (total), o qual é

autoclavado juntamente com uma barra (Teflon™) de agitador magnético. Quando o meio encontra-se próximo aos 55°C, com o auxílio de uma pipeta estéril adiciona-se neste, cuidadosamente, 75% em volume de meio "spent", à temperatura ambiente. A mistura deve ser homogeneizada no agitador com aquecedor, o que evita a solidificação do meio, em seguida, são adicionados 15mL da mistura em cada placa de Petri pequena.

Para o meio condicionado YPD utilizou-se duas proporções diferentes, uma de 50% e outra de 75% (v/v), esta metodologia é também utilizada para a elaboração do meio condicionado contendo BHI.

#### **3.2.15 YPS (Extrato de levedura contendo sorbitol)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, peptona (DIFCO) 2% e sorbitol 2% (MERCK)

#### **3.2.16 YPM (extrato de levedura contendo manitol)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1%, peptona (DIFCO) 2% e manitol (MERCK)2%)

#### **3.2.17 YP (extrato de levedura sem fonte de carboidrato)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1% e peptona (DIFCO) 2%- sem adição de açúcares.

#### **3.2.18 YPGal (extrato de levedura contendo galactose)**

Extrato de levedura (DIFCO) 1% e peptona (DIFCO) 2%, acrescido de 2% de galactose (DIFCO)

### **3.12.18 LB (meio para crescimento de bactérias)**

1% de triptona (DIFCO); 0,5% de extrato de levedura (DIFCO); 5% de NaCl e 0,1% de glicose;

### **3.12.18 LA (meio para crescimento de bactérias contendo ampicilina)**

1% de triptona (DIFCO); 0,5% de extrato de levedura (DIFCO); 5% de NaCl e 0,1% de glicose; acrescenta-se ao final do preparo, 50 µg/mL de ampicilina.

## **3.3 Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis***

O inóculo do fungo nos meios sólidos foi realizado com procedimentos microbiológicos padrões, respeitando rigorosamente as normas de biossegurança, tendo em vista da patogenicidade do fungo

Os inóculos foram realizados no mesmo dia e utilizando colônias oriundas de meio ágar YPD cultivados por 5 dias à 36°C..

As placas contendo os inóculos em diferentes meios destinados ao cultivo leveduriforme foram envolvidas em Parafilme "M" (American National Can<sup>Tm</sup>) e incubadas por 30 dias em estufa aquecida a 36°C, destinada exclusivamente ao cultivo deste fungo na fase leveduriforme, não foram realizados repiques.

Para obter o cultivo da fase miceliana, em diferentes meios, as placas contendo os mesmos foram envolvidas por Parafilme "M"(American National Can<sup>Tm</sup>) e mantidas em temperatura ambiente, não foram realizados repiques.

Para o cultivo em meio líquido, foram utilizados erlenmeyers de 25 mL contendo 12 mL de meio de cultivo. O inóculo foi realizado utilizando-se a mesma metodologia empregada para os meios sólidos.

Os erlenmeyers contendo o fungo inoculado foram incubados em um agitador automático (Marconi incubador giratório MA 420) a 36°C e a 135 rpm por 30 dias no máximo.

### **3.4 Avaliação do Crescimento e Morfologia das Culturas**

#### **3.4.1- Avaliação do Cultivo Miceliano**

A aparência das colônias micelianas foi analisada semanalmente, onde seu crescimento e principais alterações morfológicas foram observados e fotografados com o auxílio de uma câmera digital.

#### **3.4.2 Avaliação do Cultivo Leveduriforme em Meio de Cultura Líquido**

O crescimento fúngico em meio líquido foi observado semanalmente, registrando-se as principais diferenças em cada meio com relação ao crescimento e grau de agregação das células leveduriformes durante o desenvolvimento, características como turbidez do meio também foram avaliadas.

As diferenças de crescimento em cada um dos meios bem como a morfologia dos aglomerados leveduriformes foram registrados fotograficamente por câmera digital.

### **3.4.3 Análise Microscópica das Colônias Micelianas e Leveduriformes.**

#### **3.4.3.1 Preparação do Material para Análise Microscópica- Meios de Cultura Líquidos.**

Para analisar em microscópio óptico a morfologia da fase leveduriforme cultivada nos 12 meios de cultura líquidos, utilizou-se uma pipeta de Pasteur estéril para retirar de cada uma das culturas uma pequena massa celular, a qual foi colocada no mesmo momento sobre a lâmina. Com uma alça de platina, espalha-se sobre a lâmina a massa junto ao meio líquido para obter-se melhor visualização, os procedimentos posteriores são comuns à montagem de uma lâmina.

A observação foi realizada em um microscópio óptico (Leica DMLB). As células foram analisadas em todos os aumentos 40, 100, 200, 400 e 1000 vezes, e quando necessário utilizou-se o dispositivo de contraste de fase ou DIC (contraste diferencial de interferência). O registro fotográfico das diferentes células foi realizado em diferentes aumentos, utilizando-se da máquina fotográfica (Leica MPS60) acoplada ao microscópio. As análises foram realizadas aos 3, 7, 15 e 30 dias de cultivo. Para a observação da fase leveduriforme, não foi necessária coloração.

#### **3.4.4 Preparação do Material para Análise Microscópica- Meios de Cultura Sólidos.**

##### **3.4.4.1 Análise da Fase Leveduriforme em Meios de Cultura Sólidos.**

A análise da micromorfologia de *P. brasiliensis* nos diferentes meios de cultivo sólidos foi realizada aos 3, 7 e 15 dias de cultivo. A metodologia empregada é comum, com uma alça de platina estéril retira-se da região periférica da colônia desejada uma pequena massa celular colocando-se a mesma sobre uma lâmina contendo solução salina estéril (PBS: 8g/L NaCl, 0,2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,15 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2g/L KCl, pH 7,2) em água), espalha-se levemente o material e cobre-se o mesmo com uma lamínula. O procedimento utilizado para a observação das amostras foi o mesmo empregado para os meios líquidos.

#### **3.4.4.2 Análise da Fase Miceliana em Meios de Cultura Sólidos.**

Para obter-se amostras do micélio de *P. brasiliensis* destinadas à observação microscópica utiliza-se uma espátula com a qual realiza-se uma raspagem na superfície periférica da colônia transferindo este material diretamente para a lâmina contendo uma 20 $\mu\text{L}$  de água destilada estéril, ou a mesma quantidade de solução de PBS estéril. Posteriormente, com a mesma espátula realiza-se uma leve maceração na amostra e cobre-se a mesma com uma lamínula. Outra metodologia também empregada consiste na transferência da amostra miceliana para um tubo eppendorf<sup>®</sup> juntamente de 200 $\mu\text{L}$  de água destilada estéril. Realiza-se uma pequena maceração no material e suspende-se o mesmo por agitação com o auxílio de um misturador de vortex durante alguns segundos ou até que a água torne-se ligeiramente turva. Para a análise da micromorfologia temos utilizado as duas metodologias descritas, pois a segunda facilita a observação individual das hifas. Foram analisadas amostras

obtidas de cultivos referentes a 1, 2, 3, 4 e 5 semanas, registrando-se as alterações observadas durante o desenvolvimento miceliano.

As hifas foram observadas em microscópio óptico (Leica DMLB) em todos os aumentos 40, 100, 200, 400 e 1000 vezes, utilizando principalmente o sistema DIC e eventualmente do sistema de contraste de fase. O registro fotográfico das diferentes formas apresentadas pelas hifas foi realizado em diversos aumentos, utilizando-se da máquina fotográfica (Leica MPS60) acoplada ao microscópio.

### **3.5 Obtenção de clones de *Paracoccidioides brasiliensis***

A metodologia para a obtenção de culturas clonais do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foi realizada através de micromanipulação e ultra-som.

#### **3.5.1 Clonagem via micromanipulação**

Foram utilizadas células leveduriformes oriundas dos cultivos em meios ágar Batata e ágar KAc cultivadas por 5 dias as quais foram manipuladas utilizando um microscópio micromanipulador modelo Singer MSM, seguindo as instruções indicadas pelo manual e CD-Rom do mesmo.

Foram isolados vários tipos celulares como células isoladas esféricas, células em exoesporulação múltipla, pequenas pseudo hifas e pequenos grupos de células esféricas agrupadas mecanicamente. Os meios utilizados para o inóculo das células a serem clonadas foram meio condicionado YPD (contendo 50% ou 75% de filtrado), meio condicionado BHI (contendo 75% de filtrado), meio Batata, KAc e YPD comum.

A observação da evolução do desenvolvimento das células foi criteriosa e diária.

### 3.5.2 Clonagem via ultra-som e plaqueamento

Primeiramente, antes de submeter as células ao ultra-som, foi realizado um ensaio em que a intensidade da radiação sonora foi analisada com o objetivo de determinar o nível tolerado pelas células dos diferentes isolados, sem que houvessem alterações em sua viabilidade, pois sabe-se que o ultra-som pode afetar a integridade da parede celular.

Antes das células serem submetidas ao ultra-som, estas são inicialmente cultivadas em meio ágar-BHI, por 5 dias à 36°C. Realiza-se após este período, o exame de viabilidade celular, com o corante Trypan Blue (0,4%- DIFCO). Para tal, primeiramente acrescenta-se uma pequena amostra de células leveduriformes em um tubo eppendorff<sup>®</sup> contendo previamente 50µL de solução salina (PBS) acrescida do mesmo volume do corante, esta amostra é levada rapidamente ao microscópio óptico sendo então analisada em campo claro. Ao constatar que as células encontram-se saudáveis, pequenas porções destas são transferidas para tubos eppendorff<sup>®</sup> contendo 500 µL de PBS. As células são então submetidas ao vortex por alguns segundos e em seguida ao ultra-som (Sonicator modelo XL, Heat Systems) no nível 2, por 30 segundos, logo em seguida, estas são mantidas em gelo por alguns segundos. Este procedimento é repetido até serem somados 3 minutos. Finalizando o procedimento, submete-se as células mais uma vez ao vortex de 5 a 10 segundos ou até que a suspensão celular aparente boa dispersão, por eliminação dos grumos de células. Coleta-se uma pequena amostra dessas células (20µL) repetindo-se em seguida o exame microscópico com a adição do corante

Trypan Blue (DIFCO) para verificar a viabilidade celular do material. Quando as células apresentam-se aparentemente saudáveis, realiza-se a diluição da suspensão em PBS nas proporções de 1:5, 1:10, 1:15 e 1:20. Alíquotas de 100 µL de cada amostra previamente diluída são inoculadas em placas de Petri contendo os meios sólidos (2% ágar): “Spent”- BHI, “Spent”- YPD 75%, “Spent”- YPD 50%, YPD e KAc (extrato de levedura, DIFCO, 0,1%; acetato de potássio, MERCK, 1%; dextrose, DIFCO, 0,05%). As placas são então examinadas no microscópio micromanipulador, e os locais onde encontram-se as células isoladas são marcados com o auxílio de uma caneta. Como no processo anterior de obtenção de clones, as placas são observadas no micromanipulador diariamente a procura de eventuais formações de culturas clonais. O restante do procedimento é realizado como descrito na seção anterior.

### **3.6 Cultura e obtenção de massa leveduriforme de *P. brasiliensis***

Células leveduriformes do isolado Pb 18 foram cultivadas em meio ágar –YPD por 5 dias. Um material referente a duas placas contendo colônias bem desenvolvidas é então transferido para um erlenmeyer de 2 litros contendo 800mL de meio YPD líquido. Esta suspensão é mantida de 7 a 10 dias em uma incubadora giratória a 36°C e 125 rpm. Posteriormente filtra-se este material utilizando telas de nylon ou em filtro de papel duplo (o qual se mostra mais eficiente para a coleta da massa leveduriforme). Após a filtração, recolhe-se a massa leveduriforme, congelando-a por imersão em nitrogênio líquido e então armazenando a -80°C. O sobrenadante, como descrito no relatório anterior, é filtrado a vácuo utilizando filtro

Nalgene® sendo posteriormente armazenado em geladeira a 4°C para a elaboração do meio condicionado “Spent”.

### **3.7 Extração de DNA total de *P. brasiliensis***

Para a obtenção de DNA total de *P. brasiliensis* primeiramente rompe-se as células congeladas previamente com o auxílio de um liquidificador industrial Heavy Duty Laboratory Blender- Waring Laboratory™. Neste procedimento utiliza-se uma massa leveduriforme entre 10-15g, (peso fresco) a qual é transferida para o copo do liquidificador acrescido de nitrogênio líquido. O liquidificador é acionado em alta velocidade por cerca de 30s distribuídos em 3 pulsos havendo ruptura das células e formação de um pó congelado. Transfere-se então este pó para um béquer de 250mL contendo 65 mL do Tampão 25mM Tris pH7,5, 25mM EDTA, 2% SDS juntamente de 3mg de proteinase K. Com o auxílio de um bastão de vidro mistura-se cuidadosamente o material. Esta suspensão é então incubada por 1 hora em banho com uma temperatura entre 42 e 55°C.

Posteriormente transfere-se o material para tubos plásticos apropriados centrifugando-os em uma ultracentrífuga Sorvall (modelo RC- 5B) a 5000 rpm por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante é recolhido e neste adiciona-se 1:10 de volume de TrisHCl pH 8,5 e fenol na proporção 1:1, agitando-se por inversão (aproximadamente 20X). Centrifuga-se a amostra por 15 minutos a 5000 rpm a 15°C. A fase aquosa é extraída novamente com um volume de mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Nas mesmas condições anteriores centrifuga-se a mistura, coletando-se o sobrenadante aquoso e

adiciona-se neste éter na proporção 1:10 para extrair resíduos de fenol e clorofórmio, sendo, após centrifugação, o éter removido por aspiração. Em seguida transfere-se o mesmo para outro tubo onde adiciona-se NaCl 5M na proporção 1:20. Acrescenta-se um volume de isopropanol mistura-se a amostra por inversão, mantendo-se a mesma em gelo por 15 minutos ou pela noite a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A solução é transferida para tubos plásticos e centrifugada por 10 minutos a 7000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  em ultracentrífuga Sorvall. O sobrenadante é desprezado e o precipitado é dissolvido em 7 mL da solução de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  2M, 0,2mM EDTA. Em seguida, transfere-se a amostra para novos tubos da Sorvall e centrifuga-se por 10 minutos a 10000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante é recolhido e precipita-se o DNA por adição de 3 volumes de etanol 100%. Após centrifugação (como acima) o sobrenadante é desprezado e o precipitado lavado com 3 ml de etanol 80%. Após drenar bem o sobrenadante, deve-se secar a vácuo brevemente. Por fim, dissolve-se o DNA em 2 mL de TE (10mM Tris pH7,5, 1mM EDTA pH 7,5).

### **3.8 Purificação do DNA com gradiente de cloreto de céσιο- separação do DNA nuclear do DNA mitocondrial**

Como pretendia-se analisar apenas as prováveis variações polimórficas no DNA mitocondrial (mtDNA), fez-se necessário separar o mtDNA do DNA nuclear (nuDNA) por centrifugação isopícnica em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) contendo o corante fluorescente bisbenzidamina (Hoeschst 33258). Neste caso, utiliza-se 3,1g de CsCl para cada 2,8g de solução, o soluto deve se dissolver na própria solução contendo o DNA. Adiciona-se posteriormente 90uL do corante

Hoeschst 33258 a 10mg/mL. Com a finalidade de remover o excesso de RNA insolúvel, após 10 minutos este material é centrifugado em tubos de polialômero rígidos (# 355646 do rotor MLA- 80 em ultracentrífuga Beckman Coulter, USA) por 15 minutos a 50000 rpm à temperatura ambiente. Remove-se o sobrenadante transferindo-o em seguida para tubos “quick seal” do rotor TLN 100, estes são centrifugados a 70000 rpm por 19 horas a temperatura de 20°C em ultracentrífuga Beckman Coulter (USA). Após o período indicado, os tubos são retirados cuidadosamente da centrífuga para visualizar a separação do DNA. Duas bandas de coloração azul claro são visualizadas com o auxílio de luz ultravioleta longa, a superior refere-se ao mtDNA, a inferior ao nuDNA. A remoção das bandas é realizada com o auxílio de uma seringa com agulha de ponta curva (40x20), cortando-se o topo do tubo e, com cautela, aspiramos as bandas desejadas. Para retirar a bisbenzidamina, as amostras são transferidas para tubos eppendorf<sup>®</sup> adicionado-se butanol saturado com água (v/v), mistura-se a amostra por inversão várias vezes e centrifuga-se por 1 minuto em microcentrífuga a 14000 rpm, o butanol (fase superior) é recolhido por aspiração. Este procedimento é repetido entre 4 a 5 vezes. Para remover o CsCl as amostras são colocadas em sacos de diálise, que são deixadas em repouso em água milliQ por 45 minutos. Em seguida troca-se a água MilliQ e iniciamos agitação magnética por mais 45 minutos. As soluções de DNA foram concentradas utilizando polietilenoglicol (PEG 6000, Carbowax) por 1 hora, e mantidas em tampão TE (10mM TrisCl, pH 8,5, 1µM EDTA) por 2 horas a 4°C sob agitação magnética. Em seguida troca-se o tampão repetindo-se o procedimento. Por fim, troca-se novamente o tampão e mantém-se a solução

dialisando durante a noite. Finalizada a diálise, retira-se o material das “bags” transferindo-o para tubos eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 mL, e armazenando-os a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.9 Quantificação do DNA**

As amostras de mt DNA foram quantificadas utilizando espectrofotometria no ultravioleta (260 nm). Primeiramente dilui-se as amostras 50x para realizar as leituras. Cada cubeta utilizada para a leitura ótica comporta 700  $\mu\text{L}$ , então prepara-se em tubos eppendorfs as amostras contendo 686  $\mu\text{L}$  de água MilliQ juntamente de 14  $\mu\text{L}$  do DNA. Para zerar o espectrofotômetro, utiliza-se a diluição do produto da diálise final 1: 50, onde lê-se nos comprimentos de onda 260 e 280 nm- a primeira leitura indica a quantidade de DNA presente na solução, a segunda diz respeito à contaminação com fenol ou proteínas. Multiplica-se então o valor da leitura obtido pelo fator de diluição. Para obter a concentração final aplica-se uma regra de três, onde uma DO é igual a 1,0, isso equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para obter o índice de pureza do DNA, divide-se o valor da leitura de 260 nm pelo de 280 nm, o qual geralmente equivale a algum valor entre 1,7 e 1,9. Quando necessário, realiza-se a concentração das amostras precipitando novamente o DNA e ressuspendendo-o em um volume menor de tampão 10mM Tris pH7,5, 1mM EDTA pH 7,5. Para verificar a integridade do DNA purificado, realiza-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% a 100 V por 20 minutos.

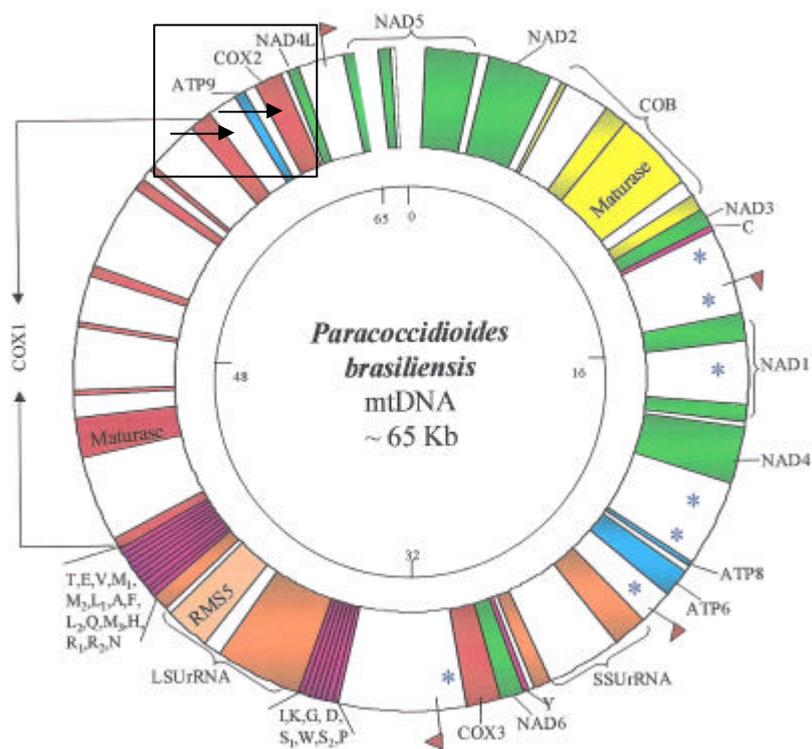
### 3.10 Amplificação de DNA por PCR (“polymerase chain reaction”)

Para a analisar eventuais diferenças existentes nos clones (foram selecionados 2 clones microdissecados juntamente com o isolado do Pb18 original, totalizando 3 amostras) que não apresentaram as mesmas características micromorfológicas. Para a análise molecular, escolhemos 2 regiões do DNA mitocondrial e uma do DNA nuclear. A primeira corresponde ao gene COX2 (subunidade 2 da citocromo oxidase) pertencente ao complexo da cadeia respiratória contendo 698pb. A segunda, se trata de uma região intergênica situada entre o término da região referente ao COX1 (subunidade 1 da citocromo oxidase) e início do gene da subunidade 9 da ATP sintase, de 875 pb. A região referente ao DNA nuclear é a o gene *PbGP43*, responsável pela codificação da glicoproteína GP43, a qual consiste em uma região polimórfica entre diversos isolados de *P. brasiliensis*.

Para a reação de amplificação utilizou-se 50mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris-Cl pH 9,0, 10mM de dNTP's, 1,6 pmoles de cada iniciador), 60 ng de nuDNA (para as reações envolvendo DNA nuclear) e 20 ng de mtDNA (para reações envolvendo DNA mitocondrial), e 1U de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados encontram-se descritos na tabela abaixo, os quais foram desenhados e gentilmente cedidos pela doutora Nami C. Takahashi. O mapa físico do genoma mitocondrial de *P. brasiliensis* encontra-se na figura 4.7 (Cardoso, M.A.G., 2004).

