

LUIZ FERNANDO ZMETEK GRANJA

**DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *Mucor* E A ATIVAÇÃO
DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO *IN VITRO***



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadores: Celuta Sales Alviano
Regina Ejzemberg



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha Catalográfica

GRANJA, Luiz Fernando Zmetek

Diferentes espécies do gênero *Mucor* e a ativação do sistema complemento humano *in vitro*

Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009

XV, 124

Tese: Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientadores: Celuta Sales Alviano e Regina Ejzemberg

1. Sistema Complemento Humano 2. Mucormicose 3. *Mucor polymorphosporus*

4. *Mucor ramosissimus* 5. *Mucor plumbeus* 6. *Mucor circinelloides* 7. Micélio

8. Levedura 9. Esporo

I. Alviano Celuta S. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. Diferentes espécies do gênero *Mucor* e a ativação do sistema complemento humano *in vitro*

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos, Departamento de Microbiologia Geral, e no Laboratório de Imunoquímica II, Departamento de Imunologia, ambos do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob as orientações, respectivamente, da Prof^ª. Celuta S. Alviano e da Prof^ª. Regina Ejzemberg.

Agradecimentos

À minha orientadora, Regina Ejzemberg, que me ensinou tudo que sei sobre o mundo do “Sistema Complemento”. Obrigado por ficar além do tempo regulamentar para me auxiliar a terminar a tese.

À minha outra orientadora, Celuta S. Alviano, do laboratório de Estruturas de Superfície do Departamento de Microbiologia Geral, por me aceitar como aluno, permitindo que eu pudesse concretizar meu doutorado.

À Lysianne Pinto, minha companheira de laboratório que sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas e me ajudar com os intermináveis experimentos no laboratório.

À Daniela S. Alviano e Catia A. Almeida pelo fornecimento da matéria prima utilizada no meu trabalho, o fungo *Mucor polymorphosporus*, e me auxiliarem neste trabalho.

À Maria Helena da Silva pela disponibilidade de tempo para me ajudar, ensinar e me fazer sentir em casa no seu laboratório.

À Ana, querida técnica do laboratório, que sempre me ajudou da forma que pode.

À Rosalie R. R. Coelho, Pedro Paulo X. Elsas, José M. Peralta por permitirem que eu usasse seus laboratórios para fazer vários de meus experimentos. Sem a sua ajuda, minha tese não seria possível.

À Tatyane, que durante a vida acadêmica se tornou grande amiga e companheira de aventuras. Obrigado por compartilhar um pouco de sua sabedoria, carinho e tempo comigo.

À Renata. Obrigado por ser amiga e exemplo de pessoa trabalhadora.

À Marcella, Nathalia, Zoraidy, Anderson, Patrícia, Selma e Oscarina pelos momentos juntos e almoços inesquecíveis.

Aos demais colegas de doutorado, por tornarem minha vida na Universidade tão prazerosa quanto possível. Sem vocês a vida acadêmica teria sido muito menos proveitosa.

À diretora do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Dra. Agnes M. S. Figueiredo, e a coordenadora da Pós-Graduação, Dra. Thais Souto Padron, pela oportunidade de cursar meu doutorado no Instituto.

Aos professores do Instituto, que me ensinaram a gostar de Microbiologia e Imunologia. Obrigado por valorizarem tanto nossa educação e estarem sempre disponíveis para tirar dúvidas e nos ajudar com auxílios intelectuais.

À CAPES pela bolsa disponibilizada durante todo o doutorado.

À família da minha namorada. Tânia, Dinha e Aninha, o apoio de vocês foi essencial para que eu pudesse terminar minha tese. Com vocês minha família cresceu mais um pouquinho. Obrigado.

À minha família. Pipa, obrigado pelo apoio. Você é um ótimo pai, pena que nem todos possam ter um igual a você. É sempre bom saber que posso contar contigo para qualquer coisa. Obrigado por tudo.

Monglín, espero que eu possa servir de inspiração. Desejo que você consiga terminar seus estudos na UFRJ. Obrigado pela confiança.

Mamãe Lu obrigado por ter sido a melhor mãe do mundo. Você mais que ninguém queria que eu seguisse fazendo mestrado e doutorado. Saiba que estou no caminho certo e tudo graças a você e sua determinação pela minha educação.

Tatiana, minha namorada. Obrigado pelos vários anos que compartilha em minha vida. Sei que agora sou completo. Obrigado por estar sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins. Amo-te. Com um passo de cada vez, estamos construindo nossos sonhos.

A minha inspiração, Tatiana.
Ao meu incentivador, Edson.
A minha aspiração, Lourdes, “in memoriam”.
A confiança de meu irmão, Marcelo.

“O tempo passa, a ciência avança, o mundo evolui. Sonho, apenas, acompanhá-los.”

Luiz Fernando Zmetek Granja

Resumo

Luiz Fernando Zmetek Granja

DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *MUCOR* E A ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO *IN VITRO*

Orientadores: Celuta S. Alviano e Regina Ejzemberg

Mucormicose é o nome da doença oportunista causada por fungos pertencentes à classe *Zygomycetes*, ordem Mucorales. O recente aumento no número de casos desta doença reforça a necessidade de estudar estes fungos frente o sistema imunológico. O sistema complemento tem papel crucial na defesa humoral contra patógenos microbianos. Uma série de proteínas séricas é seqüencialmente ativada acarretando a deposição de componentes do complemento na superfície microbiana e podendo levar à opsonização e/ou à lise de microrganismos susceptíveis. Nesse trabalho foram usadas as formas de micélio, levedura e esporo (diferenciados ou não) de *Mucor polymorphosporus* e as formas de micélio e esporos de *Mucor ramosissimus*, *Mucor plumbeus* e *Mucor circinelloides* para estudar os perfis de ativação do complemento. Os resultados mostraram que as formas miceliais das espécies testadas divergiram em dois perfis de ativação. *M. polymorphosporus* e *M. ramosissimus* apresentaram consumo de complemento superior quando todas as vias estavam liberadas, em comparação a *M. plumbeus* e *M. circinelloides*. Os esporos de todas as espécies testadas mostraram perfis semelhantes quanto à ativação do sistema complemento, consumindo 100% deste. Os perfis de deposição de fragmentos de C3 e C4, MBL, CRP e IgG, avaliados por ELISA, também foram semelhantes para todos os esporos. A levedura de *M. polymorphosporus* não apresentou fragmentos de C4, nem tampouco a presença de MBL, CRP ou IgG, indicando que a via alternativa é a principal utilizada. Essa diferença de perfis encontrada entre as formas de levedura e esporo de *M. polymorphosporus* sugere alterações estruturais que favorecem determinadas vias. A distribuição de fragmentos de C3 foi avaliada por imunofluorescência direta, e todas as amostras testadas apresentam este componente de forma confluyente em suas superfícies. Isto indica uma opsonização eficiente. Além disto, a presença de C4, MBL, IgG e CRP, em todos os esporos, sugere a participação