**Tabela 3.1-** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de amplificação (S)- Senso, (AS)- Anti-senso.

<b>Região</b>	<b>Oligo</b>	<b>Sequência</b>
<b>GP43</b>	<b>490 S</b>	5' GTC AGA TCT ATC ATG AAT TTT AGT TCC TTA AC 3'
	<b>491 S</b>	5' ACG TCG ACT CAC CTG CAT CCA CCA TAC TT 3'
<b>COX2</b>	<b>340 S</b>	5'AAT TTA GAT GCA CCA ACA GC 3'
	<b>341 AS</b>	5' CGC AGA TTT CAG AGC ATT GT 3'
<b>Intergênica</b>	<b>456 S</b>	5' AAC TCA CGC ATT TGT AAG T 3'
	<b>457 AS</b>	5' GCA CCA ATT AAA CCC ATA G 3'



**Figura 3.1** - Mapa físico do genoma mitocondrial de *P. brasiliensis*. Os genes encontram-se identificados pela abreviatura usual. As regiões estudadas encontram-se indicadas pelas setas, na região superior da figura. (cortesia de Cardoso, M.A.G, *Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial de P. brasiliensis*, Tese de Doutorado, São Paulo, 2004)

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador PCR System 2400, Perkin Elmer ou no PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research. Os ciclos foram otimizados e realizados de acordo com a Tabela 3.2 abaixo:

**Tabela 3.2-** Condições otimizadas para as reações de amplificação das regiões escolhidas.

<b>Região</b>	<b>Condições da reação de amplificação</b>
<b>GP43</b>	95°C por 3 minutos seguidos de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, após o término dos ciclos, submete-se o material a 72°C por 10 minutos. Ao final da reação, as amostras são mantidas resfriadas a 4°C.
<b>COX 2</b>	95°C por 5 minutos seguida por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 40 segundos, 72°C por 2 minutos. Ao finalizar os 35 ciclos, submete-se as amostras a 72°C por 7 minutos, posteriormente mantém-se as amostras resfriadas a 4°C.
<b>Intergênica</b>	95°C por 5 minutos seguida por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 52°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos. Ao finalizar os 35 ciclos, submete-se as amostras a 72°C por 7 minutos, posteriormente mantém-se as amostras resfriadas a 4°C.

### 3.11 Purificação do DNA

Após a amplificação dos fragmentos é necessário realizar sua purificação, para tal transfere-se todo o material obtido para gel de agarose a 1%, realiza-se a eletroforese e posteriormente retira-se os fragmentos do gel contendo as bandas,

referentes às amostras de DNA desejadas. Estes fragmentos são transferidos para tubos eppendorf® onde realiza-se a extração do ácido nucleico com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

### **3.12 Clonagem**

O material purificado foi clonado utilizando o vetor pCR® 4- TOPO de 3957pb utilizando-se o kit TOPO® Cloning, seguindo as especificações do fabricante.

### **3.13 Preparo de células bacterianas competentes**

Para o preparo de células competentes, utilizou-se a metodologia descrita por Sambrook *et al.* 1989 com ligeiras modificações. Para tal, inocula-se células de *E. coli* linhagem DH10B em 50 mL de meio LB, submetendo-as à incubação em agitador automático a 37°C a 220 rpm por 1 hora. Em seguida a concentração bacteriana das culturas é quantificada utilizando o nefelômetro Klett até que a cultura atinja o valor 100 da escala do aparelho (fase exponencial), rapidamente resfria-se o frasco em uma mistura de gelo e água e em seguida transfere-se o material para tubos "Corning" de 50mL. As culturas são centrifugadas na centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SA-600 por 10 minutos a 5000 rpm sob a temperatura de 4°C. O sobrenadante é desprezado e o "pellet" é lavado com a adição de 20mL de CaCl<sub>2</sub> (10mM), Tris (10mM) pH 8,0, durante a lavagem mantém-se as amostras em gelo. Posteriormente, despreza-se o sobrenadante ressuspendendo as células em 20 mL

de  $\text{CaCl}_2$  (50mM), Tris (10mM) pH 8,0 mantendo no gelo por 30 minutos. Ao final, centrifuga-se o material por 10 minutos sob as mesmas condições anteriores, ressuspendendo as células em 3 mL de 20 mL de  $\text{CaCl}_2$  (50mM), Tris (10mM) pH 8,0. As células podem ser utilizadas no momento do preparo ou armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ .

### **3.14 Transformação bacteriana**

A inserção de DNA exógeno nas bactérias foi realizada também conforme Sambrook *et al.* 1989. As células competentes são descongeladas em gelo, adicionando-se em seguida 3 $\mu\text{L}$  da ligação contendo o inserto desejado para cada 100  $\mu\text{L}$  de células. O material é deixado por 30 minutos em gelo e em seguida realiza-se um choque térmico por 40 segundos em banho a  $42^\circ\text{C}$ . As células retornam para o gelo por mais 2 minutos e posteriormente adiciona-se nas amostras 400  $\mu\text{L}$  de meio LB, as quais são incubadas por 1 hora em agitador automático sob a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, as células são plaqueadas em meio LA contendo 165 $\mu\text{L}$  de Blue-Gal (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para depois realizar a seleção de colônias transformantes (brancas) e não transformantes (azuis). As placas são mantidas à  $37^\circ\text{C}$  por no mínimo 16 horas, e posteriormente os clones brancos são reisolados em meio LA.

### 3.15 Minipreparação de DNA plasmidial

Após a transformação, para cada região, foram selecionados 2 clones bacterianos (contendo o inserto), sendo os mesmos submetidos ao crescimento em 3mL de meio líquido LB durante 16 horas ("over night"). O material é centrifugado por 3 minutos sob a temperatura de 20°C a 5000rpm e então drenado em papel absorvente. Em seguida adiciona-se 200µL de solução GETRNAse (9g Glicose, 2,5mL de 1M Tris-Cl pH 8,0; 5mL de EDTA 0,2 M , 1,5mL de RNAse a 10mg/mL para 100mL de água MilliQ) e suspende-se as células com uma espátula plástica. Adiciona-se depois a cada tubo 400µL de solução de lise (5mL de SDS 20%; 2mL de NaOH 10N para 100mL de água MilliQ), os tubos são suavemente rodados entre as mãos na vertical. Após 5 minutos adiciona-se 400 µL de solução de neutralização (13g de acetato de potássio dissolvidos em 50mL de água MilliQ, pH 4,8) misturando por inversão (8 vezes). Mantém-se o material no gelo por 30 minutos e em seguida este é centrifugado por 15 minutos. Após a centrifugação, coleta-se L com cuidado o sobrenadante (800 µL) transferindo-o para outros tubos compatíveis contendo 600µL de isopropanol. Mistura-se por inversão 4 vezes e centrifuga-se por 10 minutos, drenando-se em seguida em papel absorvente. Posteriormente adiciona-se 400µL de etanol 70% a cada amostra misturando-se por inversão 2 vezes, centrifuga-se por 5 minutos, descartando o sobrenadante em seguida e depois drenando sobre papel absorvente até que os tubos fiquem secos. Estes são então transferidos para Speed Vac e mantidos nesta por 5 a 10 minutos. Ao final, dissolve-se o DNA em água ou em 25µL de Tris-Cl 10mM pH8,0, e realiza-se a quantificação de DNA, por fim mantém-se o mesmo armazenado a -20 ou -80°C.

### 3.16 Seqüenciamento do DNA

As reações de seqüenciamento automático foram realizadas utilizando o DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Para cada 10 $\mu$ L de reação, adiciona-se 2 $\mu$ L do DNA obtido anteriormente (130 $\eta$ g/ $\mu$ L), 2 $\mu$ L do iniciador M13 (1,6  $\mu$ moles) Senso (5'- GTA AAA CGA CGG CCA G-3') ou do iniciador M13 anti-senso (5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC- 3') e 5  $\mu$ L de água estéril. As reações de seqüenciamento são realizadas em um termociclador PCR System 2400 Perkin Elmer onde as condições para a reação iniciam-se na 1 $^{\circ}$  etapa com a temperatura de 95 $^{\circ}$ C por 20 segundos, seguindo de outra etapa por 15 segundos a 50 $^{\circ}$ C e finalmente por 2 minutos a 60  $^{\circ}$ C, são realizados 40 ciclos. Após a reação se faz necessária a precipitação do DNA, a qual é realizada adicionando 1 $\mu$ L de acetato de sódio 3M e 40 $\mu$ L de etanol 95%. O material é incubado por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugado por 45 minutos a 4000 rpm e 22 $^{\circ}$ C, desprezando-se o sobrenadante em seguida. Para a lavagem do precipitado adiciona-se 200 $\mu$ L de etanol 80%, realizando outra centrifugação, este processo deve ser realizado duas vezes. Por fim, seca-se o precipitado a vácuo em uma "Speed Vac", redissolvendo-o em 10 $\mu$ L de formamida para o posterior seqüenciamento. As amostras foram submetidas ao seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

As seqüências foram analisadas, utilizando pacotes dos programas Phred/Crossmatch. As seqüências com índice de qualidade Phred maior ou igual a 25 pontos, foram selecionadas para os alinhamentos múltiplos, para os quais, utilizamos os programas DNASTar/Seq Man/Edit Seq.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação do crescimento e desenvolvimento da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* em meios de cultura líquidos à 36°C.

O crescimento de *P. brasiliensis* nos diversos meios de cultivo líquidos apresentou-se bastante diversificado, onde fatores como morfologia, crescimento, grau de floculação da cultura, forma e consistência dos agregados e facilidade em sua manipulação foram observados. A floculação foi avaliada de acordo com a proporção de agregados sedimentados após aproximadamente 5 minutos frente à quantidade de material em suspensão. A consistência dos agregados foi analisada de acordo com a facilidade de dispersão dos mesmos no momento da montagem da lâmina. Os resultados apresentados na Tabela 4.1 referem-se a culturas com até 15 dias de incubação (Figura 4.1). Este tempo corresponde certamente à fase estacionária de crescimento.

**Tabela 4.1** - Características de *P. brasiliensis* (PB18) cultivado nos meios de líquidos indicados, a 36°C.

<i>Meio de Cultivo</i>	<i>Crescimento e Desenvolvimento</i>	<i>Floculação</i>	<i>Morfologia dos agregados</i>	<i>Consistência dos agregados</i>	<i>Turbidez do meio (*)</i>
<b>Sabouraud</b>	+++	+++	Pequenos agregados arredondados	Cremosa com dispersão razoável.	++

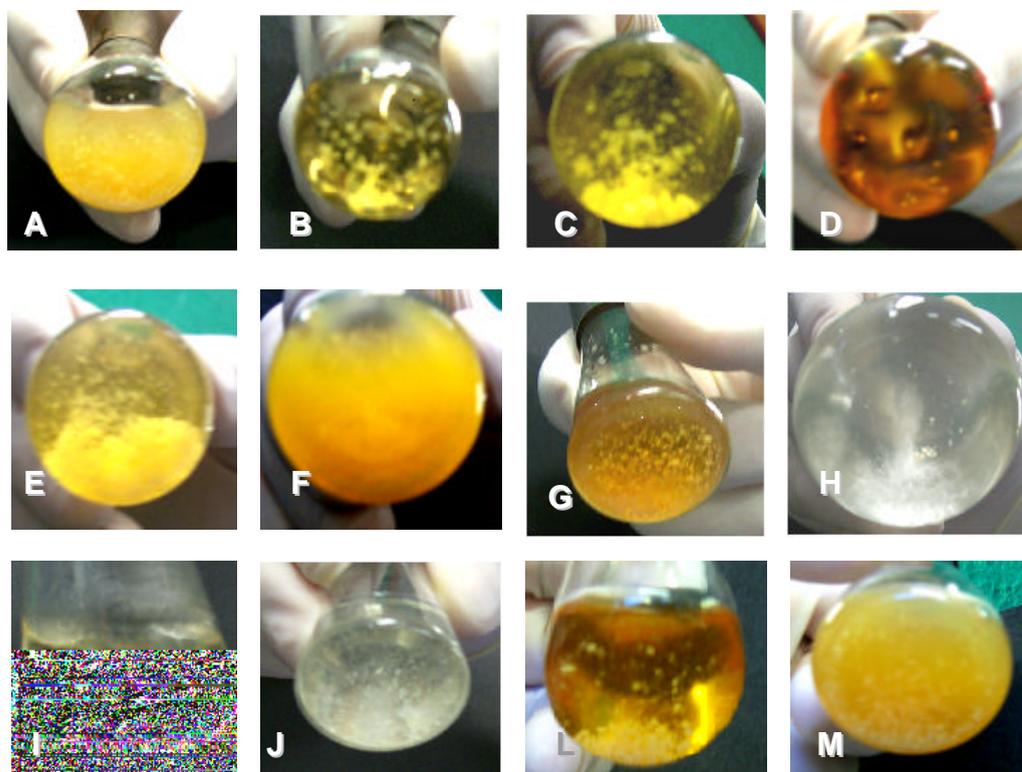
**Tabela 4.1 (cont.)** Características de *P. brasiliensis* (PB18) cultivado nos meios de líquidos indicados, a 36°C.

<b>Meio de cultivo</b>	<b>Crescimento e desenvolvimento</b>	<b>Floculação</b>	<b>Morfologia dos agregados</b>	<b>Consistência dos agregados</b>	<b>Turbidez do meio</b>
<b>YPE</b>	++	++	Grandes agregados arredondado.	Levemente firme com dispersão razoável.	-
<b>YPG</b>	++	++	Agregados grandes arredondados ou delgados	Levemente firme com dispersão razoável.	-
<b>YPD 0,5%D</b>	++	+++	Pequenos agregados arredondados, formando aglomerados maiores.	Parcialmente cremosa, com obtenção de dispersão média	++
<b>YPD 10%D</b>	++	++++	Pequenos e grandes agregados, aumentando com o tempo de cultivo.	Medianamente cremosa, com dispersão ruim.	++
<b>YPD 2% G</b>	++++	+++	Pequenos e grandes agregados arredondados	Medianamente cremosa, com dispersão razoável.	++++
<b>YPD</b>	+++	++	Pequenos agregados arredondados	Medianamente cremosa, com média dispersão	+++
<b>SC</b>	+	+	Agregados pequenos e ovóides.	Bastante cremosa com total dispersão.	+
<b>WO</b>	+	+	Agregados pequenos e ovóides.	Medianamente cremosa com dispersão razoável.	-

**Tabela 4.1 (cont.)-** Características de *P. brasiliensis* (PB18) cultivado nos meios de líquidos indicados, a 36°C.

<i>Meio de cultivo</i>	<i>Crescimento e desenvolvimento</i>	<i>Floculação</i>	<i>Morfologia dos agregados</i>	<i>Consistência dos agregados</i>	<i>Turbidez do meio</i>
<i>Kac</i>	+	+	Agregados delgados e parcialmente planos.	Cremosa com dispersão razoável.	+
<i>EG</i>	++	+++	Agregados arredondados grandes e pequenos.	Cremosa com dispersão razoável.	+++
<i>Batata</i>	+++	++	Pequenos e grandes agregados arredondados	Bastante cremosa com fácil dispersão.	++

(\*) +: baixo/ruim; ++: médio/ razoável; +++: bom/ considerável; ++++: muito bom/ intenso.



**Fig. 4.1-** Aparência de *P.brasiliensis* nos 12 meios de cultura após cultivo por 15 dias a 36°C): **A)** Sabouraud; **B)** YPE; **C)** YPG; **D)**YPD 10%D; **E)** YPD 0,5%D; **F)** YPD2%G; **G)** YPD; **H)** Sc ; **I)** WO; **J)** KAc.; **L)** EG; **M)** Batata.

Culturas de *P. brasiliensis* em meios líquidos são úteis para o estudo de concentrações inibitórias mínimas de drogas antifúngicas (LACAZ, 1982) assim como efeito de inúmeras outras drogas e para obtenção de masa celular para estudos químicos, bioquímicos e de biologia celular. O sobrenadante do cultivo líquido com mais de 7 dias é o meio condicionado ('spent'), o qual promove o crescimento e desenvolvimento desse organismo (SAN - BLAS, 1990).

Como apresentado na Tabela 4.1, a morfologia das colônias obtidas nos diversos meios de cultivo líquidos mostra-se basicamente floculiforme- as células formam agregados característicos de aparência variada: esféricos, ovóides, pequenos, grandes ou planos.

Como será visto, os meios onde observou-se floculação de menor intensidade com maior turvação fina do meio, foram os mais propícios para a obtenção de células isoladas ou pouco aglomeradas - o que facilita o exame microscópico e manipulações importantes como o isolamento de colônias isoladas (clones) geneticamente puros antes ou depois de procedimentos voltados para a modificação genética deste fungo.

Nossos estudos mostraram que *P. brasiliensis* atinge geralmente a fase estacionária no máximo até a primeira quinzena de cultivo, resultado que pode ser variável, dependendo do meio utilizado. No entanto, para as culturas realizadas no meio YPD 10% D, o crescimento continua sendo observado até aproximadamente o 25º dia, onde então parece cessar. O crescimento em YPD 10% D parece ser inibido inicialmente pela alta concentração de açúcar (dextrose) presente no início do cultivo, porém acredita-se que à medida em que este carboidrato é metabolizado, o crescimento do fungo se intensifica.

## 4.2 Avaliação do crescimento de *P. brasiliensis* em fase miceliana

As colônias na fase filamentosa de *P. brasiliensis* obtidas no cultivo em meio sólido à temperatura ambiente (18-20°C) apresentaram grande plasticidade fenotípica no que se diz respeito ao crescimento, consistência do micélio, diâmetro, coloração, textura da superfície e agregamento das hifas (Figura 4.2).

A Tabela 4.2 apresenta em resumo a caracterização macromorfológica das diversas colônias cultivadas durante 4 meses, tempo suficiente para a obtenção de colônias maduras bem desenvolvidas.

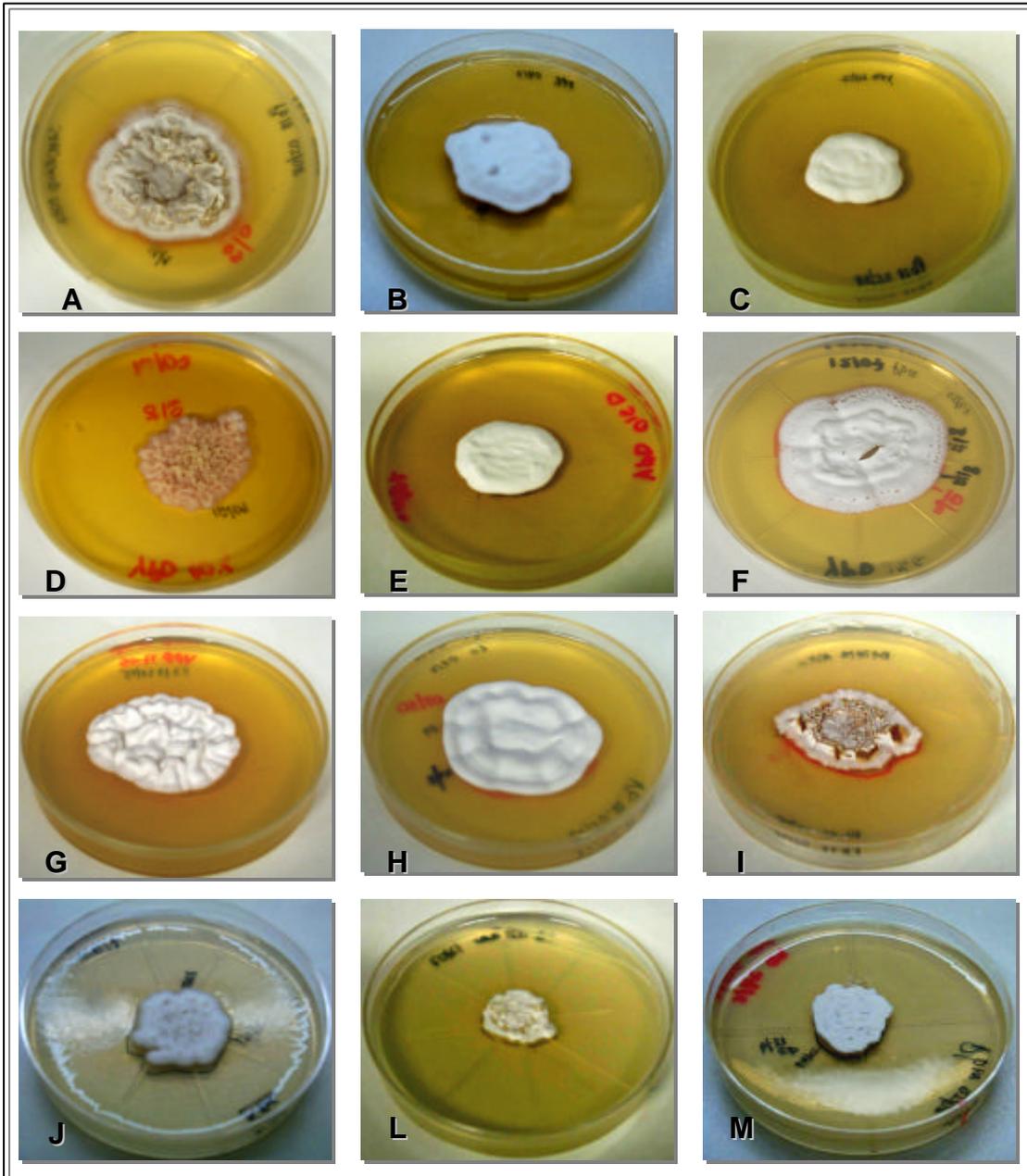
**Tabela 4.2-** Principais características macromorfológicas de *P. brasiliensis* em sua fase filamentosa, em diferentes meios de cultura sólidos.

<i>Meio de cultivo</i>	<i>Crescimento e desenvolvimento</i>	<i>Coloração</i>	<i>Aspecto da colônia</i>	<i>Agregamento das hifas (*)</i>
<b>Sabouraud</b>	++++ Diâmetro aproximado: 3,5cm.	Inicialmente branca, após a maturação da colônia creme.	Aspecto topográfico quebradiço e umbilicado.	+++
<b>YPE</b>	+++ Diâmetro : 3,5 cm.	Branca.	Levemente verrucosa	++++
<b>YPG</b>	+++ Diâmetro aproximado: 3,5cm.	Branca.	Cotonosa com anéis concêntricos discretos.	++++
<b>YPD 10% D</b>	++++ Diâmetro aproximado: 4,5cm.	Acobreada, posteriormente regiões cobertas por hifas aéreas.	Cerebriforme, semelhante ao cultivo leveduriforme a 36°C.	+++

**Tabela 4.2-(cont.)** Principais características macromorfológicas de *P. brasiliensis* em sua fase filamentosa, em diferentes meios de cultura sólidos.