das vias clássica e das lectinas. A utilização de esporos em diferenciação demonstrou que hifas recém diferenciadas não apresentam fragmentos de C3 em sua superfície. Além disso, a presença de melanina em nossas amostras foi avaliada por imunofluorescência, pois ela é capaz de ativar o sistema complemento. Essa estrutura foi observada em todos os esporos utilizados, no entanto as leveduras e hifas recém diferenciadas de *M. polymorphosporus* não demonstraram essa mesma propriedade.

Palavras Chave: 1. Sistema Complemento Humano 2. Mucormicose 3. *Mucor polymorphosporus* 4. *Mucor ramosissimus* 5. *Mucor plumbeus* 6. *Mucor circinelloides* 7. Micélio 8. Levedura 9. Esporo

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2009

Summary

Luiz Fernando Zmetek Granja

DIFFERENT SPECIES FROM THE GENUS *MUCOR* AND THE HUMAN COMPLEMENT SYSTEM ACTIVATION *IN VITRO*

Mentors: Celuta S. Alviano e Regina Ejzemberg

Mucormycosis is an opportunistic infection caused by fungi of the Mucorales order. The recent increase in mucormycotic cases indicates the need to study these fungi versus the immunological defenses of the host. Complement system has a major role in humoral defenses against microbial pathogens. Serum proteins are sequentially activated leading to complement component deposition onto microbial surface, which can lead to opsonization and/or lysis of susceptible microbes. In this work, *Mucor polymorphosporus* mycelium, yeast and spores (differentiated or not); and *Mucor ramosissimus*, *Mucor plumbeus* and *Mucor circinelloides* mycelia and spores were used to study complement activation. The results showed two activation profiles for mycelia. *Mucor polymorphosporus* and *Mucor ramosissimus* had higher consumption, when all pathways were active, than *Mucor plumbeus* and *Mucor circinelloides*. Similar activation profiles (total complement consumption) were observed with spores from all species used in this. C3 and C4 fragments, MBL, CRP and IgG, analyzed by ELISA, were also similar on spores after complement activation. *M. polymorphosporus* yeast showed very low levels of C4, MBL, CRP or IgG, indicating that alternative pathway is the major activation pathway. These disparities observed points out that these structural differences may be accountable for the use of different pathways. C3 fragments analysis, assayed by immunofluorescence, evidenced that this components was distributed confluent throughout spores and yeast surfaces, which suggests an efficient opsonization. Furthermore, C4, MBL, IgG and CRP, present on spore surface, suggest that classical and lectin pathways take part in the activation process. Hyphae from recent differentiated spores did not show C3 fragments on its surface. Melanin presence on our samples was also evaluated by immunofluorescence, since this pigment is able to activate the complement system.

Aside from yeast and recently differentiated hyphae from *M. polymorphosporus*, all spore samples were positive for melanin.

Keywords: 1. Human complement system 2. Mucormycosis 3. *Mucor polymorphosporus* 4. *Mucor ramosissimus* 5. *Mucor plumbeus* 6. *Mucor circinelloides* 7. Mycelium 8. Yeast 9. Spores

Rio de Janeiro

February, 2009

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| AGRADECIMENTOS | III |
| RESUMO | VII |
| SUMMARY | IX |
| ÍNDICE | XI |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XIII |
| SIGLAS | XV |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. FUNGOS | 1 |
| 1. GÊNERO <i>MUCOR</i> | 6 |
| 2. MUCORMICOSE..... | 12 |
| 3. SISTEMA COMPLEMENTO..... | 18 |
| 3.1. <i>Nomenclatura</i> | 22 |
| 3.2. <i>Via Clássica</i> | 23 |
| 3.3. <i>Via Alternativa</i> | 25 |
| 3.4. <i>Via das Lectinas</i> | 27 |
| 3.5. <i>Fragmentos e receptores do complemento</i> | 29 |
| 3.6. <i>Regulação do Sistema Complemento</i> | 30 |
| 4. SISTEMA COMPLEMENTO X FUNGOS..... | 33 |
| CONTEXTO E MOTIVAÇÃO | 37 |
| OBJETIVOS | 39 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 40 |
| 1. FUNGOS | 40 |
| 2. CULTURA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>MUCOR</i> | 41 |
| 2.1. <i>Obtenção de micélio</i> | 41 |
| 2.2. <i>Obtenção de esporangiosporos</i> | 41 |
| 2.3. <i>Obtenção de leveduras de M. polymorphosporus</i> | 41 |
| 2.4. <i>Obtenção de esporos em diferenciação de M. polymorphosporus</i> | 41 |
| 3. SOROS HUMANOS (FONTE DO COMPLEMENTO) | 42 |
| 3.1. <i>Absorção do Soro Humano com Micélio</i> | 42 |
| 3.2. <i>Absorção do Soro Humano com Eritrócitos de Carneiro (EC)</i> | 42 |
| 4. ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO | 43 |
| 5. IMUNOFLUORESCÊNCIA | 47 |
| 5.1. <i>Detecção de Fragmentos de C3 por Imunofluorescência Direta</i> | 47 |
| 5.2. <i>Detecção de IgG humana por Imunofluorescência Direta</i> | 48 |
| 5.3. <i>Detecção de melanina por Imunofluorescência Indireta</i> | 48 |
| 6. ENSAIO IMUNO ENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA) | 49 |
| 7. MÉTODOS ESTATÍSTICOS | 50 |
| RESULTADOS | 51 |
| 1. ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO POR FORMAS MICELIAIS | 51 |
| 2. ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO POR ESPOROS | 54 |
| 3. ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELAS FORMAS DE MICÉLIO, LEVEDURA E ESPOROS DE <i>MUCOR</i> <i>POLYMORPHOSPORUS</i> | 55 |
| 4. ENSAIOS IMUNO ENZIMÁTICOS (ELISA)..... | 57 |
| 4.1. <i>Detecção de fragmentos de C3 em esporos das espécies de Mucor</i> | 57 |
| 4.2. <i>Detecção de fragmentos de C4 em esporos das espécies de Mucor</i> | 58 |
| 4.3. <i>Detecção de MBL, CRP e IgG em esporos das espécies de Mucor</i> | 59 |
| 4.4. <i>Detecção de Fator H e C3d em esporos das espécies de Mucor</i> | 60 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5. Detecção de fragmentos de C3 na superfície de esporo e levedura de <i>Mucor polymorphosporus</i> | 61 |
| 4.6. Detecção de fragmentos de C4 na superfície de esporo e levedura de <i>Mucor polymorphosporus</i> | 62 |
| 4.7. Detecção de MBL, CRP e IgG em esporo e levedura de <i>Mucor polymorphosporus</i> | 63 |
| 5. IMUNOFLUORESCÊNCIA | 64 |
| 5.1. Distribuição de fragmentos de C3 nas amostras de esporos de <i>M. ramosissimus</i> , <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> | 64 |
| 5.2. Distribuição de fragmentos de C3 nas amostras de esporos e leveduras de <i>M. polymorphosporus</i> | 66 |
| 5.3. Distribuição de IgG nas amostras de esporos de <i>M. ramosissimus</i> , <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> | 69 |
| 5.4. Distribuição de IgG nas amostras de esporos e leveduras de <i>M. polymorphosporus</i> | 70 |
| 5.5. Distribuição de melanina nas amostras de esporos de <i>M. ramosissimus</i> , <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> | 71 |
| 5.6. Distribuição de melanina nas amostras de esporos e leveduras de <i>M. polymorphosporus</i> | 72 |
| 5.7. Distribuição de fragmentos de C3, IgG e melanina nas amostras de Zimosan..... | 73 |
| DISCUSSÃO | 74 |
| CONCLUSÃO | 87 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 88 |
| ANEXO | 107 |
| 1. REAGENTES | 107 |
| 2. QUELANTES..... | 108 |
| 3. MEIOS DE CULTURA | 108 |

Índice de Figuras

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Desenho esquemático de parede celular fúngica micelial. (Adaptado de http://www.doctorfungus.org/thedrugs/images/drug-targets.jpg)..... | 4 |
| Figura 2. Vias morfogênicas diversas de esporangiosporos dos Mucorales. Adaptado de ORLOWSKI, 1991..... | 8 |
| Figura 3. Diferenças entre paredes celulares da hifa de <i>Mucor</i> spp. (A) e leveduras de <i>M. racemosus</i> (B). Aumento de x 30.000 (ORLOWSKI, 1991)..... | 9 |
| Figura 4. Vias de ativação do sistema complemento (FUJITA, 2002)..... | 23 |
| Figura 5. Porcentagem de consumo do complemento pelas formas miceliais (20mg) das espécies de <i>M. polymorphosporus</i> , <i>M. ramosissimus</i> , <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> , após ativação na presença ou ausência de quelantes (EDTA ou EGTA)..... | 52 |
| Figura 6. Análise comparativa das porcentagens de consumo do complemento pelas formas miceliais dos fungos <i>M. polymorphosporus</i> , <i>M. ramosissimus</i> , <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> , após ativação na presença ou ausência de EGTA utilizando:..... | 53 |
| A) soros absorvidos com hemácias de carneiro e micélio das respectivas espécies;..... | 53 |
| B) soros absorvidos apenas com hemácias de carneiro..... | 53 |
| Figura 7. Porcentagem de consumo do complemento por esporos (10^8) das espécies <i>M. polymorphosporus</i> , <i>M. ramosissimus</i> , <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> , após ativação na presença ou ausência de quelantes (EDTA ou EGTA)..... | 54 |
| Figura 8. Análise comparativa da porcentagem de consumo do complemento por micélio (20mg), levedura (10^7) e esporos (10^8) de <i>M. polymorphosporus</i> , após ativação na presença ou ausência de quelantes (EDTA ou EGTA)..... | 55 |
| Figura 9. Porcentagem de consumo do complemento por esporos de <i>M. polymorphosporus</i> , de diferentes tempos de diferenciação a 4°C, após ativação do complemento na presença ou ausência de quelantes (EDTA ou EGTA)..... | 56 |
| Figura 10. Detecção de fragmentos de C3 em esporos de <i>M. polymorphosporus</i>, <i>M. ramosissimus</i>, <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> por ELISA indireto. Anticorpos primários anti-C3 foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. Os valores dos controles negativos foram descontados dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações..... | 57 |
| Figura 11. Detecção de fragmentos de C4 em esporos de <i>M. polymorphosporus</i>, <i>M. ramosissimus</i>, <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> por ELISA indireto. Anticorpos primários anti-C4 foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações..... | 58 |
| Figura 12. Detecção de MBL, CRP e IgG em esporos de <i>M. polymorphosporus</i>, <i>M. ramosissimus</i>, <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> por ELISA indireto. Esporos incubados com soro sem quelantes foram usados neste teste. Anticorpos primários contra cada componente foram adicionados e sua ligação às amostras avaliada após incubação com o respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações..... | 59 |
| Figura 13. Detecção de Fator H e fragmento C3d em esporos de <i>M. polymorphosporus</i>, <i>M. ramosissimus</i>, <i>M. plumbeus</i> e <i>M. circinelloides</i> por ELISA indireto. Esporos incubados com soro na presença de EGTA-Mg ²⁺ foram usados neste teste. Anticorpos primários contra cada componente foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações..... | 60 |
| Figura 14. Detecção de fragmentos de C3 em levedura e esporos em diferenciação de <i>M. polymorphosporus</i> por ELISA indireto. Anticorpos primários anti-C3 foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. Os valores dos controles negativos foram descontados dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações. ... | 61 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 15. Detecção de fragmentos de C4 em levedura e esporos em diferenciação de <i>M. polymorphosporus</i> por ELISA indireto. Anticorpos primários anti-C4 foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações. ... | 62 |
| Figura 16. Detecção de MBL, CRP e IgG em leveduras e esporos de <i>M. polymorphosporus</i> por ELISA indireto. Esporos incubados com soro sem quelantes foram usados neste teste. Anticorpos primários contra cada componente foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações. | 63 |
| Figura 17. Detecção de fragmentos de C3 em esporos de diferentes espécies de <i>Mucor</i> por imunofluorescência direta. I. <i>M. ramosissimus</i>. IA) esporo incubado com soro + EDTA. IB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg ²⁺ . IC) esporo incubado com soro sem quelantes. II. <i>M. plumbeus</i>. IIA) esporo incubado com soro + EDTA. IIB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg ²⁺ . IIC) esporo incubado com soro sem quelantes. III. <i>M. circinelloides</i>. IIIA) esporo incubado com soro + EDTA. IIIB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg ²⁺ . IIIC) esporo incubado com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm. | 65 |
| Figura 18. Detecção de fragmentos de C3 em <i>M. polymorphosporus</i> por imunofluorescência direta. I. Esporos. IA) esporo incubado com soro + EDTA. IB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg ²⁺ . IC) esporo incubado com soro sem quelantes. II. Leveduras. IIA) levedura incubada com soro + EDTA. IIB) levedura incubada com soro + EGTA-Mg ²⁺ . IIC) levedura incubada com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm. | 67 |
| Figura 19. Detecção de fragmentos de C3 em esporos em diferenciação de <i>M. polymorphosporus</i> por imunofluorescência direta. I. 1 dia de diferenciação. IA) esporo incubado com soro + EDTA. IB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg ²⁺ . IC) esporo incubado com soro sem quelantes. II. 9 dias de diferenciação. IIA) esporo incubado com soro + EDTA. IIB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg ²⁺ . IIC) esporo incubado com soro sem quelantes. III. 18 dias de diferenciação. IIIA) esporo incubado com soro + EDTA. IIIB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg ²⁺ . IIIC) esporo incubado com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm. | 68 |
| Figura 20. Detecção de IgG em esporos das diferentes espécies de <i>Mucor</i> por imunofluorescência direta. A) <i>M. ramosissimus</i> incubado com soro sem quelantes. B) <i>M. plumbeus</i> incubado com soro sem quelantes. C) <i>M. circinelloides</i> esporo incubado com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm. | 69 |
| Figura 21. Detecção de IgG em esporos e levedura de <i>Mucor polymorphosporus</i> por imunofluorescência direta. A) esporo incubado com soro sem quelantes. B) levedura incubada com soro sem quelantes. C) esporo com 18 dias de diferenciação incubado com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm. | 70 |
| Figura 22. Detecção de melanina em esporos das diferentes espécies de <i>Mucor</i> por imunofluorescência indireta. A) <i>M. ramosissimus</i> incubado com soro + EDTA. B) <i>M. plumbeus</i> incubado com soro + EDTA. C) <i>M. circinelloides</i> esporo incubado com soro + EDTA. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm. | 71 |
| Figura 23. Detecção de melanina em esporos e levedura de <i>Mucor polymorphosporus</i> por imunofluorescência indireta. A) esporo incubado com soro + EDTA. B) levedura incubada com soro + EDTA. C) esporo com 18 dias de diferenciação incubado com soro + EDTA. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm. | 72 |
| Figura 24. Detecção de fragmentos de C3, IgG e Melanina sobre zimosan. Imunofluorescência direta (C3 e IgG) e indireta (melanina). Detecção de C3: A - Zimosan incubado com soro + EDTA. B - Zimosan incubado com soro + EGTA-Mg ²⁺ . C - Zimosan incubado com soro sem quelantes. Detecção de IgG: D - Zimosan incubado com soro sem quelantes. Detecção de melanina: E - Zimosan incubado com soro + EDTA. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm. | 73 |