<b>Meio de cultivo</b>	<b>Crescimento e desenvolvimento</b>	<b>Coloração</b>	<b>Aspecto da colônia</b>	<b>Agregamento das hifas (*)</b>
<b>YPD</b>	++++	Branca.	Cotonosa e altamente rugosa.	++++
<b>YPE</b>	+++ Diâmetro aproximado: 3,5cm	Branca	Cotonosa e levemente verrucosa	++++
<b>YPG</b>	+++ Diâmetro aproximado: 3,5cm	Branca	Cotonosa com presença de anéis concêntricos	++++
<b>SC</b>	+ Diâmetro entre 2 e 2,5cm.	Branca.	Cotonosa e verrucosa.	+++
<b>WO</b>	++ Diâmetro aproximado: 2cm.	Branca.	Cotonosa e levemente verrucosa.	+++
<b>EG</b>	++++ Diâmetro aproximado: 4cm.	Branca.	Cotonosa e rugosa, levemente umbilicada.	++++
<b>Batata</b>	+++ Diâmetro aproximado de 3 cm.	Branca e creme.	Aspecto parcialmente quebradiço, colônia não densa.	+++
<b>YPD 0,5% D</b>	+++ Diâmetro aproximado: 3 a 3,5cm	Branca.	Cotonosa, minimamente verrucosa.	++++
<b>YPD 2% G</b>	4,5 a 5cm.	Branca.	Cotonosa com anéis concêntricos e falhas	++++

(\*) +: baixo/ruim; ++: médio/ razoável; +++: bom; ++++: muito bom/ intenso



**Fig. 4.2-**Morfologia das colônias em fase miceliana de *P. brasiliensis*, cultivadas em diferentes meios.após cerca 4 semanas. **A)** Sabouraud; **B)** YPE; **C)** YPG; **D)** YPD 10%D; **E)** YPD 0,5% D; **F)** YPD 2%G; **G)** YPD; **H)** EG; **I)** Batata; **J)** Kac; **L)** Sc; **M)** Wo

Sabe-se que para muitos fungos, a aparência das colônias varia com a composição do meio de cultura, sendo também a temperatura agente influente nesta diversificação. Moore (1935; 1938), no início dos estudos de *P. brasiliensis* criou as

espécies *P. cerebriformis* e *P. tenuis*, sendo logo invalidadas devido ao fato de serem variantes morfológicas de uma única espécie (LACAZ, 1991).

O cultivo de *P. brasiliensis* à temperatura ambiente é o mais empregado em sua preservação *in vitro*, pois nestas condições, principalmente em meios ricos as células podem ser armazenadas com repiques trimestrais, ou protegidas por óleo mineral por cerca de um ano (LACAZ, 1982).

A morfologia diferenciada desenvolvida pelas culturas nos diversos meios é aparente a partir do primeiro mês de cultivo. As modificações se acentuam gradativamente, sendo as colônias maduras em meio YPD 10% Dextrose, Sabouraud, YPD 2% Glicerol, YPD, EG e Batata as que exibem morfologias marcadamente distintas.

A adaptação metabólica exigida pelo cultivo em meio YPD 10% Dextrose, como observado em meio líquido, leva a um crescimento inicialmente lento, seguido de um desenvolvimento acentuado tardio. Após aproximadamente 6 semanas de incubação à temperatura ambiente, período em que os demais cultivos já atingiram a fase madura, percebe-se que a cultura em YPD 10% Dextrose intensifica seu crescimento, transformando-se em uma colônia creme-acobreada de aspecto cerebriforme, muito semelhante à fase leveduriforme encontrada no cultivo do mesmo à 36°C. O exame microscópico da colônia desenvolvida em YPD 10% Dextrose revela desde o início de seu desenvolvimento hifas comuns, sem a presença de estruturas leveduriformes, apesar da aparência macroscópica sugerir este estado. Cano e Aguiar, (1991), realizaram um interessante estudo sobre a influência de aminoácidos no crescimento de vários isolados de *P. brasiliensis*, onde observou-se que dois dos isolados estudados, Bt2 e 728, quando cultivados em

MMS (meio mínimo suplementado) apresentaram o aspecto cerebriforme e membranoso, semelhante àquele observado em nossos resultados com relação ao meio YPD 10% Dextrose. Ainda neste trabalho, foi constatado que alterações na presença de determinados aminoácidos e bases nitrogenadas provocam alterações na coloração, textura, e ritmo de crescimento de determinados isolados, constatando que *P. brasiliensis* manifesta sensibilidade à modificações no conteúdo nutricional dos meios, com alterações também morfológicas.

Quando o crescimento da fase filamentosa em outros meios se torna estável, o que se constata em 3 meses de cultura aproximadamente, o fungo cultivado em YPD10% Dextrose intensifica seu crescimento tanto em diâmetro como em altura, sendo gradativamente coberto por hifas aéreas (Figura 4.3).



**Fig. 4.3-** Colônias micelianas de *P. brasiliensis* em meio YPD10% Dextrose. À esquerda, cultivada por 2 meses, à direita por 6 meses. Notar a bobertura discreta por hifas aéreas na segunda colônia.

O cultivo e a manutenção de colônias de *P. brasiliensis* é realizado freqüentemente em ágar-Sabouraud, ágar- extrato de levedura e ágar – YPD. Neste trabalho, procuramos examinar o desenvolvimento e aparência comparativa de um isolado de *P. brasiliensis* em um amplo leque de meios de cultivo, algo que até o momento não havia sido realizado. *P. brasiliensis* revelou-se um fungo com alta

capacidade biossintética, por apresentar crescimento em meios pobres como WO e KAc, e de metabolismo associado à sua morfologia, quando compara-se a aparência distinta obtida nos diversos meios de cultivo avaliados. No entanto, após repiques sucessivos nos mesmos meios, as células parecem não se desenvolver bem, apresentando uma tendência a transformarem-se em hifas. Ao serem transferidas para meios ricos como YPD, retornam ao seu metabolismo comum.

De acordo com Lacaz, (1982), o crescimento de *P. brasiliensis* em ágar-Sabouraud se dá em aproximadamente 20 a 30 dias, sob a forma de colônias brancas aderentes ao meio. Os resultados obtidos em nosso trabalho com relação a este meio diferem daqueles descritos anteriormente por Lacaz. Como demonstrado na Tabela e Figura 4.2, as características apresentadas por *P. brasiliensis* em ágar – Sabouraud são de micélio com aspecto quebradiço de coloração creme. Tal fato deve-se provavelmente a utilização no presente estudo do isolado Pb 18, que talvez seja morfologicamente distinto de outros isolados.

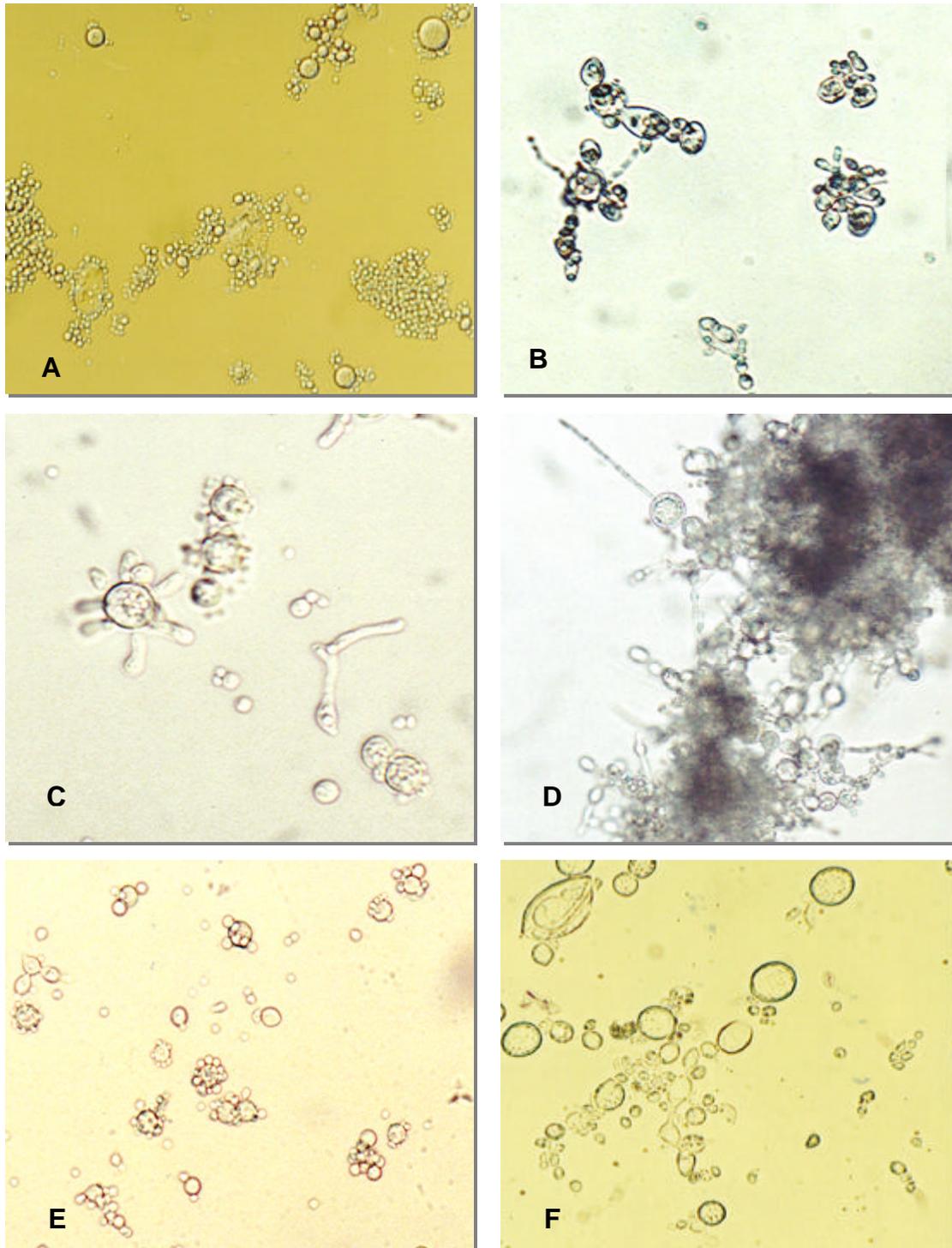
#### **4.3 Análise Comparativa da Fase Leveduriforme de *P. brasiliensis* Obtida nos 12 Diferentes Meios de Cultura Líquidos a 36°C.**

A tabela 4.3 apresenta as principais características morfológicas observadas a partir das amostras obtidas de cada um dos meios de cultura líquidos, as análises foram realizadas aos 3, 7 e 15 dias de cultivo.

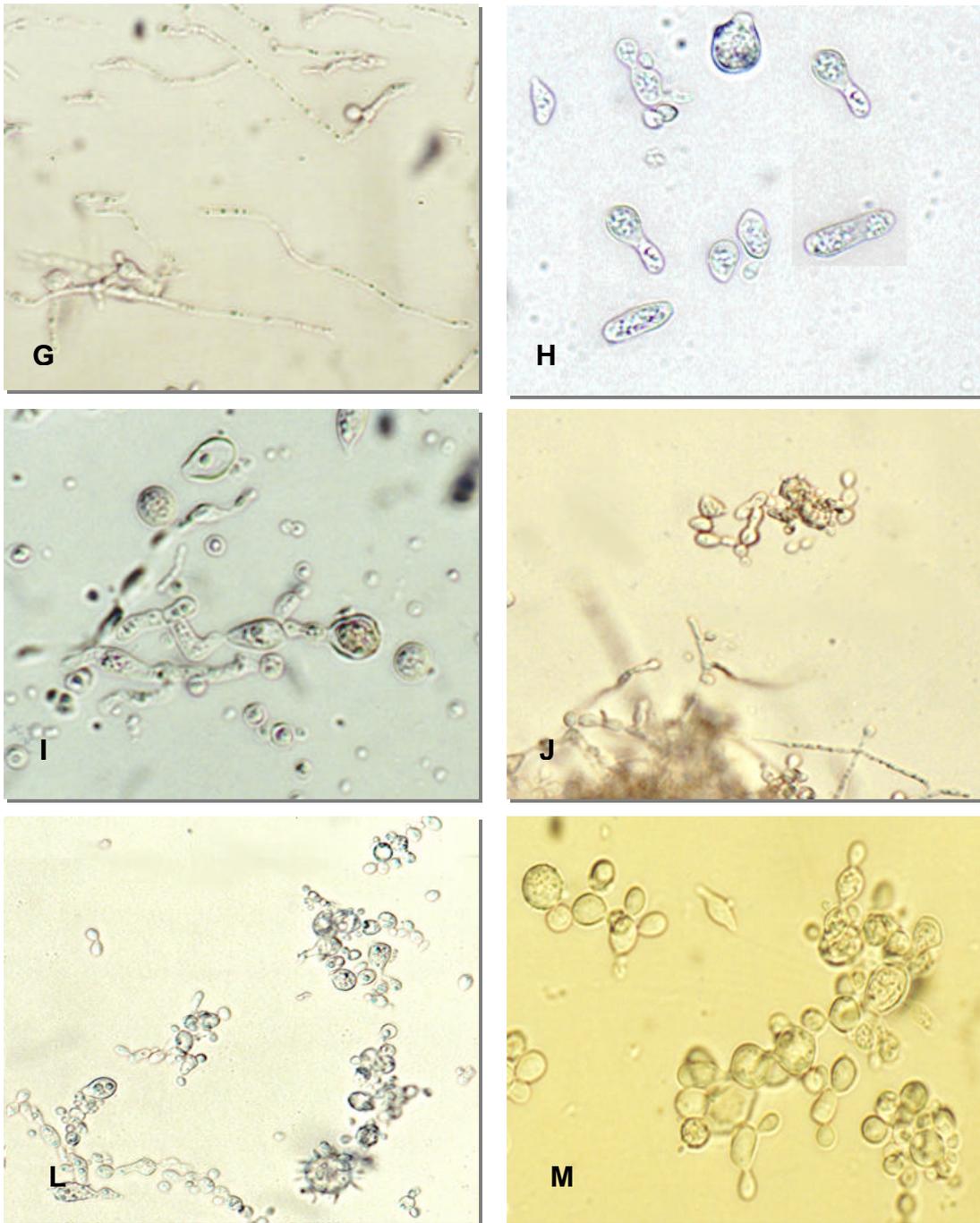
**Tabela 4.3-** Principais características micromorfológicas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* cultivada a 36°C .

<b>Cultura</b>	<b>Principais características observadas</b>
<b>YPG</b>	Em todo o período observa-se cadeias de pseudo hifas catenuladas com poucas células dispersas ou em exoesporulação múltipla.
<b>YPE</b>	Inicialmente apresenta células em exoesporulação múltipla, células esféricas isoladas, pseudo hifas catenuladas e delgadas. Posteriormente, predomina-se pseudo hifas catenuladas de grandes cadeias de elementos intensamente agregados.
<b>YPD 10% D</b>	Inicialmente observa-se muitas células esféricas plasmolisadas, algumas células em exoesporulação múltipla e muitas pseudo hifas aglomeradas- também observa-se algumas hifas delgadas (característica filamentosa). Logo em seguida as hifas desaparecem havendo a predominância de pseudo hifas catenuladas.
<b>YPD 2% G</b>	Desde o início apresenta pseudo hifas catenuladas com cadeias de vários elementos, poucas células esféricas e em exoesporulação múltipla.
<b>YPD 0,5% D</b>	No início apresenta células em exoesporulação múltipla, células esféricas agrupadas e algumas células dispersas. Posteriormente observa-se grandes aglomerados de células esféricas e também de pseudo hifas catenuladas.
<b>YPD</b>	Inicialmente observa-se pseudo hifas catenuladas em pequenas cadeias isoladas ou agrupadas, algumas hifas delgadas também são vistas. Posteriormente as hifas desaparecem dando lugar a células esféricas agrupadas ou isoladas, células em exoesporulação múltipla e pseudo hifas catenuladas.
<b>SC</b>	No início do cultivo observa-se inúmeras hifas delgadas características da fase filamentosa, posteriormente observa-se muitas células mortas, plasmolisadas e muitas células em exoesporulação múltipla. Este não é um meio adequado para o cultivo de <i>P. brasiliensis</i> .
<b>WO</b>	No 3º dia de cultivo observa-se muitas hifas e pseudo hifas, poucas células esféricas. Depois desenvolvem-se pequenas células em forma de elipse, alongadas e esféricas, também são encontradas muitas células mortas.
<b>KAc</b>	Desde o início do cultivo são encontradas inúmeras células em exoesporulação múltipla, eventuais pseudo hifas catenuladas são observadas. As modificações morfológicas observadas durante o cultivo se referem apenas ao número de células plasmolisadas que se intensifica com o passar dos dias.
<b>EG</b>	Inicialmente células em exoesporulação múltipla, células esféricas isoladas e agrupadas juntamente de pseudo hifas catenuladas e delgadas são observadas. Posteriormente há a predominância de pseudo hifas catenuladas que se aglomeram intensamente.
<b>Sabouraud</b>	No início do cultivo observa-se células em exoesporulação múltipla (roda- de- leme), células esféricas isoladas e pseudo hifas catenuladas agrupadas. Posteriormente observa-se o predomínio de pseudo hifas catenuladas, geralmente em cadeias de 3 elementos.

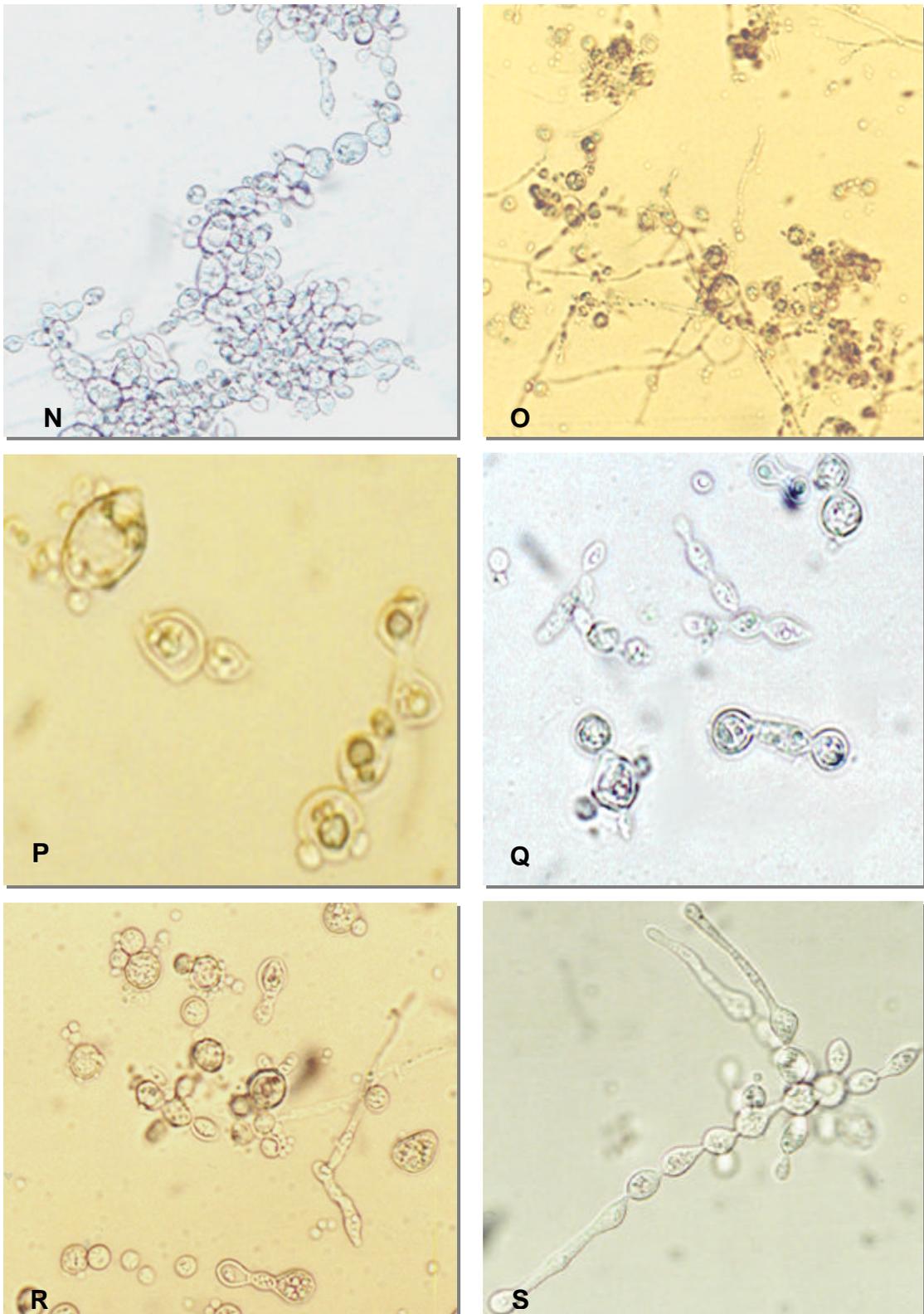
Abaixo se encontram relacionadas imagens obtidas ao microscópio referentes ao cultivo de *P. brasiliensis* em meios líquidos a 36°C.