Siglas

- ATCC – American Type Culture Collection
- CABI – CAB (Ex-Commonwealth Agriculture Bureaux) International
- CD – Czapeck-Dox
- CH₅₀ – Unidades de Complemento Capaz de Lisar 50% de Eritrócitos
- CR – Receptor de Complemento
- CRP – Proteína C-Reativa
- DAF – Fator de Aceleração de Dissociação
- EA – Eritrócito Sensibilizado (eritrócito de carneiro sensibilizado com anticorpos anti- eritrócitos de carneiro)
- EC – Eritrócitos de Carneiro
- EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-acético
- EGTA – Ácido Etilenoglicol Bis (éter β-amino etil éter) N, N, N', N' tetra-acético
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HRF – Fator de Restrição Homólogo
- Ig – Imunoglobulina
- LIKA – Laboratório de imunopatologia Keizo Asami
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MAC – Complexo de Ataque à Membrana
- MASP – Serina Protease Associada à MBL
- MBL – Lectina de Ligação à Manose
- MCP – Proteína Co-fator de Membrana
- PBS – Tampão Fosfato Salina
- PTX – Pentraxina
- RCA – Reguladores da Ativação do Complemento
- SAP – Proteína Amilóide Sérica
- SIC – Inibidor Estreptocócico do Complemento
- SHN – Soro Humano Normal
- TLR – Receptor Toll-símile
- URM – University of Recife Mycologia
- VBS – Tampão Veronal Salina

Introdução

1. Fungos

Fungos são eucariontes que possuem parede celular complexa e produzem esporos. Eles podem se apresentar nas formas leveduras e hifas (RUIZ-HERRERA, 1985). O crescimento do fungo em geral ocorre com a formação de colônias filamentosas, multicelulares e aspecto cotonoso. Estas colônias consistem de hifas ramificadas que, quando emaranhadas, passam a serem chamadas de micélio. As hifas são divididas em células por septos. Alguns fungos possuem septos em intervalos regulares e outros não. As leveduras são unicelulares, normalmente esféricas ou elipsóides, e suas colônias são normalmente pequenas, opacas e beges (HIBBET et al., 2007). Algumas espécies de fungos são dimórficas, apresentando tanto formato de hifa quanto de levedura (RUIZ-HERRERA, 1985), como por exemplo: *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum* (SPETH et al., 2008).

Os fungos estão presentes nos mais diversos habitats como água, solo e material em decomposição onde existem como saprófitas. São organismos quimioorganotróficos, ou seja, obtêm energia a partir da oxidação de compostos orgânicos, e geralmente possuem requisitos nutricionais simples. Grande parte dos fungos é capaz de decompor materiais como lignina e celulose, presentes na madeira, contribuindo para a mineralização do carbono orgânico, e, portanto, de grande importância ecológica (MADIGAN, 2000). Contudo, algumas espécies se adaptaram à condição de parasitas tanto de plantas (BENITEZ et al., 2004) quanto de animais (COONEY & KLEIN, 2008) ou de simbioses, como no caso dos líquens que consistem da associação entre fungos e algas (MADIGAN, 2000).