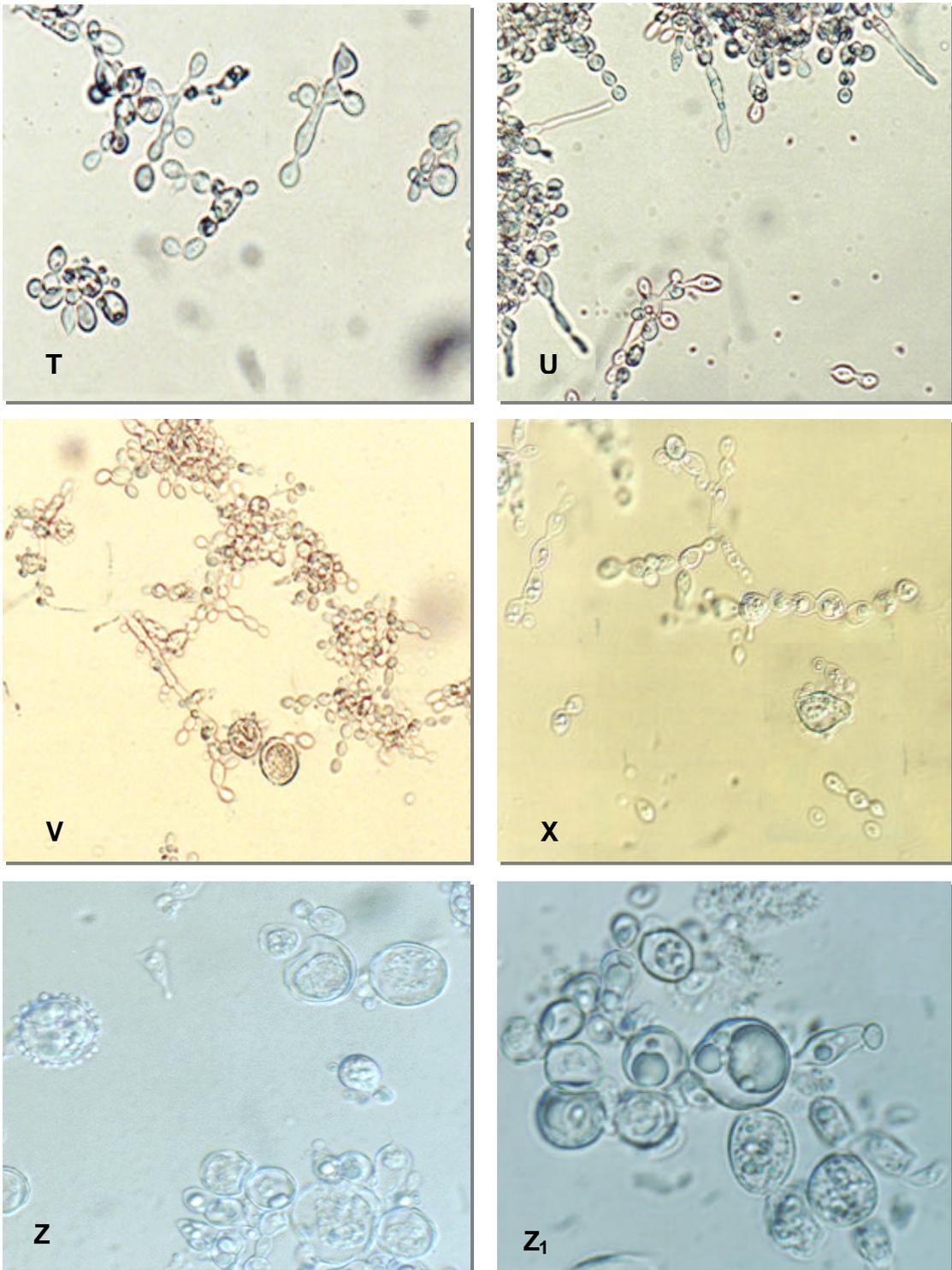
**Fig. 4.4- Aspecto microscópico** da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* em diversos meios de cultivo. **A-** Batata, 3 dias 100X- DIC; **B-** Batata, 15 dias 400X; **C-** EG, 3 dias 400X; **D-** EG, 15 dias 400X; **E-** KAc, 3 dias 200X; **F-** KAc, 15 dias 400X.



**Fig. 4.4 (cont.)** - **G**- WO-3dias- DIC; **H**- WO, 7 dias 400X; **I**- WO, 15 dias 400X; **J**- YPD, 3 dias 200X; **L**- YPD,15 dias 200X; **M**- YPD 0,5%D, 3 dias 400X.



**Fig. 4.4 (cont.)-** **N-** YPD 0,5%D 15 dias, 400X- DIC; **O-** YPD 10%D 3 dias, 200X, DIC; **P-** YPD 10%D 7 dias, 400X; **Q-** YPD 10%D 15 dias, DIC;**R-** YPE 3 dias, 400X, DIC; **S-** YPE,15 dias 200X, DIC



**Fig.4.4 (cont.)**- T- YPG 3 dias, 400X- DIC; U- YPG 15 dias, 400X, DIC; V- YPD 2%G 3 dias, 200X; X- YPD 2%G 15 dias 400X, DIC; Z- SC 3 dias, 400X, DIC; Z<sub>1</sub>- SC, 15 dias 200X

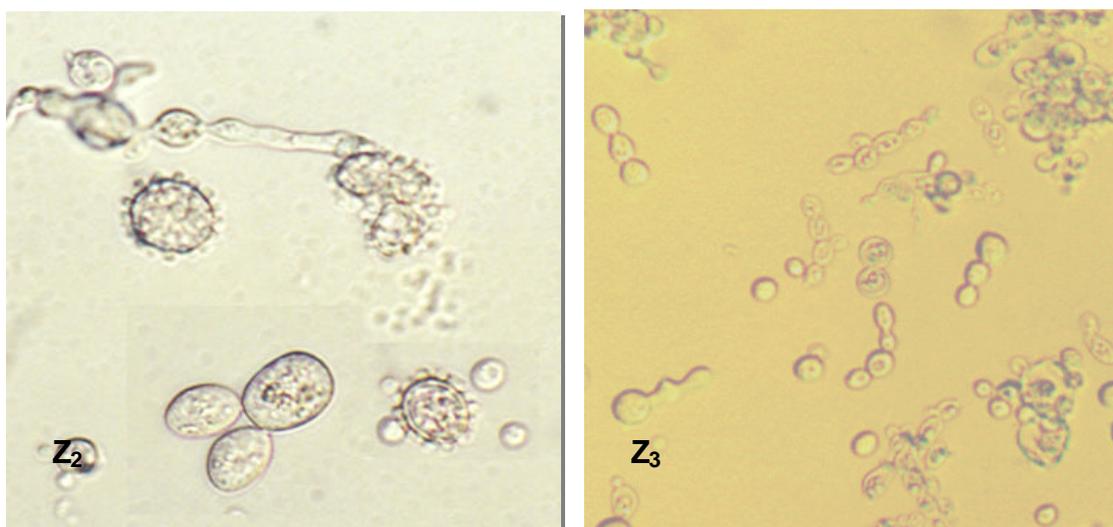


Fig. 4.4 (cont)- Z<sub>2</sub>- Sabouraud, 3 dias 400X- DIC; Z<sub>3</sub>- Sabouraud 15 dias, 400X, DIC;

#### 4.4 Análise Comparativa da Fase Leveduriforme de *P. brasiliensis* Obtida nos Diferentes Meios de Cultivo Sólidos a 36°C.

O cultivo da fase leveduriforme do isolado Pb 18 revelou em meios sólidos diversidade morfológica, a qual encontra-se resumida na Tabela 4.4.

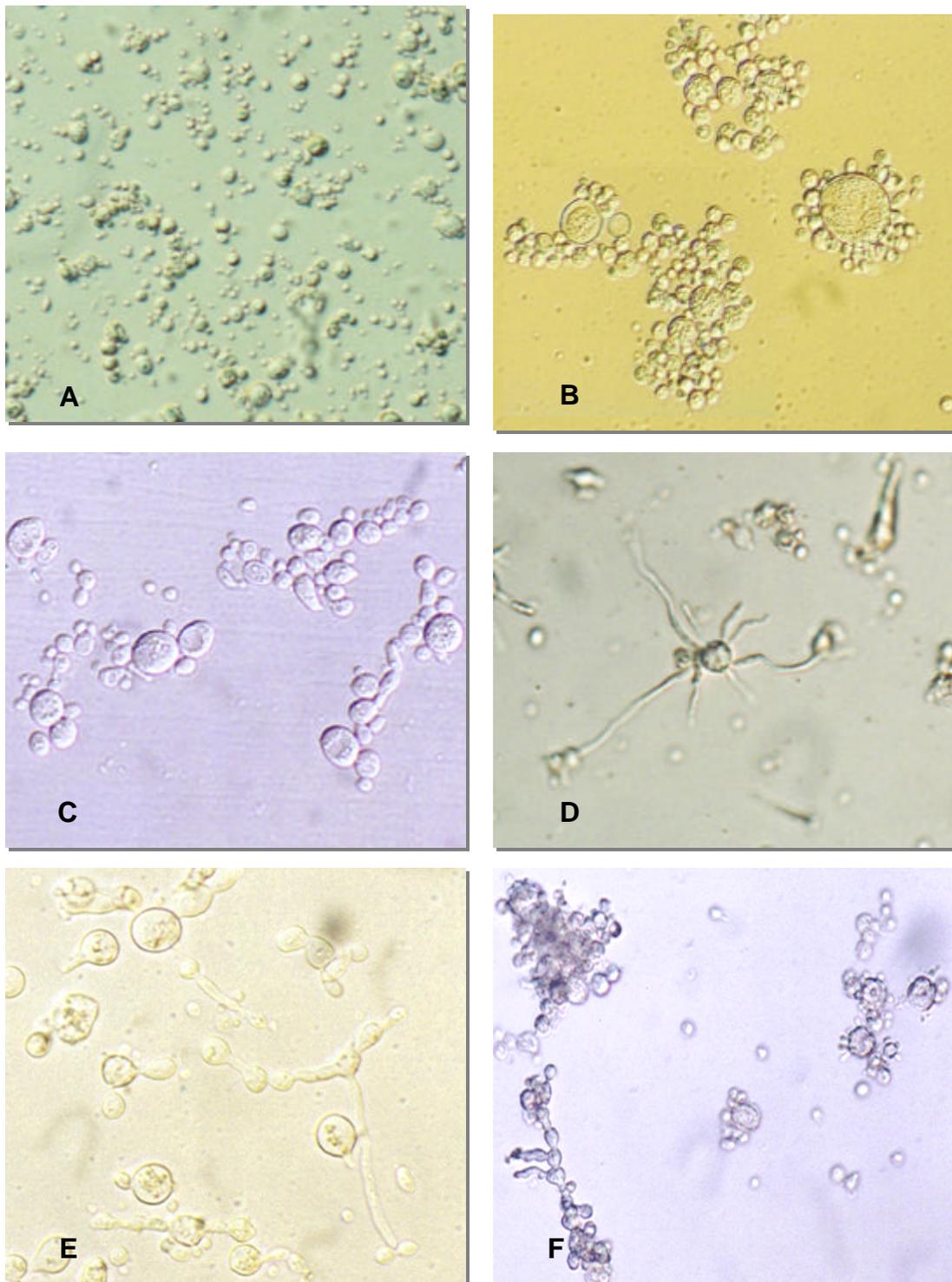
Tabela 4.4- Características morfológicas observadas nos diversos meios de cultivo sólidos.

<b>Meio de Cultivo</b>	<b>Principais Características Micromorfológicas Observadas</b>
<b>Sabouraud</b>	Presença de várias células pequenas e esféricas dispersas, pseudo hifas catenuladas com cadeias de poucos blastoconídios ( em geral até 5 ), células em exoesporulação múltipla não intensa.
<b>YPE</b>	Inicialmente observa-se pseudo hifas catenuladas pouco desenvolvidas (em sua maioria cadeias de 3 blastoconídios), também algumas células esféricas agrupadas e/ou isoladas. Posteriormente as pseudo hifas desenvolvem-se em grandes cadeias de elementos catenulados intensamente agrupadas.
<b>YPG</b>	Morfogênese semelhante ao cultivo em YPE: pseudo hifas catenuladas e não catenuladas predominantes. Poucas células apresentam exoesporulação múltipla.

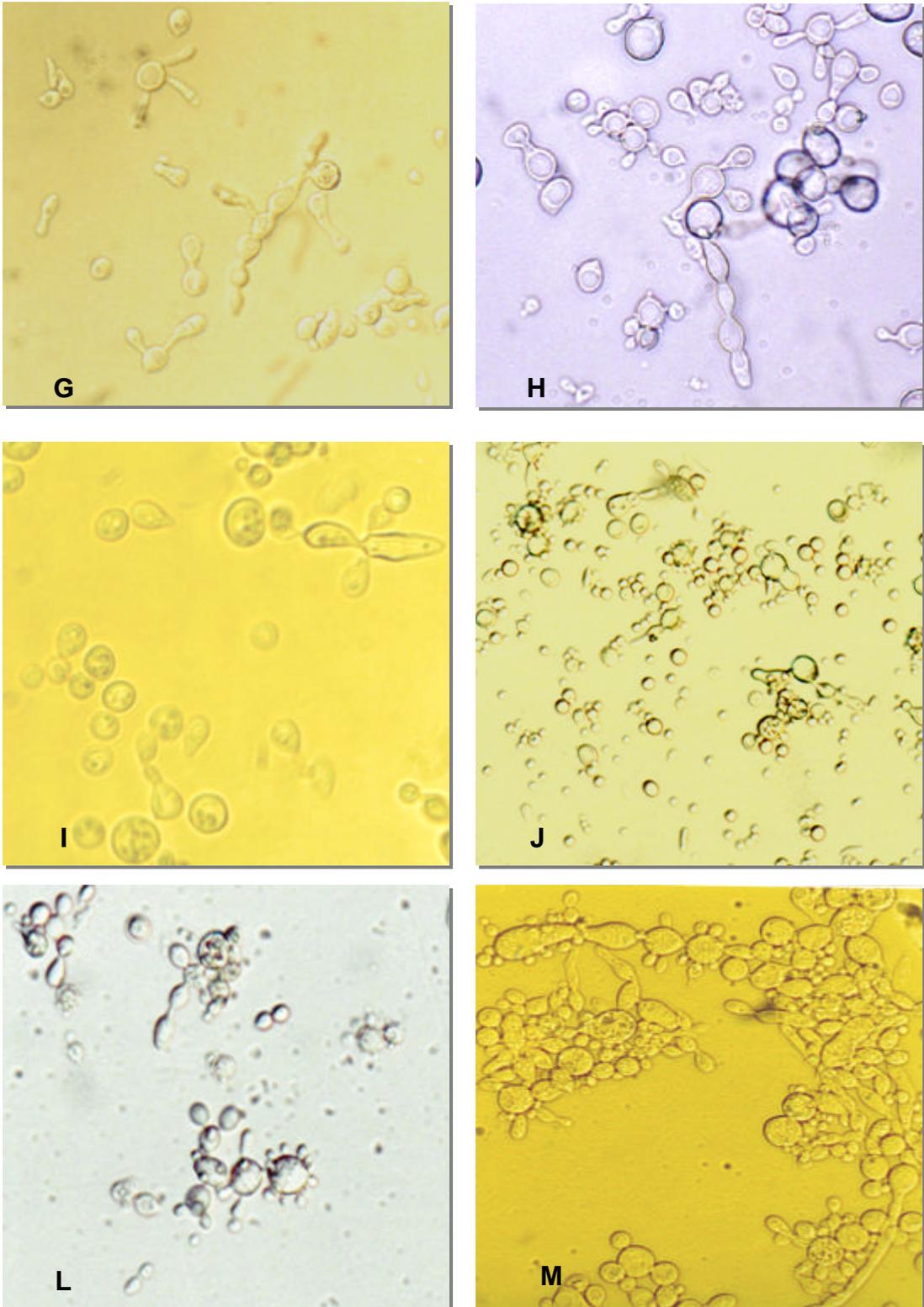
**Tabela 4.4 (cont.)-** Características morfológicas observadas nos diversos meios de cultivo sólidos.

<b>Meio de Cultivo</b>	<b>Principais Características Micromorfológicas Observadas</b>
<b>YPD 10% D</b>	No início do cultivo observa-se células esféricas e ovóides em geral agrupadas, pseudo hifas catenuladas e não catenuladas- muitas células mortas. Posteriormente pseudo hifas predominam no cultivo, células não apresentam-se adaptadas ao meio.
<b>YPD 0,5% D</b>	Inicialmente células em exoesporulação múltipla contendo pseudo hifas, muitas células esféricas agrupadas e também dispersas. Com o avanço do crescimento, as células tendem a formar grandes cadeias de pseudo hifas e se agruparem intensamente.
<b>YPD 2% G</b>	No início do cultivo (3 dias) observa-se muitas pseudo hifas delgadas, muito semelhantes à hifas da fase miceliana, posteriormente as células perdem esta característica dando lugar principalmente à pseudo hifas catenuladas de vários elementos.
<b>SC</b>	Células visivelmente não sobrevivem neste meio. Caracterizado por grande quantidade de células mortas. São observadas muitas células em exoesporulação múltipla, pseudo hifas são encontradas em menor quantidade.
<b>WO</b>	Inicialmente observa-se elementos esféricos grandes e pequenos dispersos ou aglomerados, pseudo hifas catenuladas e não catenuladas pouco desenvolvidas, eventuais células em exoesporulação múltipla. Em geral, a partir no 7º dia de cultivo inicia o processo de transição de levedura para micélio a 36°C.
<b>KAc</b>	Muitas células isoladas, dispersas e em discretos agrupamentos, pseudo hifas catenuladas em menor quantidade, várias células em exoesporulação múltipla- neste meio as células possuem uma baixa viabilidade.
<b>EG</b>	Observa-se praticamente durante todo o cultivo pseudo hifas catenuladas e não catenuladas pouco desenvolvidas, algumas células esféricas dispersas e agrupadas. Eventuais células em exoesporulação múltipla.
<b>Batata</b>	Exibe alta celularidade com muitas células em exoesporulação múltipla. Em geral a partir do 7º de cultivo dia de cultivo exibe o dimorfismo incomum- iniciando gradualmente o processo dimórfico a 36°C.
<b>YPD</b>	Pseudo hifas catenuladas e não catenuladas usualmente agrupadas; elementos esféricos e ovóides aglomerados, algumas células em exoesporulação.

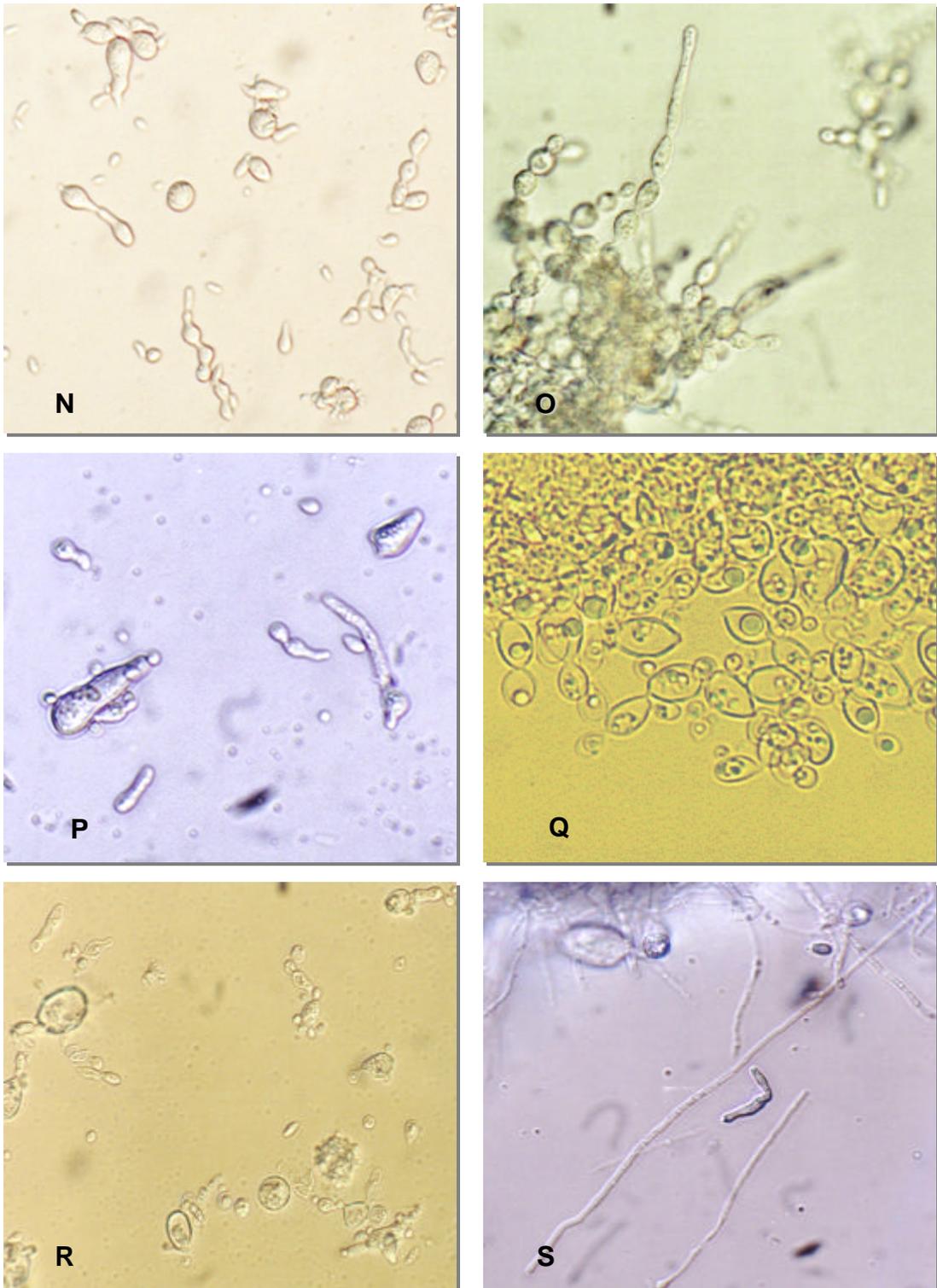
As principais características micromorfológicas de *P.brasiliensis* observadas nos meios sólidos a 36°C encontram-se documentadas na Figura 4.4.



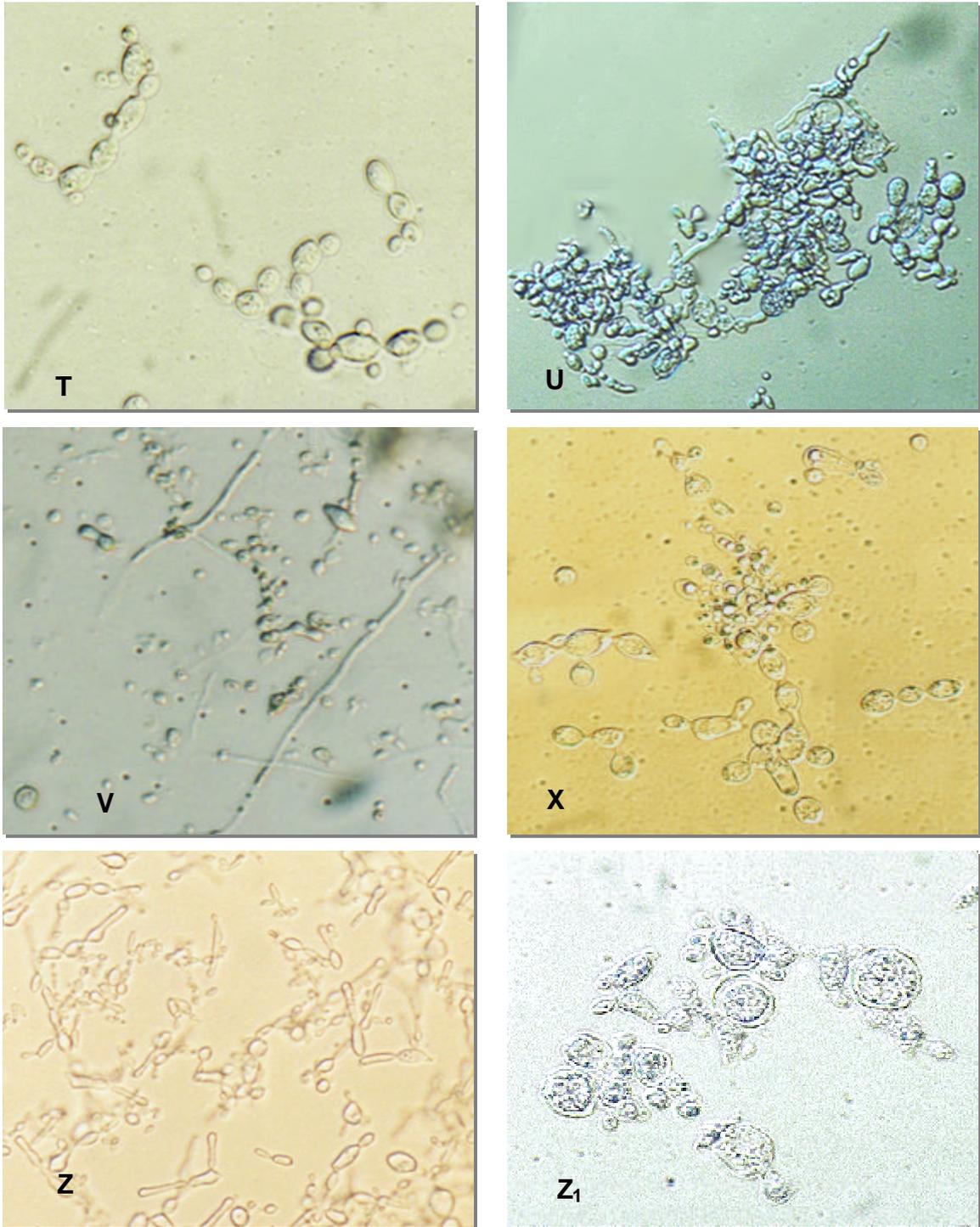
**Fig 4.4-** Principais características micromorfológicas de *P.brasiliensis* observadas nos meios sólidos a 36°C **A-** Batata 3 dias, 200X, DIC; **B e C-** Batata (7 dias sem dimorfismo)- 400X, DIC; **D-** YPD 0,5%D 3 dias, 400X, DIC; **E-** YPD 0,5%D 7 dias, 400X, DIC; **F-** YPD 0,5%D 15 dias, 200X DIC.



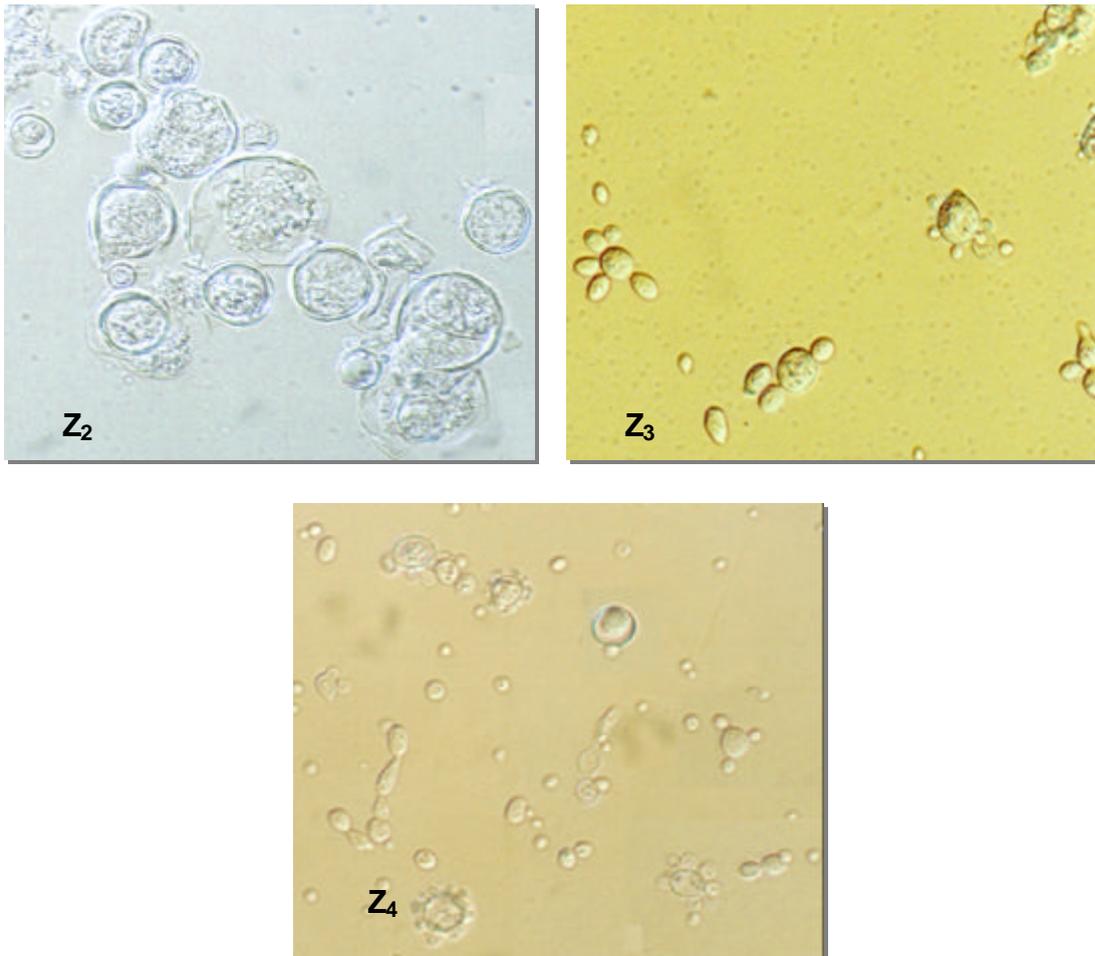
**Fig. 4.4 (cont.)-** **G-** EG 3 dias, 400X, DIC; **H-** EG 15 dias, 400X, DIC; **I-** KAc 1000X , 3 dias, DIC; **J-** KAc 15 dias, 200X, DIC; **L-** YPG 3 dias, 200X , DIC; **M-** YPG 15 dias, DIC.



**Fig. 4.4 (cont.)-** **N-** YPE 3 dias, 400X, DIC; **O-** YPE 15 dias, 400X, DIC; **P-** YPD 10% D 3 dias, 400X, DIC; **Q-** YPD 10%D 15 dias, DIC; **R-** WO 3 dias, 200X , DIC; **S-** WO 15 dias, DIC.



**Fig.4.4 (cont.)** T- YPD 3 dias, 400X, DIC; U- YPD 15 dias, 400X, DIC; V- YPD 2% G 3 dias, 200X, DIC; X- YPD 2%G 15 dias, 400X, DIC; Z- YPD 2% G, 200X , DIC; Z<sub>1</sub>- SC 15 dias, 400X, DIC.



**Fig. 4.4 (cont.)-** Z<sub>2</sub>- SC 15 dias, 400X, DIC; A<sub>1</sub>- Sabouraud , 3 dias 400X, DIC; A<sub>2</sub>- Sabouraud 15 dias 400X, DIC.

Borba *et al*, (1999), cultivaram células do isolado Pb 3698R em meio YPD sólido e líquido, e observaram após 72h que as células em meio sólido apresentaram-se mais saudáveis que aquelas cultivadas em meio líquido- nestes foi observada uma grande proporção de células com com baixa viabilidade e características de apoptose. Em meio líquido muitas células são encontradas com o citoplasma plasmolisado e parede celular aparentemente intacta, porém as células sem danos apresentam-se semelhantes àquelas cultivadas em meios sólidos.

De acordo com Lilly e Barnett, (1951), o ágar introduz elementos importantes no meio, possivelmente contendo significativas quantidades de Zinco e outros

elementos traço. Esses autores também enfatizam que muitos fungos podem crescer em ágar água, indicando que o ágar contém substâncias que podem ser utilizadas pelos fungos. Day, (1942), descreve que o ágar contém fatores de crescimento como tiamina. Também seria possível que o crescimento sobre uma superfície influencie a viabilidade para este fungo e talvez não dilua tanto substâncias que promovem o crescimento e a viabilidade e que seriam produzidas pelas próprias células presentes.

Sabe-se que *P. brasiliensis* se desenvolve e produz diversos tipos de conídios em ágar água (TELLES, 1994), já Restrepo *et al* (1986), descrevem uma técnica para coletar conídios através do cultivo de *P. brasiliensis* em ágar água.

Em nossos resultados também foi observado um melhor desenvolvimento das células leveduriformes em meios sólidos, onde estas aparentam um melhor desenvolvimento quando comparadas com o cultivo em meios líquidos, os quais por sua vez apresentam um grande número de células mortas. Quando submetidas à coloração com o corante para viabilidade célula Trypan blue (DIFCO), as células cultivadas em meios sólidos apresentam-se mais viáveis que as cultivadas em meio líquido.

Quanto à morfologia leveduriforme observada nos meios líquidos e sólidos não se encontram diferenças significativas.

#### **4.5 Avaliação da micromorfologia de *P. brasiliensis* em sua fase filamentosa cultivada em diferentes meios sólidos à temperatura ambiente.**

Sabe-se que o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, na fase miceliana, apresenta hifas hialinas septadas e ramificadas, podendo conter ou não

conídios(estruturas ligada à reprodução assexuada), em condições adversas produzem clamidósporos, que não são conídios, mas sim estruturas de resistência (LACAZ, 1991).

Em nossos resultados observamos principalmente a produção de clamidosporos, intercalares e terminais.

A Tabela 4.5 apresenta em resumo as principais características micromorfológicas da fase filamentosa observadas nos diferentes meios de cultivo, as microfotografias foram registradas quando as culturas atingiram 1 mês, sendo repetido aos 2 meses de cultivo.

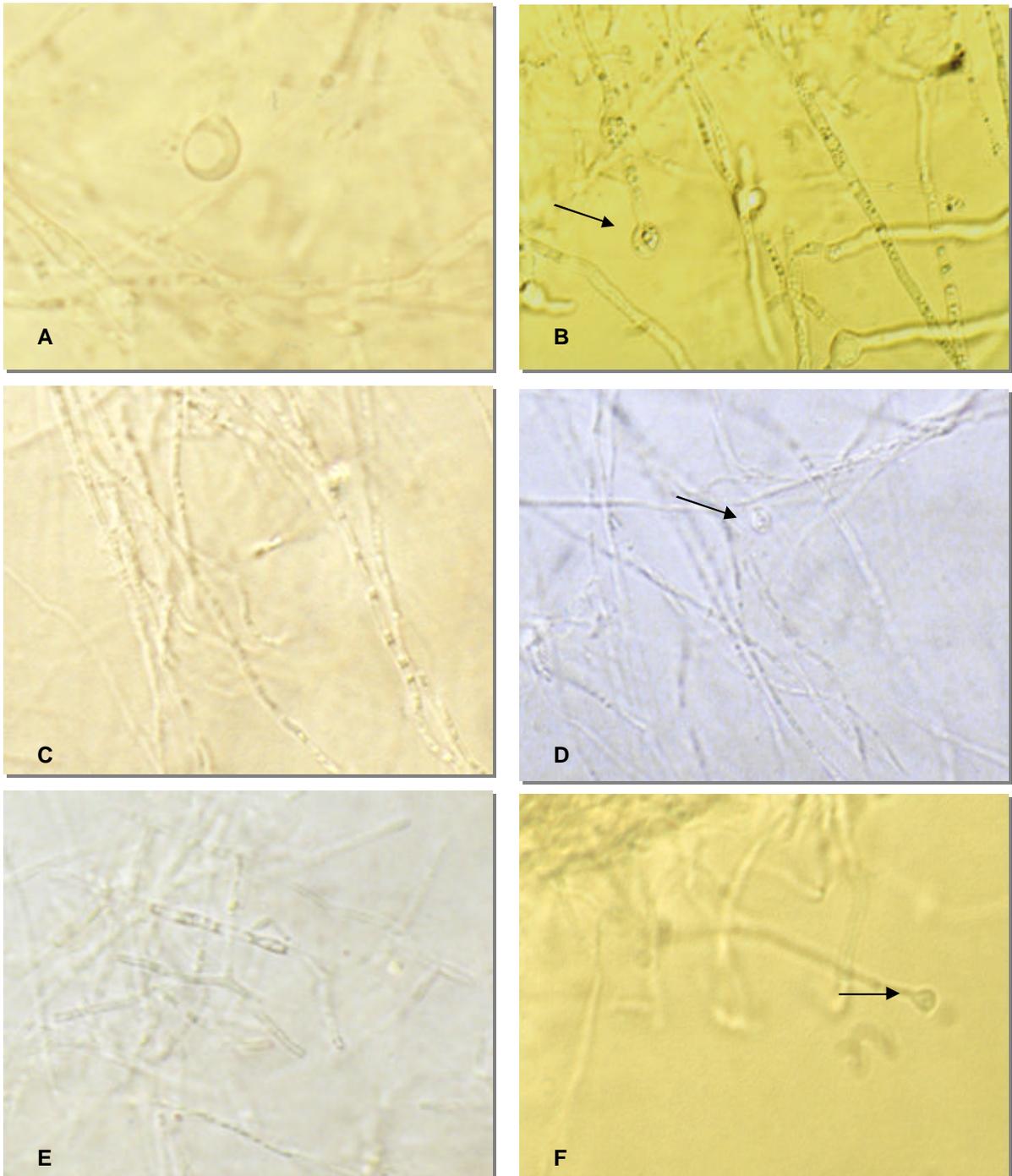
**Tabela 4.5-** Principais características micromorfológicas observadas na fase filamentosa de *P. brasiliensis*.

<b>Meio de Cultura</b>	<b>Características Comumente Observadas</b>
<b>YPD 10% D</b>	Hifas longas, médias e delgadas apresentando nitidamente muitos clamidosporos intercalares e terminais, também encontra-se pequenas hifas.
<b>YPD 0,5% D</b>	Hifas longas, não muito delgadas, contendo clamidosporos em sua maioria intercalares; micélio altamente denso.
<b>YPD 2% G</b>	Hifas longas, não muito delgadas; poucos clamidosporos; micélio altamente denso.
<b>YPD</b>	Hifas longas, não muito delgadas; ausência de clamidosporos; micélio altamente denso e hialino.

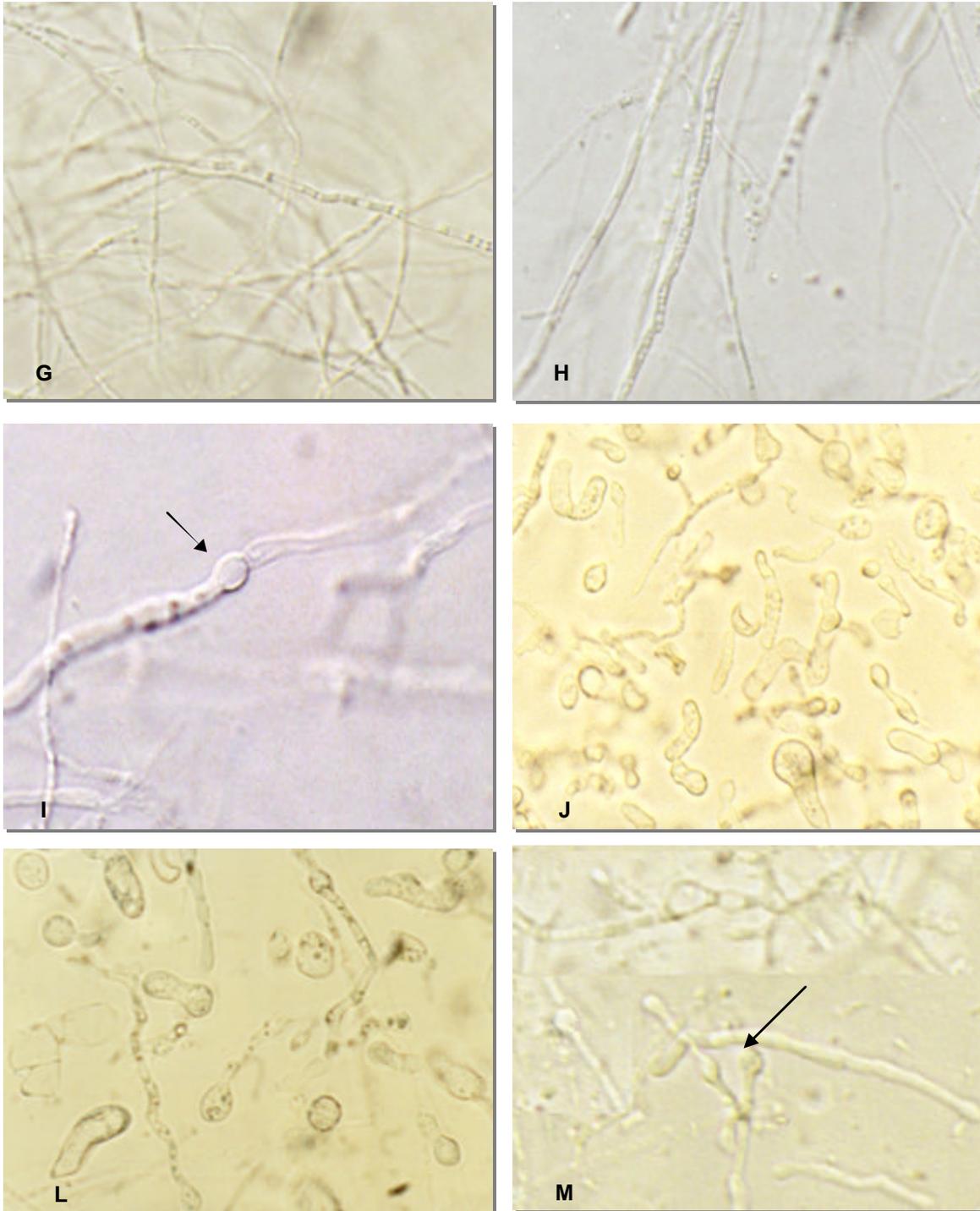
**Tabela 4.5 (cont.)-** Principais características micromorfológicas observadas na fase filamentosa de *P. brasiliensis*.

<b>Meio de Cultura</b>	<b>Características Comumente Observadas</b>
<b>WO</b>	Hifas curtas, não muito delgadas, com presença considerável de clamidocoinídios intercalares e terminais, abundância em células esféricas em processo dimórfico.
<b>SC</b>	Hifas pouco longas e delgadas; presença abundante de clamidosporos intercalares, terminais, piriformes.
<b>YPE</b>	Hifas longas e delgadas, demasiadamente hialinas, com ausência de conídios no primeiro mês de cultivo. A partir do segundo mês de cultivo observa-se eventuais clamidosporos intercalares
<b>YPG</b>	Hifas longas e delgadas contendo eventuais clamidosporos intercalares.
<b>EG</b>	Hifas longas e desenvolvidas, contendo alguns clamidosporos intercalares e terminais.
<b>KAc</b>	Micélio extremamente denso e hialino, dificultando a visualização. Apresenta hifas altamente entrelaçadas. Poucos clamidosporos foram observados.
<b>Batata</b>	Hifas longas, delgadas, repletas de clamidosporos intercalares e terminais. Micélio não muito denso, possibilitando ótima visualização das estruturas micelianas. Neste meio foi observada a maior produção de clamidosporos.
<b>Sabouraud</b>	Presença de hifas delgadas não muito longas, contendo vários clamidosporos intercalares e terminais.

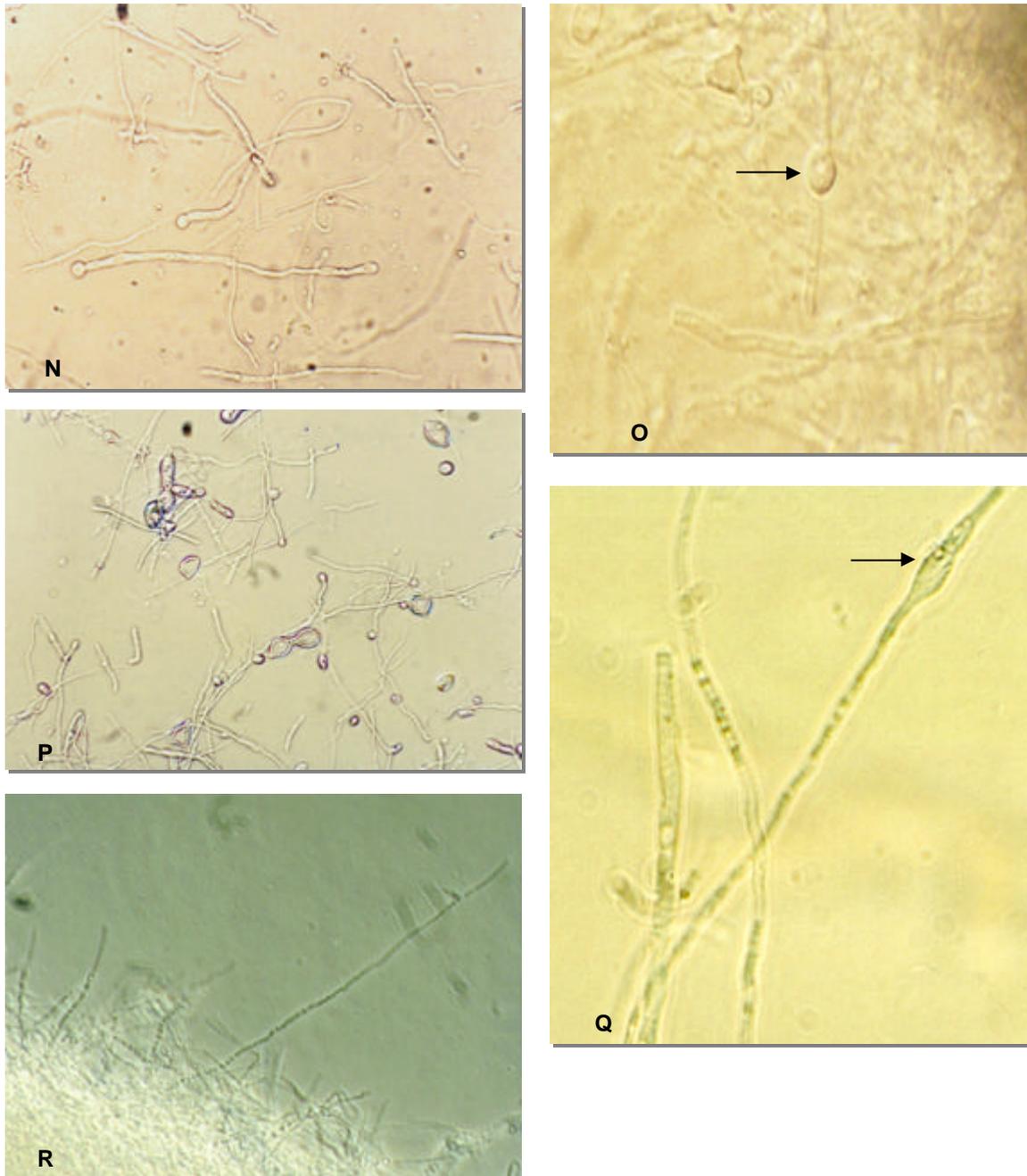
As características morfológicas da fase filamentosa obtida a partir de cada uma das culturas de *P. brasiliensis* nos meios sólidos descritas na Tabela 4.5 estão documentadas na Figura a seguir.