Recentemente, sete filios pertencentes aos fungos foram descritos: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota e Glomeromycota (HIBBET et al., 2007). Uma espécie fúngica é alocada em um filo, assim como sua respectiva classe, ordem, família e gênero, de acordo com suas propriedades fenotípicas (morfologia e fisiologia), reprodução e semelhança filogenética.

Dentre os zigomicetos (Zygomycota), a reprodução sexuada resulta em um zigosporo e a assexuada em esporangiosporo. Suas hifas possuem raros septos. Alguns exemplos de gêneros pertencentes a esse filo são *Rhizopus*, *Mucor* e *Absidia*.

Para ascomicetos (Ascomycota), a reprodução sexuada envolve uma bolsa ou asco onde ocorre meiose, produzindo ascosporos. Sua reprodução assexuada se dá por conídios e suas hifas são septadas a intervalos regulares. Como exemplos de gêneros podem ser citados *Ajellomyces* (teleomorfo), *Blastomyces* (anamorfo), *Histoplasma* (anamorfo), *Saccharomyces* (teleomorfo) e *Candida* (anamorfo).

Em basidiomicetos (Basidiomycota), a reprodução sexuada produz basidiosporos sustentados por um basídio. Suas hifas também são septadas a intervalos regulares. *Filobasidiela* (teleomorfo) e *Cryptococcus* (anamorfo) são exemplos de gêneros desse filo. Os cogumelos, que são corpos frutificantes de alguns fungos, pertencem exclusivamente ao filo Basidiomycota.

Quitridiomicetos (Chytridiomycota) são normalmente aquáticos e seus zoosporos e gametas, possuem flagelos. Os fungos pertencentes a esse filo possuem talos asseptados e normalmente não formam micélio. Dentre seus principais gêneros estão: *Batrachochytrium* e *Synchytrium*.

Blastocladiomicetos (Blastocladiomycota) estavam anteriormente classificados dentro do filo dos quitridiomicetos, no entanto recentemente foram

reclassificados devido a novos dados moleculares. Diferentemente dos quitridios, os esporos dos blastocladiomicetos possuem a capacidade de realizar meiose, enquanto os quitridios exibem meiose zigótica. *Allomyces* e *Blastocladia* são exemplos de gênero pertencentes a esse filo.

Neocallimastigomicetos (Neocallimastigomycota) são fungos anaeróbicos, encontrados no interior do estômago de ruminantes. Eles não possuem mitocôndrias, mas hidrogenossomos que oxidam NADH a NAD⁺. Como quitridios, possuem zoósporos que podem ser uni ou multiflagelados. Dentre seus gêneros estão *Neocallimastix* e *Anaeromyces*.

Glomeromicetos (Glomeromycota) são fungos que formam micorrizas e estão associados com vegetais superiores. Possuem hifas asseptadas e normalmente formam glomerosporos por reprodução assexuada. A reprodução sexuada deste filo ainda é desconhecida. Alguns gêneros conhecidos são *Glomus* e *Archaeospora*.

A parede celular dos fungos, em geral, é composta basicamente de polissacarídeos e proteínas. Dentre os polissacarídeos, destaca-se a presença de glucanas, mananas e quitina. A quantidade de proteínas pode variar de acordo com a forma do fungo. Leveduras podem ter até 50% de seu peso seco constituído por proteínas enquanto que nas hifas este valor normalmente não ultrapasse 30% (PONTON, 2008; PONTON et al., 2001). Variações como estas são encontradas também em relação aos polissacarídeos. Nas hifas, o percentual de quitina pode chegar a ser dez vezes maior que nas leveduras (PONTON et al., 2001).

A parede fúngica normalmente é também constituída por glucanas, compostas por unidades de glicose com ligações β -1,3 e β -1,6. As interações dessas glucanas com quitina, mananas e proteínas levam à formação de uma malha que confere grande resistência mecânica à parede, o que é essencial para a integridade celular (Fig. 1).

Um componente comum na parede de vários fungos é um pigmento escuro conhecido como melanina. As melaninas são compostos de carga negativa, hidrofóbicos e normalmente de alto peso molecular. Elas são insolúveis em solventes orgânicos e água. Esse pigmento é geralmente formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos e geralmente possuem coloração marrom escura ou preta (TABORDA et al., 2008). As melaninas podem proteger os fungos de enzimas hidrolíticas (ROSAS & CASADEVALL, 2001), raios ultravioletas (NOSANCHUCK & CASADEVALL, 2003), radiação gama (MIRONENKO et al., 2000), temperatura extremas (ROSAS & CASADEVALL, 1997) e metais pesados (NOSANCHUCK & CASADEVALL, 2006). Normalmente a melanina está localizada na camada mais externa da parede celular (NIMRICHTER et al., 2005; WANG, AISEN & CASADEVALL, 1996).

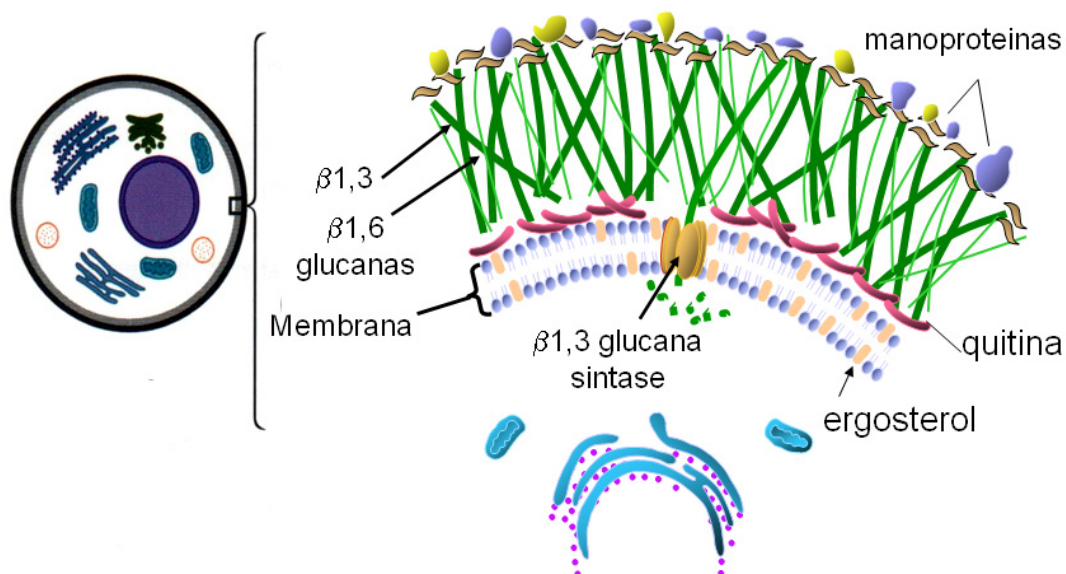


Figura 1. Desenho esquemático de parede celular fúngica micelial. (Adaptado de <http://www.doctorfungus.org/thedrugs/images/drug-targets.jpg>)

Como mencionado anteriormente, os fungos podem produzir esporos, que são facilmente dispersados e possuem resistência acentuada contra condições adversas. Eles podem germinar para sua forma vegetativa, hifa ou levedura, quando as condições ambientais estiverem favoráveis. Os esporos podem ser derivados de reprodução sexuada, teleomorfos, ou assexuada, anamorfos (MADIGAN, 2000).