**Fig. 4.5-** Morfologia apresentada por *P. brasiliensis* em sua fase filamentosa em diferentes meios de cultivo. **A-** Batata 1000X- DIC; **B-**Batata 1000X- DIC; **C-** YPD 05%D 400X- DIC; **D-** EG 400X- DIC; **E-** Kac 400X- DIC; **F-** Kac 400X, DIC; (setas indicando clamidosporo).



**Fig. 4.5 (cont.)-** **G-** YPG 400X- DIC; **H-** YPE 400X- DIC; **I-** YPE 1000X- DIC (2 meses de cultivo) ; **J-** YPD 10% D 1000X- campo claro; **L-** YPD 10%D 1000X- campo claro; **M-** WO 400X- DIC; (setas indicando clamidosporo).



**Fig. 4.5 (cont.)-** **N-** Sabouraud 400X- DIC; **O-** YPD 2%G 1000X- DIC; **P-** SC 400X- DIC; **Q-** SC 400X- DIC (seta indicando clamidosporo terminal piriforme); **R-** YPD 400X- contraste de fase

Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, originam-se de esporos, estruturas reprodutivas assexuadas formadas em conídios. O resultado da germinação é a saída de um ou mais filamentos delgados, conhecidos como tubos germinativos do esporo. A partir do desenvolvimento destes tubos germinativos, origina-se o micélio. Os conídios possuem em seu interior substâncias de reserva como glicogênio, e ao encontrar as condições apropriadas como umidade, nutrientes e calor, germinam (SILVEIRA, 1995).

As hifas encontradas em *P. brasiliensis* são septadas, característica dos fungos mitospóricos, o cultivo de *P. brasiliensis* em ágar - água apresenta diversos tipos de esporos exógenos, sendo eles artroconídios ou aleurioconídios, os quais são esporos que se formam pela fragmentação do micélio (extrusão em hifas esporógenas); aleuriósporos ou aleurioconídios, que são as estruturas em *P. brasiliensis* mais semelhantes a um verdadeiro conídio, diferenciando-se destes pelo fato de não se soltar da hifa pelos meios comuns de deiscência, e também denominado macroconídio ou simplesmente conídio. Esporos piriformes terminais também são encontrados (SAN- BLAS, 1986; TELLES, 1994; SILVEIRA, 1995). Artroconídios e aleurioconídios também são freqüentemente encontrados em colônias velhas (RESTREPO, 1970), já clamidosporos são observados mais frequentemente em colônias jovens (SAN- BLAS, 1986).

San- Blas,(1986), estudou a ultraestrutura da formação de conídios do isolado IVIC Pb73 cultivado em meio líquido extrato de levedura, à 23°C. O processo de formação dos conídios foi dividido em dois estágios: formação e desenvolvimento de corpos esféricos associados à produção de clamidósporos, e posteriormente pela formação da hifa esporógena, que irá originar os artroconídios. A produção de clamidosporos começa a ocorrer após duas semanas de cultivo, quando são observados dilatações em algumas

hifas na região interseptal. O autor também observou que o processo de formação dos propágulos é assincrônico..

Na esporogênese de muitos fungos filamentosos, clamidosporos são produzidos sob condições de estresse por insuficiência de nutrientes ou por ação de outros elementos estressantes. Porém em *P. brasiliensis* os clamidosporos também ocorrem cultivos frescos e com abundância de nutrientes, o crescimento ativo das hifas sugere que o micélio não necessita da exposição à condições adversas estressantes para que haja conidiogênese.

Em nossos estudos, *P. brasiliensis* produziu clamidosporos tanto em meios ricos como em meios deficientes em nutrientes, não havendo uma correspondência direta aparente com fatores nutricionais. Como observado na Tabela 4.5, os meios onde a produção de clamidosporos foi observada foram em ordem crescente de produção: Batata, Sabouraud, YPD 0,5% D, YPD 10% D, SC, WO, EG, YPE e KAc. Nos demais meios não foi observada a produção de conídios. No meio YPE não foram observados conídios no primeiro mês de cultivo, porém no segundo, eventuais clamidosporos intercalares foram encontrados.

Segundo Restrepo, (1970), a diversidade de esporos produzida por este microorganismo depende da composição do meio de cultivo, sendo os meios mais pobres em nutrientes mais comumente os produtores mais eficientes dos diversos tipos de conídios. Em *P. brasiliensis* os conídios são uma forma infecciosa de seu estágio saprofítico, são também considerados uma forma de resistência (clamidósporo), formada em resposta a condições de estresse (BUSTAMANTE *et al.*, 1985).

No cultivo de *P. brasiliensis* em ágar Sabouraud sem extrato de levedura observa-se clamidosporos intercalares (LACAZ, 1982). Experimentos realizados por Franco *et al*,

(1989) com o isolado Pb 18 demonstraram que em meios sólidos pobres em nutrientes, *P. brasiliensis* produz clamidosporos intercalares e terminais após 7 a 10 dias de cultivo, já em meios ricos em nutrientes não foi verificada a produção dos mesmos.

Examinando os clamidosporos estruturalmente, observa-se a presença de um ou mais núcleos e numerosas mitocôndrias. Acredita-se que tais características são encontradas no micronicho de *P. brasiliensis*, e que desempenhe um papel importante na propagação da paracoccidiodomicose (LACAZ, 1991).

Recentemente Miyaji *et al*, (2003), estudaram o papel dos clamidosporos na conversão micélio – levedura utilizando os isolados Pb 9, Pb 18 e Tatu em lâmino-cultivo com os meios Batata , BHIDA e Sabouraud. Os autores observaram que tanto os meios BHIDA como Sabouraud produziram clamidosporos, já no meio Batata foi observada a produção de aleurioconídios. Com base nos resultados deste trabalho, acredita-se que os clamidosporos exerçam um importante papel na transição da fase miceliana para a fase leveduriforme devido à capacidade dos clamidosporos formarem células em exoesporulação múltipla quando retirado da temperatura ambiente e incubado a 36°C.

#### 4.6 Dimorfismo incomum em *Paracoccidioides brasiliensis*

Durante o acompanhamento do desenvolvimento e morfologia da fase leveduriforme do fungo *P. brasiliensis* cultivado a 36°C foi observado um fenômeno interessante frente à expectativa usual. De acordo com a literatura, o dimorfismo de *P. brasiliensis* é estritamente ligado à temperatura, já em outros fungos dimórficos fatores como nutrientes e oxigenação participam do processo de transição (SAN BLAS ; SAN BLAS, 1982; SAN BLAS *et al*, 2002). O processo dimórfico pelo qual passa *P. brasiliensis* se reflete na função e fisiologia mitocondrial, a qual é amplamente modulada na transição dimórfica. (MEDOFF *et al*, 1987). Nossos experimentos demonstram que a temperatura não é o único fator de controle do processo dimórfico, pois principalmente nos meios de cultivo Batata e Wo as colônias leveduriformes transformaram-se gradualmente em colônias micelianas mesmo quando cultivadas a 36°C. No entanto, este fato não se repete nos demais meios de cultivo estudados, o que sugere interferência nutricional neste fenômeno. Outro aspecto interessante é que, este fenômeno não foi observado em meios líquidos com a mesma constituição de nutrientes e sob a mesma temperatura, sugerindo que o cultivo submerso, inibe a reversão, eventualmente por diluição de alguma substância sinalizadora. A avaliação da transição dimórfica incomum de *P. brasiliensis* a 36°C foi também feita em outros isolados (470, Peru, 608, AP, Arg, 9673, 339, 1017, MG4, MG5, 1925, SS), os quais demonstraram o mesmo comportamento, porém com cinética distinta, excluindo a possibilidade de esta ser uma característica exclusiva do isolado Pb 18.

O processo dimórfico incomum no isolado Pb 18 foi observado por nós inicialmente em culturas em meio ágar- WO com 20 a 25 dias de cultivo a 36°C, as quais apresentaram aspecto miceliano com hifas aéreas, ou seja, coloração branca. A análise micromorfológica destes cultivos revelaram em meio a muitas células mortas, hifas delgadas e hialinas porém, com ausência de conídios. Simultaneamente à essa análise, observou-se que o mesmo ocorria com as culturas em meio ágar –Batata aproximadamente no mesmo período, no qual as colônias reverterem completamente para a fase miceliana em menos de 25 dias. Este fenômeno também foi observado em meio ágar –YPD, no entanto, neste o processo foi observado unicamente quando o meio de cultura encontrava-se extremamente ressecado.

A micromorfologia, tanto de culturas a 36 °C em YPD como em Batata, também revela hifas sem conídios em meio a muitas células mortas.

Diversas colônias foram analisadas diariamente desde o primeiro dia de cultivo (24h), onde, aquelas desenvolvidas em ágar-Batata se tornam rijas, perdendo gradualmente a consistência cremosa por volta de 7 a 10 dias, a partir do inoculo. Hifas aéreas começam a ser observadas a partir do 10º dia, porém, eventualmente estas são observadas por volta do 7º ou 8º dia de cultivo. Quando a colônia atinge aproximadamente o 20º dia de cultivo a reversão está praticamente completa.

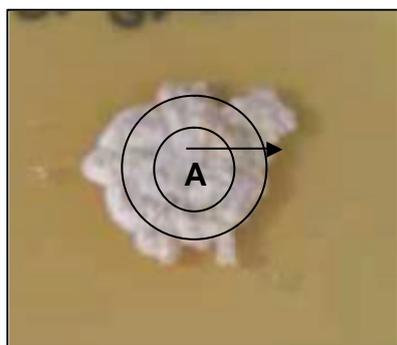
O cultivo em meio ágar- WO revela as mesmas características, porém o processo de transformação inicia-se entre o 4º e o 5º dia de cultivo, com desenvolvimento mais rápido, e por volta do 15º dia, as colônias apresentam-se transformadas em micélio.

Foi observado também que, algumas colônias desenvolvidas em ágar –YPD, quando ultrapassam 30 dias de cultivo apresentam desenvolvimento de micélio aéreo, perdendo o aspecto cremoso e cerebriforme.

Os demais cultivos não exibiram este fenômeno, nestes as células morrem e não se transformam. No entanto, no meio Kac observou-se o início da formação de eventuais hifas, porém as células morrem antes de realizar a reversão.

Com base nos resultados observados, acreditamos que essa reversão à morfologia micelial possivelmente deve-se a um efeito combinado de estresse hídrico (devido ao ressecamento das placas) associado a metabólitos ou componentes particulares do meio. É possível que a morfologia de micélio esteja associada a uma resistência maior às condições adversas.

Coletando-se amostras em regiões diferentes de várias colônias em vias de sofrer a conversão para micélio, observou-se que a transformação, em geral, inicia-se no centro da colônia (fig.4.6), mantendo o sentido centrípeto, o que reforça a idéia de que um dos fatores que desencadeiam esta modificação deriva do estresse nutricional e hídrico, pois o centro da colônia é o local onde os nutrientes e a água são reduzidos mais rapidamente.

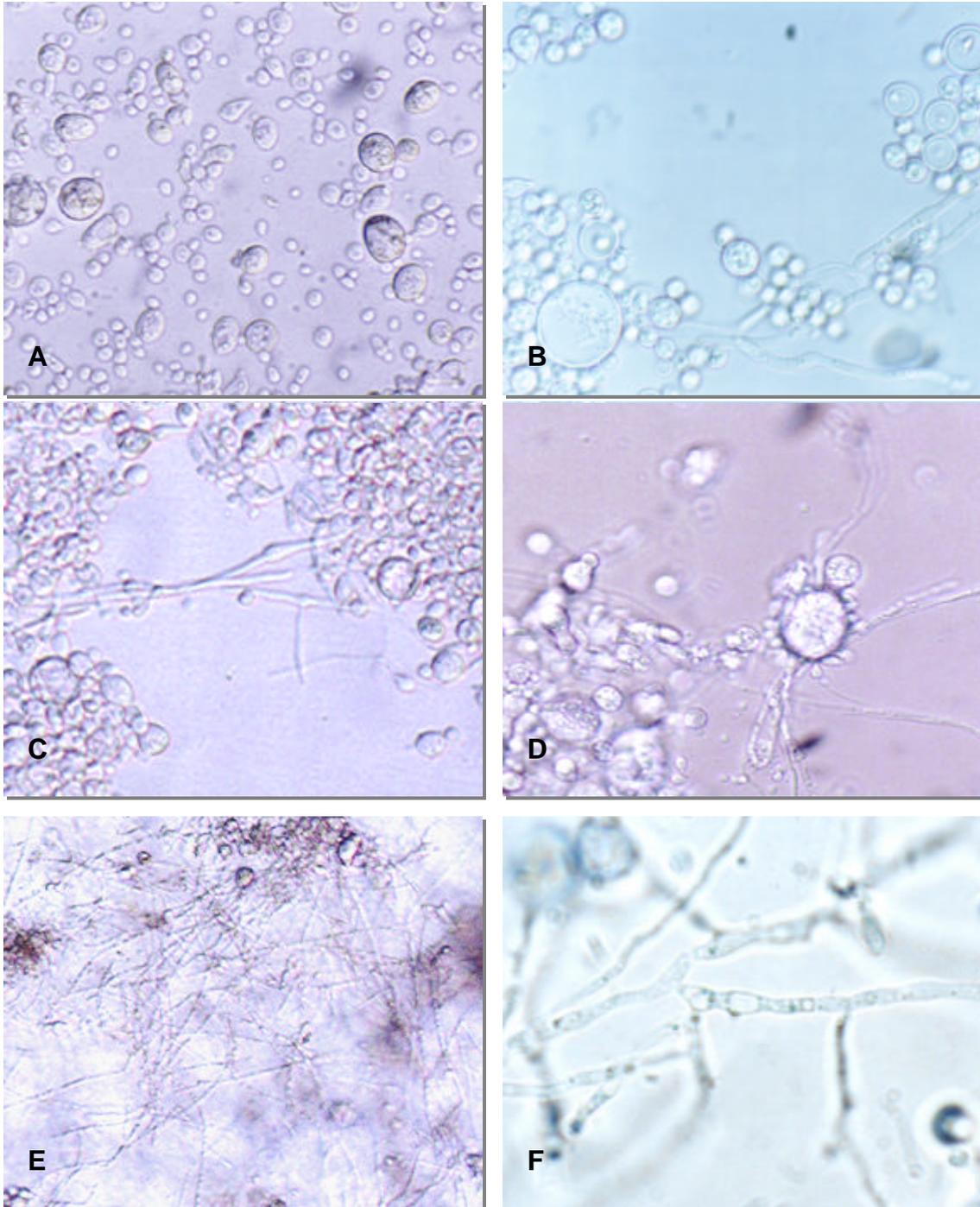


**Fig.4.6-** Colônia de *P. brasiliensis* originada por reversão a 36°C em meio de cultura ágar- Batata (20 dias). **A-** região onde geralmente inicia-se a transição para micélio, a seta indica o sentido da transformação.

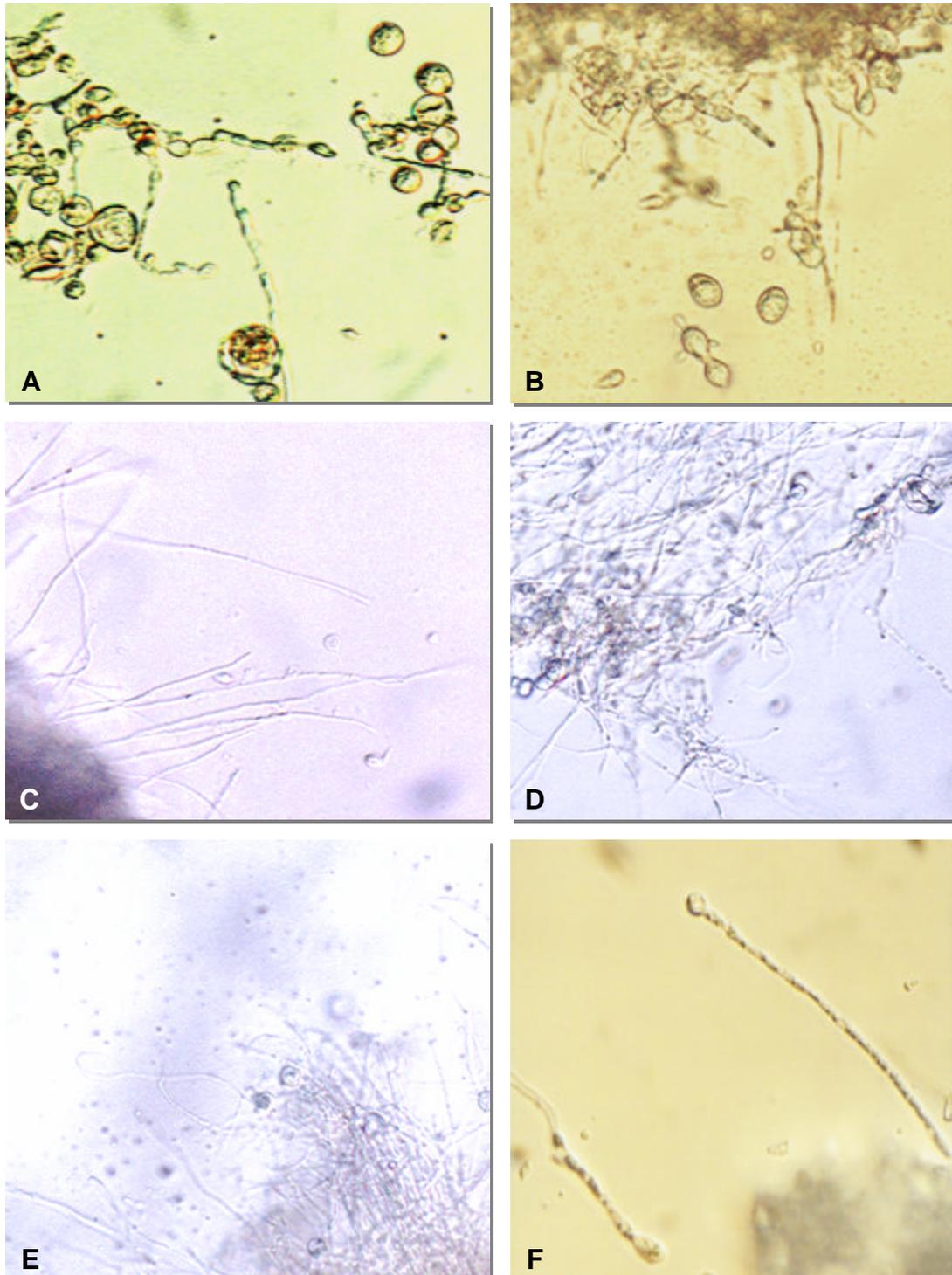
A alteração morfológica ocorrida durante o processo dimórfico está relacionada principalmente com modificações na parede celular do fungo, o que caracteriza o micélio rijo e resistente. Os estudos realizados sobre o dimorfismo em *P. brasiliensis* e a importância da temperatura como único fator responsável na indução deste processo, sugere que os mecanismos bioquímicos responsáveis pela transição dimórfica são simples, e podem estar ligados à síntese alternada de  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanas, polissacarídeos da parede celular deste fungo. O sistema da glucana sintetase é de atividade lenta, podendo atuar simultaneamente durante a transição de uma fase a outra, o que justifica a morfologia intermediária desta fase de transição, com características leveduriformes e filamentosas (SAN-BLAS, 1979).

Alguns autores relataram o comportamento dimórfico incomum observado nestes resultados, Cano e Aguiar, (1991), estudando a utilização de aminoácidos e sua influência no crescimento de *P. brasiliensis*, descreveram dois isolados, Bt3 e 262, que cresceram com aspecto miceliano em meio mínimo (Bacto Yeast Nitrogen Base w/o acid- Difco- 1%, Glicose anidra- Merck- 1%, ágar-1,8%) à temperatura de 37°C, já outros isolados estudados como Btl, Bt2, SN, 113, 666, 665, Arg, Cob30, 891, 1925, IHM 1962 e 728 desenvolvem-se como levedura no mesmo meio. De acordo com estes autores, a presença de aminoácidos e bases no meio de cultura podem ser responsáveis pela manutenção da fase leveduriforme do fungo. Outros autores como Villar *et al*,(1988) e Restrepo *et al*, (1969), descreveram outros fatores com exceção da temperatura, que afetam a morfologia de *P. brasiliensis*. Gillard e Laffer (1962), observaram que as amostras de *P. brasiliensis* cultivadas em meio mínimo a 37°C, na presença do aminoácido tirosina, mantinham a fase miceliana mesmo após alguns subcultivos.

As figuras a seguir referem-se ao acompanhamento da transição dimórfica observada em alguns meios de cultura.



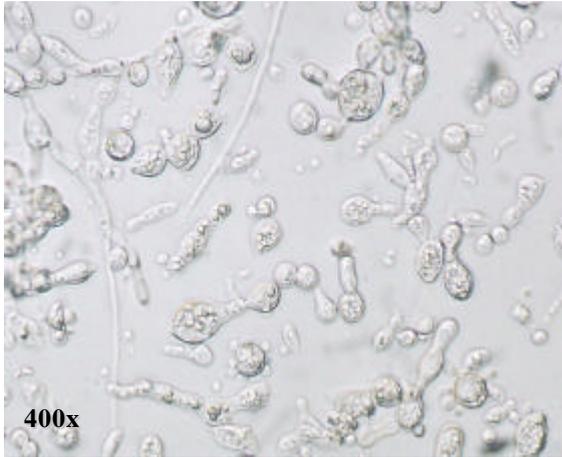
**Fig. 4.7.** Acompanhamento da reversão em ágar batata. A a F : 3; 5; 7; 15; 20 e 30 dias respectivamente.



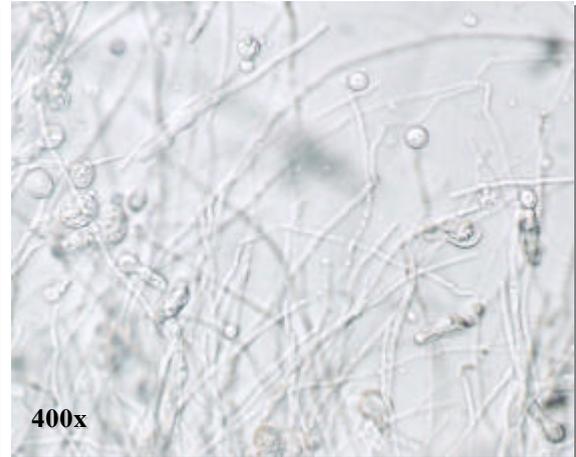
**Fig. 4.8.** Acompanhamento da reversão em ágar- WO. A a F : 3, 5, 7, 15 , 20 e 30 dias respectivamente.

Posteriormente, outros meios de cultura foram testados a fim de verificar uma possível alteração na morfologia do isolado. Os meios selecionados foram YPM, YPS e YPGal (ver material e métodos) revelaram que o metabolismo desses açúcares aparentemente altera a morfologia/fisiologia deste microorganismo, sendo capaz de induzir, na fase leveduriforme, a reversão para a fase filamentosa. O processo foi observado já nos primeiros 3 dias de cultivo. No entanto, quando o fungo é cultivado nesses meios na forma líquida, este dimorfismo incomum não ocorre, talvez pela presença de água, ausência de ágar ou diluição de algum composto indutor do processo. O desenvolvimento do fungo nos meios YPM e YPS sólido é mínimo, a colônia não sobrevive 2 semanas. Já em YPGal, há a completa reversão para a fase miceliana, e a colônia cresce como em YPD, porém, na forma filamentosa (a 36°C).

As figuras a seguir referem-se aos cultivos mencionados (5 dias a 36°C).



**Fig. 4.9-** *P. brasiliensis* cultivado em meio YPS sólido.



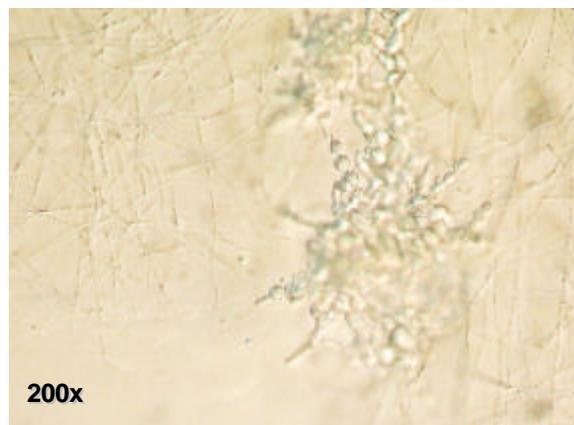
**Fig. 4.9-** *P. brasiliensis* cultivado em meio YPM sólido.



**Fig. 4.10-** *P. brasiliensis* cultivado em meio YPS líquido.



**Fig. 4.11-** *P. brasiliensis* cultivado em meio YPM líquido.



**Fig. 4.12-** Cultivo de *P. brasiliensis* em meio YPGal

O cultivo em YPS sólido (Fig. 4.9) revelou muitas células mortas nos primeiros dias de cultivo, no entanto, poucas dessas células apresentaram traços de reversão. Já no meio sólido YPM (fig.4.10), percebemos que de alguma forma, o Manitol induz a transformação para a fase filamentosa, onde observa-se o grande número de pseudo hifas e hifas delgadas partindo de células leveduriformes.

Como descrito anteriormente, a reversão de *P. brasiliensis* da fase leveduriforme para a fase filamentosa, quando cultivado nos meios sólidos Batata e Wo, é nítida. Sobretudo, quando cultivado nesses mesmos meios de cultura na forma líquida, não se observa o comportamento dimórfico, sugerindo que a presença de água nos meios líquidos ou a presença do ágar nos meios sólidos, influencia de alguma maneira a transição para a fase filamentosa. Pudemos também concluir que outros meios de cultura, além de Batata e Wo, induzem em *P. brasiliensis* este comportamento, os quais são ágar-YPM (Fig.4.12), neste em especial, observa-se um grande número de hifas muito compatíveis com aquelas desenvolvidas à temperatura ambiente, porém, com ausência de conídios. Quando este fungo é cultivado nos mesmos meios líquidos, não se observa o comportamento dimórfico, no qual as células apresentam morfologia leveduriforme.

#### **4.7 Obtenção de Clones de *Paracoccidioides brasiliensis***

De acordo com San-Blas e Castañeda, (1990), o caráter multinucleado das células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis*, sua capacidade de exoesporulação múltipla e a tendência a permanecerem agrupadas em sua fase leveduriforme, dificultam o processo de clonagem. Segundo esses autores, a

necessidade de fatores de crescimento entre outros nutrientes em meios de cultivo, poderia ser um requisito para o desenvolvimento de células isoladas em colônias, pois, quando isoladas as células não sobrevivem. Castañeda *et al* (1988), descreveram um meio de cultivo contendo um filtrado prévio de cultura leveduriforme, a qual contém substâncias denominadas sideróforos, que parecem estar envolvidas na potencialização da viabilidade de células leveduriformes, pois se unem ao ferro facilitando seu transporte para o interior celular. Outros fatores também poderiam fazer esse papel potencializador da multiplicação celular.

Para a tentativa de clonagem do isolado Pb 18, utilizou-se os meios sólidos condicionado denominado por nós de “Spent-YPD” 50%, “Spent-YPD” 75%, “Spent-BHI” 50% (descritos em material e métodos), Batata, KAc e YPD, nos quais foram inoculadas células leveduriformes oriundas de cultivos de 5 dias nos meios ágar-Batata e ágar- KAc (que propiciam a obtenção de células menos agrupadas e esféricas e/ou em exoesporulação múltipla). A manipulação das células individuais foi realizada em um microscópio de micromanipulação como descrito em material e métodos.

Foram utilizadas duas metodologias diferentes para a obtenção de clones. A primeira baseia-se na micromanipulação de células isoladas, sendo estas inoculadas em um meio de cultura apropriado (condicionado)

Para as tentativas de clonagem, foram escolhidas células com diferentes padrões morfológicos: células isoladas esféricas, pseudo hifas catenuladas e células em exoesporulação múltipla.

Após o isolamento, as células são mantidas em estufa a 36°C, e o eventual desenvolvimento é acompanhado diariamente, por observação ao microscópio.

Foi observado que as células que desenvolveram clones foram inoculadas nos meios de cultura “Spent-YPD” 75%, nas primeiras 24 horas, período em que foi possível observar a projeção de pequenas hifas, e, não “buds” ou blastoconídios como esperado. As células que não se desenvolveram não manifestaram nenhuma mudança morfológica durante o período.

Por volta de 7 dias de cultivo, as pequenas colônias já podem ser vistas a olho nu, neste período também iniciamos uma suplementação diária com 20µL de filtrado puro do meio condicionado, visando a viabilização dos clones, já que sabe-se que estes são extremamente sensíveis.

Quando as colônias apresentaram aproximadamente 1mm de diâmetro, são retiradas da placa e transferidas para uma placa contendo também meio condicionado. Esse procedimento foi realizado para todos os clones obtidos.

Após o desenvolvimento das colônias, foram avaliadas várias características: dimorfismo, morfologia e fisiologia em diferentes meios.

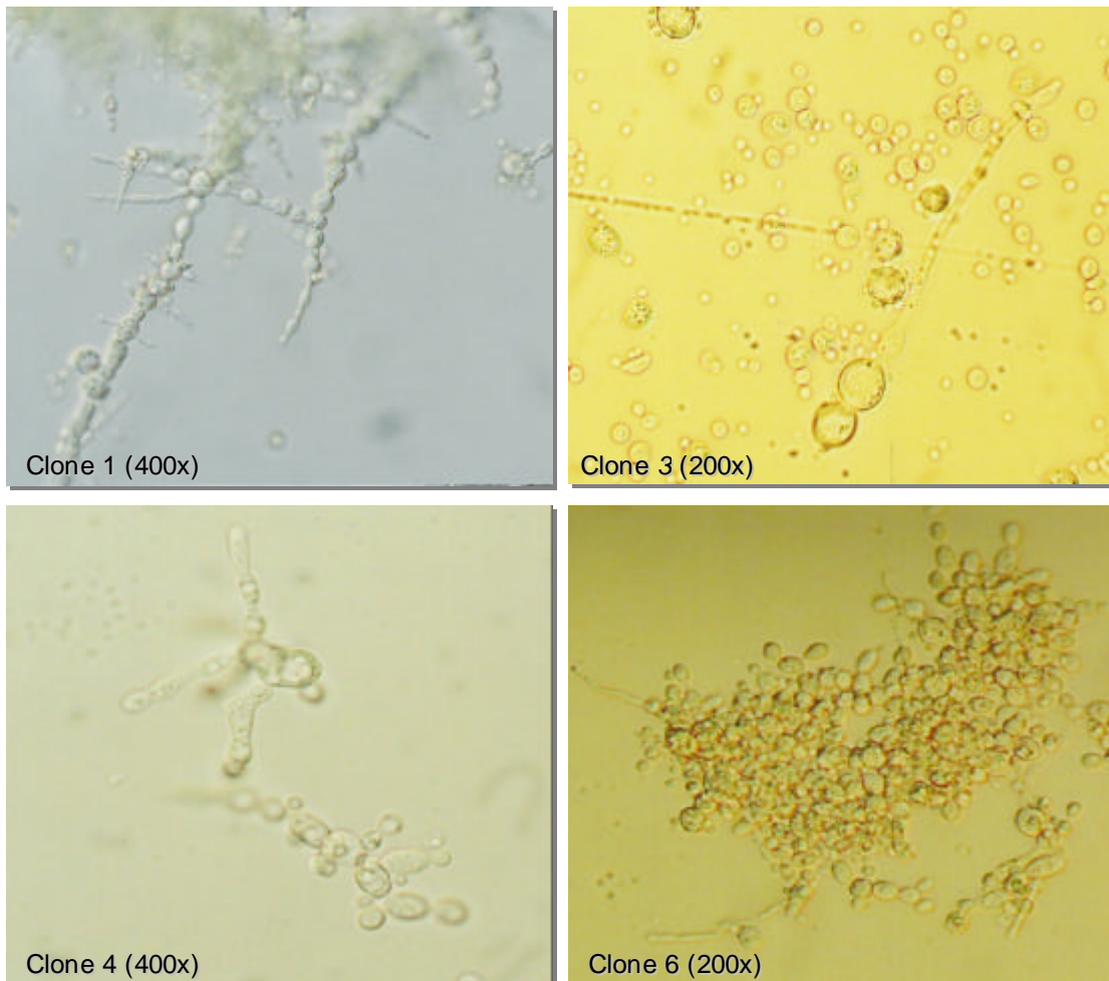
Quando cultivados a temperatura ambiente, os clones desenvolvem-se normalmente em micélio, apresentando as mesmas características morfológicas que o isolado comum, inclusive na produção de clamidoconídios.

A diversidade morfofisiológica dos clones nos diferentes meios de cultivo foi praticamente a mesma apresentada pelo isolado Pb 18.

A morfologia de cada clone foi analisada através do cultivo líquido em meio Spent 75%, as metodologias empregadas na análise morfológica foram as mesmas utilizadas para a análise do isolado Pb18 nos diferentes meios de cultivo.

Observou-se que alguns clones apresentam características morfológicas peculiares quando comparados entre si, e com o isolado original PB 18, as quais

não mostraram variação até o momento. A Figura 4.13 exemplifica a variedade morfológica entre alguns clones, descrita na Tabela 4.6.



**Fig. 4.13-** Variação micromorfológica de alguns clones obtidos de *P. brasiliensis* (isolado Pb 18) em sua fase leveduriforme cultivados por 5 dias em meio condicionado YPD líquido.)

**Tabela 4.6** Variabilidade morfológica observada em alguns clones do isolado Pb18 em sua fase leveduriforme.

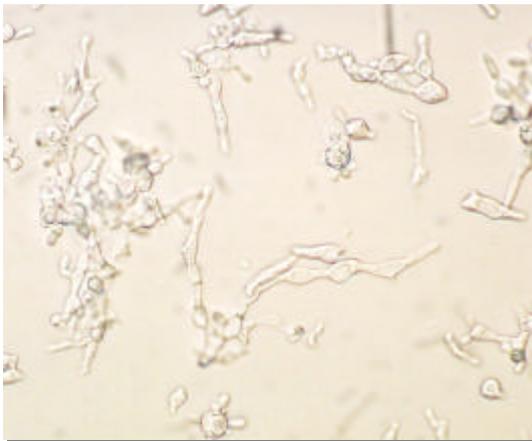
<b>Clone</b>	<b>Célula de origem</b>	<b>Características</b>
<b>Clone 1</b>	Uma célula esférica.	Apresentam grandes cadeias de pseudohifas catenuladas com multibrotamentos, caracterizando um pseudomicélio, o que torna a colônia levemente rija.
<b>Clone 4</b>	Célula com um brotamento.	Observa-se principalmente pseudohifas catenuladas em cadeias de 3 a 5 elementos. As células não apresentam alto índice de agrupamento. A colônia apresenta uma textura cremosa e de alta dispersão celular.
<b>Clone 6</b>	Célula em exoesporulação múltipla.	Células altamente agrupadas em sua maioria sendo formadas por pseudohifas de pequenas cadeias de células.
<b>Clone 3</b>	Uma célula esférica.	Formado principalmente por células não agrupadas. Observa-se a formação constante exoesporulação múltipla, dando à colônia a consistência cremosa.

Visando a manutenção das características individuais de cada clone, os mesmos foram submetidos ao armazenamento em tubos plásticos de 1mL contendo meio de cultura YPD líquido acrescidos de 10% de glicerol e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , no entanto ainda não foi possível desenvolver uma metodologia que garanta de maneira consistente a recuperação das células, pois neste processo muitas morrem.

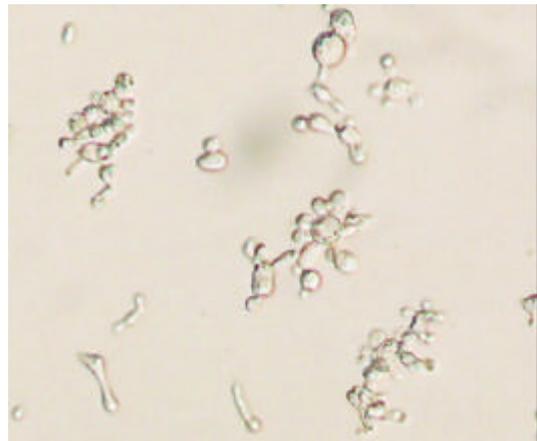
No total foram obtidos 25 clones do isolado Pb 18. Também foram realizadas algumas tentativas de clonagem de outros isolados, obtendo sucesso apenas com o Pb 339 (Fig.4.14) e AP (Fig.4.15).

Vários trabalhos têm sido realizados no sentido de diferenciar genotipicamente os diversos isolados de *P. brasiliensis*, utilizando técnicas moleculares como RFLP e RAPD. Feitosa *et al*, (2003) realizaram a análise de polimorfismos cromossômicos entre 12 isolados de *P. brasiliensis*, descrevendo a alta variabilidade existente entre eles. Um dos isolados utilizados neste estudo foi o isolado SS (Fig.4.16), o qual nos chamou a atenção por sua morfologia (células

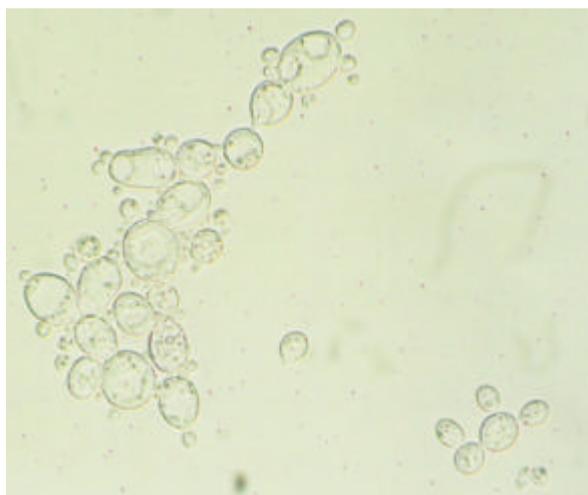
esféricas e pouco agrupadas) e provável haploidia, de acordo com o trabalho mencionado anteriormente). A partir dessas informações, tentamos obter clones do isolado SS, pois seria interessante obter clones de um isolado teoricamente haplóide, o que facilitaria análise do estudo do genoma deste organismo. No entanto, SS demonstrou grande fragilidade, não permitindo a obtenção de clones. Também não foi possível a obtenção de clones do isolado 608, porém acreditamos que isso tenha ocorrido devido à baixa viabilidade celular do mesmo, pois quando o mesmo foi submetido ao teste de viabilidade com o corante específico Trypan-blue, muitas células apresentaram-se azuis.



**Fig. 4.14-** Isolado Pb 339 em sua fase leveduriforme.



**Fig. 4.15-** Isolado Pb AP em sua fase leveduriforme.



**Fig. 4.16-** Isolado Pb SS em sua fase leveduriforme.

**Tabela 4.7** Relação de clones de alguns isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* obtidos via micromanipulação e ultra-som.

<b>Isolado</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>Método</b>	<b>Nº de clones obtidos</b>
<b>Pb 18</b>	"Spent" 75% - YPD	Micromanipulação	09
<b>Pb 18</b>	"Spent"- BHI	Micromanipulação	06
<b>Pb 18</b>	"Spent" 75% - YPD e "Spent"- BHI	Ultra som	11
<b>339</b>	"Spent"- BHI	Ultra som	06
<b>SS</b>	"Spent"- BHI e "Spent"75%- YPD	Micromanipulação	-
<b>SS</b>	"Spent"- BHI e "Spent"75%- YPD	Ultra som	-
<b>AP</b>	"Spent"- BHI	Ultra som	4
<b>608</b>	"Spent"- BHI	Ultra som	-

A variabilidade morfológica e fisiológica entre os isolados de *P. brasiliensis* é nítida, onde distinguem-se principalmente tamanho e formas celulares diferentes, e colônias de aparência e consistência variadas.

Em 1995, Soares *et al.*, realizaram através da técnica RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) o estudo do DNA de 7 isolados deste fungo. Neste trabalho foram identificadas várias diferenças significativas entre os isolados analisados, o que resultou na formação de dois grupos distintos. Tanto esta técnica como a de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) foram e são amplamente utilizadas por vários autores na caracterização de isolados de diversos microorganismos. Nino-Vega *et al.*, 2000, através de RFLP, correlacionaram geograficamente isolados de *P. brasiliensis* analisados por esta técnica.

Em busca de polimorfismos cromossômicos entre os isolados, Montoya *et al.*, 1997, compararam o material genético de 8 isolados clínicos do fungo, localizando 5 bandas cromossômicas utilizando a técnica “PFGE” (pulse-field gel electrophoresis). No entanto, encontraram polimorfismo cromossômico apenas em outro trabalho, em 1999 (MONTROYA *et al.*, 1999). Feitosa *et al.*, 2003, também utilizando a técnica PFGE, analisaram 12 isolados e, identificaram polimorfismo no número de bandas cromossômicas bem como em sua migração no gel. Neste estudo, alguns isolados apresentaram características peculiares quanto aos números de cromossomos e ploidia.

A manifestação de características morfológicas distintas observadas entre alguns clones de obtidos sugere que um isolado pode ser um conjunto de células não necessariamente iguais, ou melhor, um isolado pode ser geneticamente heterogêneo – ser proveniente de uma cultura policlonal. Partindo destas

observações, realizamos a análise molecular de algumas regiões do DNA de 2 clones obtidos, juntamente do isolado de origem Pb18, procurando eventuais indicações da existência de heterogeneidade clonal.

#### 4.8 Análise Molecular dos Clones de Pb 18

Como descrito em material e métodos, realizamos a extração do DNA total e mitocondrial dos clones de Pb18, 4 e 6 (fig. 4.14), com a finalidade de submeter este material ao seqüenciamento de algumas regiões específicas, procurando identificar eventuais alterações genéticas que justificassem alterações morfológicas entre os clones de Pb. Selecionamos duas regiões do genoma mitocondrial, sendo a primeira referente à região intergênica entre COX 1 e ATP9, de 875pb, e a segunda referente à região codificadora de COX 2, subunidade 2 da citocromo oxidase pertencente ao complexo terminal da cadeia respiratória, de 698pb. Ambas as regiões do DNA mitocondrial foram caracterizadas por Cardoso, (2004).

A região escolhida referente ao DNA nuclear, corresponde ao gene da proteína GP43, de 1329pb, é responsável pela codificação da glicoproteína de 43 KDaltons (gp43), a qual é o principal antígeno utilizado para imunodiagnóstico da infecção por *P. brasiliensis*, sendo capaz de desencadear uma resposta imune celular protetora nas células parasitadas pelo fungo. Foi descrita primeiramente por Puccia *et al.*, (1986), quando a glicoproteína foi obtida através do isolamento e purificação do sobrenadante de culturas do isolado B-339. A partir de então, inúmeros estudos sobre este antígeno majoritário iniciaram-se e se estendem até hoje, um exemplo é o estudo de polimorfismos de sua região codificante em isolados diferentes (MORAIS *et al.*, 2000), sua produção variável por culturas clonais (BERZAGHI *et al.*, 2005), bem como a tentativa de desenvolvimento de vacinas a partir da mesma. A primeira tentativa de clonagem do gene que codifica a gp43 foi realizada por Taba *et al.*, (1989), onde os autores obtiveram a expressão em *E. coli* de um fragmento de

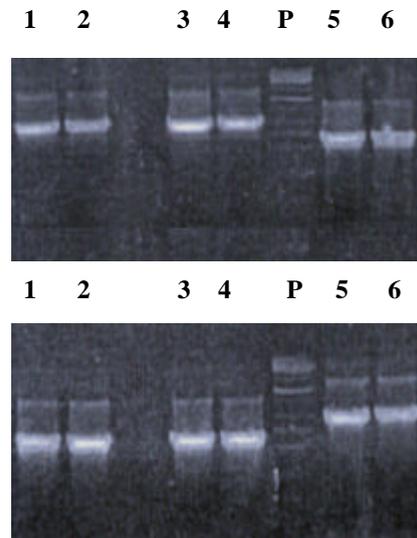
cDNA do fungo que expressava uma proteína reconhecida por soros de pacientes com PCM e cujos anticorpos reconheciam a gp43 purificada. No entanto, sua caracterização e seqüenciamento foi realizada apenas por Cisalpino *et al.*, (1996), a partir de DNA genômico e cDNA do isolado B-339. O PbGP43 foi o primeiro gene de *P. brasiliensis* a ser seqüenciado. Esta molécula é uma glicoproteína composta por 416 aminoácidos, onde os primeiros resíduos compõem o peptídeo líder, sua seqüência pode ser dividida em duas regiões: uma de baixa e outra de alta homologia com exoglucanases fúngicas, o que indica a presença de domínios funcionais (CISALPINO *et al.*, 1996).