Conforme referido acima, algumas espécies de fungos adaptaram-se aos organismos vivos e podem inclusive causar doenças. Embora apenas algumas espécies sejam responsáveis por doenças (Tabela 1) em animais (micoses), elas são de grande interesse clínico, dada a gravidade das lesões que causam. Com o surgimento da AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) e o uso intenso tanto de drogas antimicrobianas quanto imunossupressoras, algumas espécies saprófitas passaram a ter grande importância do ponto de vista clínico (SHAO et al., 2006).

Tabela 1. Principais fungos responsáveis por micoses e suas manifestações clínicas (adaptado de MITCHELL, 2007).

| Doença | Fungos | Micose |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Superficial | <i>Malassezia furfur</i> <i>Exiophiala werneckii</i> <i>Trichosporon beigelii</i> <i>Piedraia hortae</i> | Pitiríase versicolor Tinha negra Pedra branca Pedra negra |
| Cutânea | <i>Microsporum sp.</i> , <i>Trychophyton sp.</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Candida albicans</i> , <i>Candida sp.</i> | Dermatofitoses Candidíase da pele, mucosa ou unhas. |
| Subcutânea | <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Madurella mycetomatis</i> <i>Exophiala</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Exserohilum</i> | Esporotricose Cromoblastomicose Micetoma Feohifomicose |
| Sistêmica (primária, endêmica) | <i>Coccidioides immitis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | Coccidioidomicose Histoplasmose Blastomicose Paracoccidioidomicose |
| Oportunista | <i>Candida albicans</i> , <i>Candida sp.</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus sp.</i> <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Absidia sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> e outros zigomicetos. <i>Penicillium marneffeii</i> | Candidíase sistêmica Criptococose Aspergilose Mucormicose Penicilíose |

Por outro lado, a grande diversidade dos fungos tem possibilitado seu emprego em biotecnologia. Assim muitas espécies de fungos tem sido utilizadas na indústria de alimentos, produção de fármacos, etc. (MADIGAN, 2000). O gênero *Mucor* é um exemplo de fungo importante tanto do ponto de vista clínico quanto industrial.

1. Gênero *Mucor*

O gênero *Mucor* pertence ao filo Zygomycota e classe Zygomycetes. Essa classe é subdividida em 2 ordens: Mucorales e Entomophthorales. A maioria dos zigomicetos de importância clínica ou industrial é pertencente aos Mucorales. A maior parte dos fungos desta ordem pertence à família Mucoraceae, sendo os gêneros principais: *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Absidia*. Estes fungos estão amplamente distribuídos no meio ambiente. Eles são encontrados no ar, onde eles existem como saprófitas, e podem também estar presente em frutas e pães (GONZALEZ et al., 2002). Estudos recentes mostraram a presença constante de fungos do gênero *Mucor* em poeira caseira no interior de residências, independentemente da época do ano (CHO et al., 2008; PIECKOVA & WILKINS, 2004). Outro estudo demonstrou a presença de fungos do mesmo gênero na microbiota normal de um artrópode gigante de Madagascar, *Gromphadorhina portentosa* (YODER et al., 2007). Estes dados reforçam a ubiquidade dos fungos deste gênero.

Atualmente mais de 40 espécies são classificadas no gênero *Mucor*. Contudo o número exato é desconhecido, pois há muitas propostas de inclusão de novas espécies nesse gênero (INDEX FUNGORUM, 2008). As colônias desses fungos são normalmente de coloração branca, bege ou acinzentada. Colônias antigas podem

desenvolver uma cor escura devido ao surgimento de esporos. Os esporangiosporos podem ser simples ou ramificados e formam esporângios apicais ou globulares, que são sustentados por uma columela em forma de coluna. Não há presença de rizóides neste gênero. Durante a reprodução assexuada, são formados esporangióforos eretos que incham e dão origem a um esporângio globoso que contem esporangiosporos haplóides. Já durante a reprodução sexuada, estirpes compatíveis formam hifas curtas especializadas, chamadas de gametângia. No local onde gametângias compatíveis se fundem é formado um zigospório com formato esférico e paredes espessas. Esta estrutura abriga geralmente um único zigosporo. Após recombinação sexual no zigosporo, este germina e forma hifas e esporângios (BENNY, 1995).

Os fungos do gênero *Mucor* normalmente não são patogênicos para o homem, sendo considerados oportunistas. Alguns destes fungos podem ser responsáveis pela deteriorização de frutos (DE LUCCA, 2007; BORVE & STENSVAND, 2003; ARCHER, 2002) e resistentes a vários agentes fungicidas (MALDONADO et al., 2005).

Os fungos pertencentes à ordem Mucorales em geral apresentam dimorfismo, ou seja, os esporos podem se diferenciar em forma de hifa ou levedura (ver figura 2), conforme as condições de cultivo. RUIZ-HERRERA (1985) indentificou quatro grupos diferentes:

- espécies que crescem somente aerobicamente, na forma micelial (*Mortierella sp.*, *Cunninghamella sp.*);
- espécies que formam micélio tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas (*Rhizopus arrhizus*);

- espécies que crescem aerobicamente ou anaerobicamente como micélio. Sob alta tensão de CO₂ e anaerobiose crescem como levedura (*Mucor rouxii*);
- espécies que crescem aerobicamente como micélio e anaerobicamente como levedura (*Mucor bacilliformis*).