Após a escolha das regiões, realizou-se a amplificação das mesmas utilizando a reação de PCR (reação em cadeia de polimerase), como descrito em Material e Métodos. Os fragmentos referentes às regiões selecionadas (Figs. 4.17, 4.18) foram extraídos do gel com o auxílio do kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega e em seguida clonados em vetor TOPO pCR<sup>®</sup> 4- TOPO.

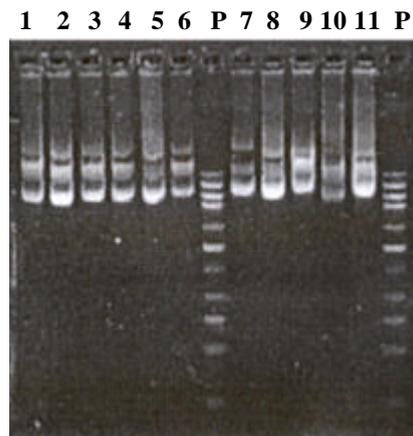
Após a ligação do inserto no vetor, a mistura de ligação foi introduzida na linhagem de *E.coli* DH10B, e posteriormente foi feita a extração do DNA plasmidial de alguns clones bacterianos obtidos pelo método de minipreparação, também descrito em material e métodos. As Figuras 4.19 e 4.20 ilustram o padrão nos géis de amostras contendo o material das minipreparações com o vetor juntamente com o inserto.



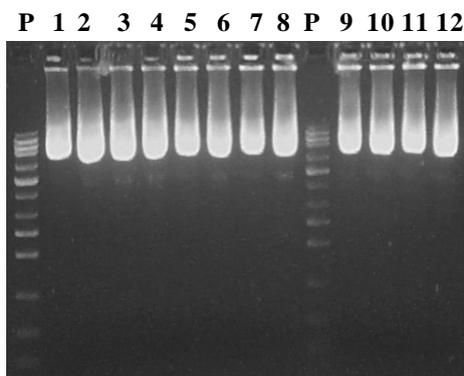
**Fig. 4.17-** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo ampliações da região do DNA mitocondrial COX2 de 698pb. **P-** Padrão de tamanho molecular; **1-** clone 4; **2-** clone 6; **3-** Pb 18- controle. Padrão de peso molecular, em Kb: 15; 7,96; 5,64; 4,40; 2,83; 2,1; 1,5; 1,2; 0,96; 0,74; 0,45; 0,28.



**Fig. 4.18-** Gel de agarose 1% contendo ampliações do gene GP43 de 1326pb e da região intergênica mitocondrial de 875 pb. *Foto superior:* **1e2-** GP43, clone 4; **3e4-** GP43, clone 6; **P-** padrão; **5-6** Intergênica Pb 18. *Foto inferior:* **1e2-** Intergênica, clone 4; **3e4-** Intergênica, clone 6; **P-** padrão; **5e6-** GP43, Pb18. Padrão de peso molecular, em Kb: 15; 7,96; 5,64; 4,40; 2,83; 2,1; 1,5; 1,2; 0,96; 0,74; 0,45; 0,28.



**Fig. 4.19-** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, contendo material de amostras referentes à uma das minipreparações de DNA plasmidial realizadas e descritas em material e métodos. **1,2 e 3-** vetor contendo o inserto da **região intergênica** (*clone 4*); **4,5 e 6-** vetor contendo o inserto da região intergênica (*clone 6*); **P-** padrão de tamanho molecular; **7,8 e 9-** vetor contendo o inserto da região **GP43** (*clone 4*); **10 e 11-** vetor contendo o inserto da região GP43 (*clone 6*), **P-** padrão de tamanho molecular. Padrão de peso molecular, em Kb: 15; 7,96; 5,64; 4,40; 2,83; 2,1; 1,5; 1,2; 0,96; 0,74; 0,45; 0,28. ; tamanho do vetor e insertos em Kb: vetor- 3,95; GP43- 1,329; região intergênica- 8,75.



**Fig. 4.20-** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, contendo o vetor recombinante ligado ao inserto **COX2**. **P** – Padrão de tamanho molecular; **1,2, 3 e 4** vetor contendo o inserto COX2 (*clone 4*); **5,6,7 e 8**- vetor contendo o inserto COX2 (*clone 6*); **9,10,11 e 12**- vetor contendo o inserto COX2 (*Pb 18- controle*). Padrão de peso molecular, em Kb: 15; 7,96; 5,64; 4,40; 2,83; 2,1; 1,5; 1,2; 0,96; 0,74; 0,45; 0,28; tamanho do vetor 3,95 Kb; tamanho do inserto (COX2) 0,698 Kb.

Para cada região, foram selecionados 2 clones bacterianos oriundos de cada clone de *Pb*. De cada clone bacteriano, extraiu-se o inserto contendo a região de interesse, realizando-se em seguida, 3 reações de seqüenciamento (senso e anti-senso), o que totalizou 12 seqüências de cada clone do isolado. O total de bases seqüenciadas por região foi: 653 pb da *COX2*; 932 pb da região intergênica e 1028 pb da *PbGP43*.

Após a obtenção das seqüências, estas foram editadas utilizando o pacote de programas Phred/Crossmatch. As seqüências com índice de qualidade Phred maior ou igual a 25 pontos, foram selecionadas para os alinhamentos múltiplos, para os quais, utilizamos os programas DNASTar/Seq Man/Edit Seq. No total, foram analisadas 18 seqüências da região *COX 2*, 21 seqüência da região intergênica e 21 seqüências da região *PbGP43*.

As seqüências obtidas foram alinhadas com a seqüência original do isolado Pb 18. A análise desses alinhamentos não revelou diferenças entre os dois clones de Pb18 e o isolado original Pb18.

Berzaghi *et al.*,(2005), obtiveram clones de *P. brasiliensis* utilizando a mesma metodologia aplicada neste trabalho. Comparou, a secreção do exoantígeno de GP43 entre os diversos clones que obteve. Concluíram que as culturas clonais (monoclonais) apresentam o mesmo comportamento das culturas policlonais, ou seja, produzem o antígeno em diferentes quantidades perdendo esta capacidade de acordo com o número de subculturas. Utilizando RAPD, realizaram a busca de eventuais polimorfismos entre os clones obtidos, inclusive entre os clones que não secretavam a GP43, não encontraram diferenças nas seqüências.

Esses resultados mostraram-se insuficientes para esclarecer a razão de alguns clones de Pb18 serem morfológicamente distintos, apesar de obtidos do mesmo isolado. É possível que existam alterações em algum gene ligado à morfogênese ou, alternativamente, haveriam alterações epigenéticas que ocorreriam espontâneamente e responderiam pelas distinções morfológicas observadas.

Para dar continuidade à análise do motivo da variação morfológica entre os clones de um mesmo isolado, outras regiões (genoma mitocondrial e nuclear) poderiam ser escolhidas e analisadas, principalmente aquelas que se encontram relacionadas à morfologia deste organismo.

## 5. CONCLUSÕES

5.1 Verificou-se notável variedade morfofisiológica macro e microscópica entre os diversos cultivos de *P. brasiliensis* em sua fase filamentosa e leveduriforme, em função da diversidade nutricional presente nos diferentes meios testados.

5.2 Os meios mais propícios para a obtenção de células de morfologia ideal à micromanipulação (isoladas ou em exoesporulação múltipla) foram BHI, KAc e Batata, tanto líquidos como sólidos.

5.3 A temperatura não é o único fator relacionado à morfologia de *P. brasiliensis*, pois o mesmo apresenta dimorfismo incomum quando cultivado nos meios ágar-Batata, ágar- Wo e ágar-YPM, nos quais observou-se reversão total ou parcial da fase leveduriforme para a filamentosa à 36°C. Este dimorfismo pode estar relacionado a metabólitos ou componentes particulares presentes nos meios de cultura utilizados, tendo como fator adjuvante o estresse hídrico provocado pelo ressecamento das placas armazenadas à 36°C. É possível que a morfologia de micélio neste caso, esteja associada a uma resistência maior à condições adversas.

5.4 Meios de cultura contendo filtrado prévio de um cultivo anterior de *P. brasiliensis* possibilitam a obtenção de clones deste fungo, em sua fase leveduriforme, a partir de células isoladas.

5.5 O ultra-som mostrou-se mais eficaz na obtenção de clones que a micromanipulação, o que possibilitou a obtenção de um número maior de clones.

5.6 Alguns clones do mesmo isolado de *P. brasiliensis* obtidos apresentaram variações morfológicas notáveis, mesmo após cultivos subseqüentes.

5.7 Não foram identificadas diferenças nas regiões do DNA analisadas (nuDNA: PbGP43; mDNA: COX2 e intergênica), impossibilitando-nos de gerar conclusões a respeito da variabilidade morfológica observada entre os clones estudados.

## Referências

- AJELLO, L. Medically important infectious fungi. **Contr. Microbiol. Immunol.**, v.3, p.7-19, 1977.
- ALLISON, M.J., GERSTZEN, E., SHADOMY, H.J., MUNIZAGA, J., GONZALES, M. GONZALES, M. Paracoccidioidomycosis in a Northern Chilean mummy. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, v.55, p.670-683, 1979.
- ANGULO- ORTEGA, A. Calcification in paracoccidioidomycosis: are they morphological manifestations of subclinical infections? In: *Paracoccidioidomycosis Proceedings Pan American Symposium*, 1., Columbia: Pan American Health Organization, 1972. p. 123-133.
- ARISTIZABAL, B.H., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A., RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia to yeast Cells: in vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**, p.5587-5591, 1998.
- BÁRTHOLO, R.M., FLORIÃO, R.A., OLIVEIRA, L.P.A., MORAES, M.G.P. Um caso fácil: um diagnóstico rápido. **Bol. Pneum. Sanit.**, v. 8, 2000.
- BERZAGHI, R., DA SILVA, S.H.M., CAMARGO, Z.P. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. **J. Clin. Microb.**, v.43, n.1, p.491-493, 2005.
- BLOCH, M., QUINTANILLA, L., RIVERA, H. Las micosis sistemicas en El Salvador. **Rev. Inst. Invest. Med.**, v.4, p.23-46, 1975.
- BLOTTA, M.H., et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brasil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am J Trop Med Hyg.** v.61, p.390-394, 1999.
- BORBA, C.M., MEIRELLES, M.N.S.L., SILVA, A.M.M, OLIVEIRA, P.C. Ultrastructural differences observed in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase cells grown on solid and in liquid medium. **Mycoses** v.42, p. 281-283, 1999.
- BLOTTA, M.H., CAMARGO, C.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.** V31, p.67, 1993.
- BORELLI, D. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. **PAHO Sc. Publ.** v.254, p.59, 1972.

BRUMMER, E., CASTAÑEDA, E., RESTREPO, A., Paracoccidioidomycosis. An update, **Rev. Clin. Microbiol.**, v. 6, p. 89, 1993.

CANO, M.I.N., AGUIAR, M.S.M.V. Utilização de aminoácidos no estudo do crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis*. Influência sobre o dimorfismo. **Rev. Inst. Méd. trop.** São Paulo. v.33, n.4, p. 319-324, 1991.

CARBONELL, L.M ; GIL, F. Ultraestrutura del *Paracoccidioides brasiliensis* In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C.S., FIORILLO, A.M. **Paracoccidioidomicose: Blastomicose Sul- americana**. São Paulo: Sarvier- EDUSP, 1982. cap.3. p.29-32.

CARDOSO, M.A.G., **Seqüenciamento e análise do genoma mitocondrial de Paracoccidioides brasiliensis**. 2004. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2004.

CASTAÑEDA, E., BRUMMER., PERLMAN, A.M., McEWEN, J.G., STEVENS, D.A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency. And the effect of siderophores. **J. Med. Vet. Mycol.** v.26, p.351-358, 1988.

CARBONELL, L.M., RODRÍGUEZ, J. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. **J. Bact.**, v.90, p.504-510, 1965.

CARBONELL, L.M. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bact.**, v.100, p.1076-1082, 1969.

CIFERRI, R. & REDAELLI, P. Paracoccidioidaceae, n. fam. Istituit per l'agente del "granuloma paracoccidioides" (*Paracoccidioides brasiliensis*), **Bol. Inst. Sieroter.** Milan, v.15, p.97, 1936.

CISALPINO, P.S. ; TRAVASSOS, L.R. Aplicações da Biologia molecular à Micologia Médica. In: LACAZ, C.S. (Ed.) **Micologia Médica**. São Paulo:Ed. Sarvier- EDUSP. 2000. [in press].

CONTI-DIAZ, I.A., RILLA, F.D., Hipótesis sobre el nicho ecológico del *P. brasiliensis*. **Rev. Med. Urug.**, v.5, p.97, 1989.

DAY, D. *Thiamin content of agar*. **Bull. T. Bot. Club**. v.69, p. 11-20, 1942.

FAGUNDES, R.Q. **Pesquisa da paracoccidioidomicose em cães (*Canis familiaris*) na região endêmica de Botucatu, São Paulo.** Dissertação( Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu da Universidade Estadual Paulista-Unesp.2002

FEITOSA, L.S., **Polimorfismos cromossômicos do *Paracoccidioides brasiliensis* e mapeamento de genes com sondas homólogas.** Dissertação de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2000.

FONSECA, E.R.S., PARDAL, P.P.O., SEVERO, L.C., Paracoccidioidomicose em crianças em Belém do Pará. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.**v.32,p. 31-33, 1999.

FORJAZ, M.H.H. **Estudo da epidemiologia da paracoccidioidomicose. Rastreamento de áreas endêmicas e de “reservareas” no Brasil, através do traçado do perfil migratório residencial-profissional, de pacientes diagnosticados em São Paulo,** Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1989.

GILLARD, G.L ; LAFFER, N.C. Nutritional studies on the yeast phase of *Blastomyces dermatitis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bact.** 83, 219-227, 1962.

GREER, D.L., RESTREPO, E. La epidemiologia de la paracoccidioidomycosis. **Bol. Ofic. Sanit. Panamer.**, v.82, p.428- 443, 1977.

GUÉHO, E., LECLERC.M.C. HOOG, G.S., DUPONT, B. Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. **Mycoses**, v.40, p.69-81. 1997.

KERN, M.E., BLEVINS, K.S. **Medical Mycology: a self instructional text.** 2 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1997. 242p.

LACAZ, C.S. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história. In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C.S., FIORILLO, A.M. **Paracoccidioidomicose: Blastomicose Sul- americana.** São Paulo: Sarvier-EDUSP, 1982. cap.1. p.1-7.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap.1. p. 1-4.

LACAZ, C.S. **Micologia médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 6ed. São Paulo: Sarvier, 1977.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

LONDERO, A.T. Epidemiologia. In: Del Negro, G., Lacaz, C.S., Fiorillo, A.M. **Paracoccidioidomycose: Blastomycose Sul- americana**. São Paulo: Sarvier-EDUSP, 1982. cap. 7. p.88.

LAZERA, C.Z.S.D, et al. Mortalidade por paracoccidioidomycose. Brasil 1980-1995. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2., Rio de Janeiro, Brazil, April 17-21, 1998. São Paulo: Sociedade Brasileira de Micologia. 1998; Abstract A 57.

LILLY, V.G, BARNETT.H.L. **Physiology of the Fungi**. New York: McGraw-Hill, 1951.

LONDERO, A.T., RAMOS, C.D. Paracoccidioidomycose. Estudo clínico micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. **J. Pneumol.**, v.16,p.129,1990.

MARESCA. B, KOBAYASHI G.S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomycetes dermatitis*. In: ERNST J.F.; SCHIMIDT, A, (Ed). **Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts**. Contr. Microbiol. Basel: Karger, 2000. p.201-216 .cap.5

MARQUES, S.A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical and treatment update. **An bras Dermatol**, v.78, n.2, p.135-150, 2003.

MARTINS, R.M., MARQUES, J.L.O., GARCEZ. I.C.S., MELLO, C.F.C., BARBOSA, B.G., GUIMARÃES, W.D., SZNEIJDER, M.A. Paracoccidioidomycose. Relato de caso de criança de três anos de idade com forma disseminada. **J. Pediatr.**, v.61, p.319, 1986.

MCEWEN, J.G., GARCIA A.M., ORTIZ, B.L., BOTERO, S., RESTREPO, A. In Search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arq. of Med. Research-** v.26, p.305-306, 1995.

MEDOFF, G., PAINTER, A., KOBAYASHI, G. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. of Bacteriol.**, v.169, p.4055-4060, 1987.

MEZZARI, A., CAUDURO, P. **Micologia no Laboratório**. Porto Alegre: Sagra/DC Luzzato, 1996. 123p.

MIYAJI, M. SANO, A. SHARMIN, S. KAMEI, K. NISHIMURA, K. The Role of Chamydospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Jpn. J. Med. Mycol.** v.44, p.133-138, 2003.

MONTOYA, A.E, ALVAREZ, A.L., MORENO, M.N., RESTREPO, A & MC EWEN, J.G. Eletrophoretic karyotipe of enviromental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.** v.37, p.219-222, 1999.

MONTOYA, A.E., MORENO, M.N., RESTREPO, A., & MC EWEN. Electrophoretic Karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.** v.21, p.223-227, 1997.

MORAIS, F.V., **O gene PbGP43 que codifica o antígeno principal do *Paracoccidioides brasiliensis*: polimorfismo e transcrição**. Tese(Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, 2003.

NAIF, R.D, FERREIRA, L.C.L, BARRET, T.V. et al. Paracoccidioidomicose em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev Inst Med trop São Paulo.** v.28, n.1, p. 19-27, 1986.

NICOL, T., VERNON, R.B., QUANTOCH, D.C. The influence of various hormones on the reticuloendothelial system: endocrine control of body defense. **J. Endocr.** v.33, p.365-383, 1965.

NIÑHO-VEGA, G.A, CALCAGNO, A.M., SAN BLAS, F., GOODAY, G.N. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.** v.38, p.437-441, 2000.

ONO, M.A., BRACARENSE, A.P.F.R.L., MORAIS, H.A.S., TRAPP, S.M., BELITARDO, D.R. Canine paracoccidioidomycosis; a seroepidemiological study. **Med Mycol.** v.39, n.3, p.233-241, 2001.

RESTREPO, A., MCEWEN, J.G., CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol.** v.39, n.3, p.277-285, 2001.

RESTREPO, A. MONCADA, L.H., QUINTERO, M. Effect of the hydrogen ion concentration and of temperature on the growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil extracts. **Sabouraudia**, v.7, p.207-215, 1969.

RESTREPO, A. SALAZAR, M., CANO, L., PATIÑO, M.M. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.24, p.247-250, 1986.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.23, p.323-334, 1985.

RESTREPO, A., CANO, L.E. Recovery of fungi from seeded sputum samples. Effect of culture media and digestion procedures. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.23, 1981.

RESTREPO, B.I., MCEWEN, J.G., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.** v.24, p.337-339, 1986.

RESTREPO, F.M., RESTREPO, M., RESTREPO, A. Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.21, n.35, 1983.

RESTREPO, M.A. A reappraisal of the microscopical appearance of the mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 8, p.141-144, 1970.

SALAZAR, M.E. RESTREPO, A. STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infec. Immun.**, v.56, p.711-713, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** 2 ed, Cold Spring harbor Laboratory press, 1989.

SAN BLAS F, CASTAÑEDA E. Biología de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Interciência**, v.15, n.4, p.212-215, 1990,

SAN BLAS, F. Ultraestructure of spore formation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**v. 24, p.203-210, 1986.

SAN BLAS, G., SAN BLAS, F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis*. Dimorphism In: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomicosys**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap.4. p.49-55.

SAN BLAS G, NIÑO VEGA G, ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Micology**, p.40, p.225-242, 2002.

SAN BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.** v.31, p.99, 1993.

SAN BLAS, G., PADRÓN, R., MURGICH, J., The dimorphic transition in *Paracoccidioides brasiliensis*, a mathematical and physicochemical challenge. In: Annual Review of Biomedical Sciences, Special Issue. In: ANAIS DO ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSE, 8., Botucatu, SP, 2002. São Paulo: Fundação Editora da Unesp, 2002. p.13.

SHOME, S.K., BATISTA, A.C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife (Brazil). **Rev. Fac. Med. Uni. Ceará** v.3, p.90-94, 1963.

SIDRIM, J.J.C., MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287p.

SILVA, A.M.M., BORBA, C.M., OLIVEIRA, P.C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, v.37, p.165-169, 1994.

SILVA-VERGARA, M.L., MARTINEZ, R., CHADU, A., et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, v.36, p.37-42, 1998.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, s.d. 336p

SOARES, C.M., MADLUN, E.E. da SILVA, S>P., PEREIRA, M., FELIPE, M.S  
Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified  
polymorphic DNA analysis. **J.Clin.Microb.** v.33, p.505-507, 1995.

TELLES, F. QUEIROZ. Terapêutica da Paracoccidioidomicose. In: VERONESI, R.,  
FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia** , São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1104-  
1111.

VILLAR, L.A., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Morphological study of a variant of  
*Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. **J.**  
**Med. Vet. Mycol.** v.26, p. 269-276, 1988.

WANKE, B., Epidemiology of Paracoccidioidomycosis: an emerging health problem  
in the Brazilian Amazon region. ANAIS DO ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE . 7., Campos do Jordão, SP. 1999. p. 39

WANKE, B., LONDERO, A.T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection.  
In: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G.  
**Paracoccidioidomicosis**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap 7 p. 110-113.