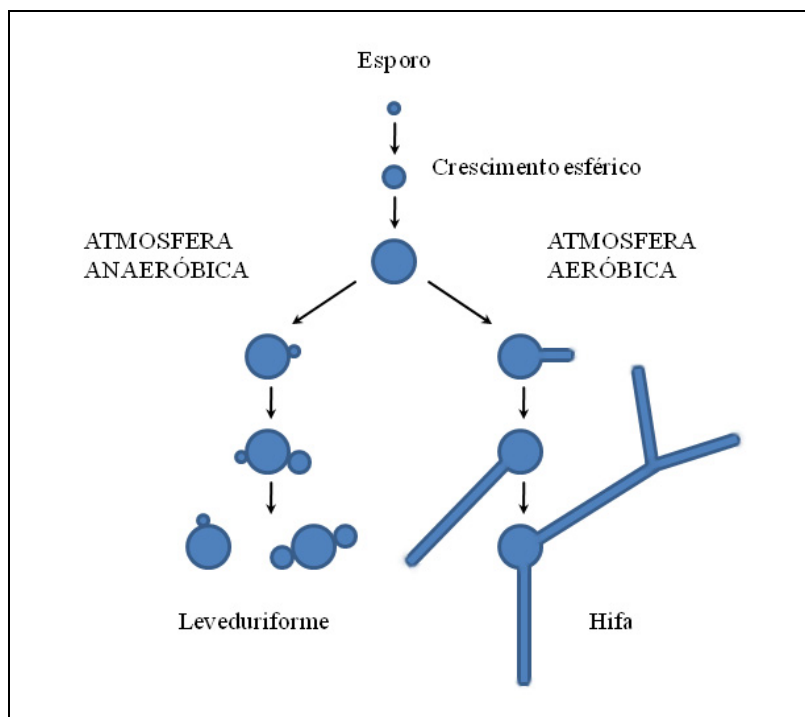


Figura 2. Vias morfogênicas diversas de esporangiosporos dos Mucorales. Adaptado de ORLOWSKI, 1991.

Algumas espécies do gênero *Mucor*, como por exemplo, *M. rouxii*, *M. polymorphosporus*, *M. racemosus*, podem apresentar dimorfismo, dependendo das condições de cultivo (ORLOWSKI 1991).

Quanto à constituição da parede celular, os Mucorales apresentam quitina, mananas, proteínas, e também ácidos urônicos e polifosfatos. Como os zigomicetos em geral, os Mucorales possuem ainda grande quantidade de quitosana na parede. O

percentual em peso seco desse polissacarídeo pode ser duas a três vezes maior que o da quitina (ZAMANI et al., 2008). Uma característica importante do gênero *Mucor* é a baixa quantidade de glucana na parede celular das formas de hifa e levedura, embora a parede dos esporos apresente grande quantidade desse polissacarídeo (40% do peso seco). No caso, por exemplo, do *M. rouxii* o teor de manose nas paredes de suas leveduras é oito vezes maior do que nas hifas (BARTINICKI-GARCIA, 1968). Além disso, essa espécie apresenta polissacarídeos ácidos de alto peso molecular na parede das leveduras e hifas. Esses polissacarídeos contêm alta quantidade de ácido glucurônico. Contudo, há algumas diferenças entre as duas formas: na forma micelial o polissacarídeo é mais ácido que na levedura e o micélio apresenta maior quantidade de fucose e galactose (DOW & RUBERY, 1977).

Também em 1977, DATEMA e cols. descreveram a presença de polímeros polianiônicos em *Mucor mucedo*, constituídos majoritariamente de fucose e ácido glucurônico, contendo também grandes quantidades de manose e galactose.

Essas variações de constituição podem resultar em alterações estruturais significativas na parede celular, como pode ser visto na figura 3.

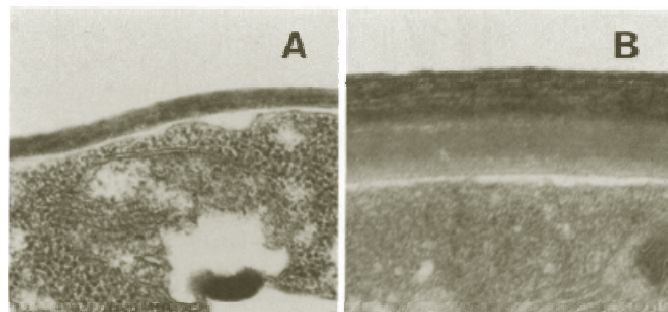


Figura 3. Diferenças entre paredes celulares da hifa de *Mucor* spp. (A) e leveduras de *M. racemosus* (B). Aumento de x 30.000 (ORLOWSKI, 1991).

Essas estruturas diversas de parede podem estar relacionadas com os diferentes processos metabólicos nessas espécies. O formato de hifa ou levedura e vice versa, resulta de diversas mudanças metabólicas (GUTIERREZ & RUIZ-HERRERA, 1979). Em condições aeróbicas, o *M. rouxii* consegue produzir tiamina e niacina na forma de micélio. Contudo, quando esse fungo é colocado em anaerobiose, necessita da adição dessas vitaminas para que possa haver o seu crescimento em forma de levedura (BARTINICKI-GARCIA & NICKERSON, 1961). Fontes de carbono e nitrogênio podem afetar o crescimento das leveduras de *M. rouxii* (RUIZ-HERRERA, 1985). O crescimento da levedura de *M. racemosus* está associado com o metabolismo fermentativo, como relatado por INDERLIED e SYPHERD (1978) que demonstraram que a maior parte da glicose no meio era catabolisada a etanol, CO₂ e glicerol, através da via de Embden-Meyerhoff-Parnas (via glicolítica). Contudo, eles apresentam uma característica interessante: sua incapacidade de fermentar dissacarídeos (BARTINICKI-GARCIA & NICKERSON, 1962). Com relação ao nitrogênio, foi observado que o crescimento de hifas de *M. rouxii* necessita de sais de amônia, enquanto as leveduras precisam de fontes de nitrogênio mais complexas (ELMER & NICKERSON, 1970).

Alguns dos gêneros pertencentes à ordem Mucorales têm importância direta na obtenção de certas substâncias de interesse industrial. As espécies de *Mucor* são consideradas “de baixa periculosidade” (*low hazard*) pela ATCC (American Type Culture Collection) e CABI (Commonwealth Agriculture Bureau International), por isso são mais empregadas pelas indústrias. Várias dessas espécies são capazes de sintetizar produtos industriais importantes como enzimas e ácidos orgânicos (LOCKWOOD, 1975). Enzimas produzidas por espécies de *Mucor* podem ter

atividade proteolítica como no caso do *M. circinelloides* (ANDRADE et al., 2002). Já o *M. miehei* possui enzimas com atividade lipolítica (HARI KRISHNA et al., 2000). *M. indicus* pode produzir etanol a partir de glicose, galactose, manose, frutose, sacarose, xilose e arabinose (SHARIFIA, KARIMI & TAHERZADEH, 2008; SUES et al., 2005; MILLATI, EDEBO & TAHERZADEH, 2005). Por conter grandes quantidades de quitosana em sua parede, espécies de *Mucor* têm um grande potencial em servir de fonte deste polímero, que pode ser utilizado na preservação de alimentos, clarificação de insumos e agente floculante (ZAMANI et al., 2008; CHATTERJEE et al., 2005).

ALVES et al. (2002) realizou um levantamento sobre a produção enzimática de diversas espécies de *Mucor*. O estudo mostrou que a maioria dos isolados apresentava atividades enzimáticas com predominância de poligalactouronase (96%), seguida por amilase (84%), protease (82%) e lípase (66%). Em 2006, Shimonaka et al. mostraram que endoglucanases produzidas por Mucorales possuíam alto potencial para serem utilizadas na indústria têxtil já que apresentavam alta eficiência na desfibrilação de tecidos.

A presença dessas enzimas explica a relação destes fungos com a deterioração de diversos alimentos, como carnes e pães, verificados em diferentes publicações (DANTIGNY et al., 2007; FILTENBORG, FRISVAD & THRANE, 1996; LOWRY & GILL, 1984).

Ao lado dessas aplicações industriais, dada sua “baixa periculosidade”, algumas espécies de *Mucor* foram descritas como agentes causadores de micoses ou mais especificamente **mucormicoses**.

2. Mucormicose

Conforme mostrado na Tabela 1, zigomicetos pertencentes à ordem Mucorales, podem causar um grupo distinto de doenças oportunistas designadas Mucormicose. Em relação às doenças fúngicas invasivas, mais comuns em indivíduos imunocomprometidos, a mucormicose ocupa o terceiro lugar após aspergilose e candidíase, com média anual de 500 casos por ano nos Estados Unidos (BOUZA, MUNOZ & GUINEA, 2006; EUCKER et al., 2001). Entretanto, esta doença não está restrita ao primeiro mundo, acometendo indivíduos em outros países como Brasil (PAULO DE OLIVEIRA & MILECH, 2002), Chile (BRAVO et al., 1999), Egito (BAKR et al., 2008), Etiópia (LESTER, 1986), Índia (DIWAKAR et al., 2007) e Zimbábue (WEINBERG et al., 1993), demonstrando que a doença tem importância global. Os principais gêneros causadores de mucormicose são *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor* e *Rhizomucor* e as formas de doença podem ser: rino-orbito-cerebral (45% dos casos); cutânea (15% dos casos); pulmonar (10%); disseminada (8%) e gastrointestinal (7%). As outras formas de doença (renal, osteomielite e endocardite, dentre outras) são menos frequentes e somadas são responsáveis por 15% dos casos restantes (PRABHU & PATEL, 2004). As espécies que, conhecidamente, podem causar a mucormicose são: *Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizomucor pusillus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Saksenaea vasiformis*, *Cokeromyces recurvatus*, *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, *Mucor racemosus*, *Mucor circinelloides*, *Mucor ramosissimus* (CHAYAKULKEEREE, GHANNOUM & PERFECT, 2006; PRABHU & PATEL, 2004).

A forma da doença é de suma importância, pois a taxa de mortalidade varia amplamente conforme o tipo de doença. Nas doenças rino-orbita-cerebrais e pulmonares essa taxa pode chegar, em ambos os casos, a 60%. Em doenças gastrointestinais e disseminadas a taxa sobe para 95 a 100%. Doenças cutâneas apresentam melhor prognóstico; a taxa de mortalidade não ultrapassa os 16% (ADAM et al., 1994).

A transmissão da mucormicose pode ocorrer através da inalação de esporos presentes no ar, na poeira, em escavações e nos filtros contaminados de condicionadores de ar (ALONSO et al., 1997), ou pela ingestão de produtos alimentícios contaminados com esporos (ABDEL-HAFEZ, 1984). A doença cutânea pode ocorrer por implantação traumática dos esporos, após picadas de agulhas, tatuagem e picadas ou ferroadas de insetos (BHADURI et al., 1983). Até o presente momento não há indícios de transmissão entre seres humanos (CHAYAKULKEEREE, GHANNOUM & PERFECT, 2006).

A imunidade contra os fungos envolve tanto imunidade inata quanto a adaptativa. A fagocitose, realizada por macrófagos e neutrófilos, é um dos principais mecanismos da imunidade inata que contribuem para a eliminação dos fungos. O sistema complemento facilita a remoção dos fungos, pois sua ativação leva à liberação de fragmentos protéicos quimiotáticos para células fagocíticas. Os fragmentos fixados a superfície dos patógenos atuam como opsoninas, dada a presença de receptores para fragmentos do complemento na superfície das células fagocíticas (PATTERSON & DRUTZ, 2001).

A imunidade adaptativa envolve a produção de anticorpos que também irão auxiliar na remoção dos patógenos, tanto diretamente, opsonizando-os ou contribuindo para a ativação do sistema complemento. No caso dos fungos, com a

possível exceção de dermatófitos e *Rhizopus arrhizus*, principal agente da mucormicose, não são susceptíveis à eliminação direta por anticorpos e complemento. As respostas mediadas por linfócitos do tipo T_H1 são geralmente protetoras, devido à atuação de citocinas liberadas por linfócitos sensibilizados sobre os macrófagos infectados. As respostas mediadas por linfócitos do tipo T_H2 , que favorecem a produção de anticorpos, não contribuem efetivamente para a defesa do hospedeiro. De fato, a fagocitose dos fungos, mediada por anticorpos, favorece sua internalização, mas, em muitos casos, as células fagocitárias necessitam de ativação por mecanismos envolvendo a resposta mediada por T_H1 (MITCHELL, 2007).

Indivíduos portadores de imunodeficiências ou imunossuprimidos são mais susceptíveis às doenças fúngicas. Pacientes com neutropenia ou com deficiências nas funções dos neutrófilos parecem estar predispostos a doenças por disseminação hematogênica. Os pacientes com deficiência da imunidade mediada por células como, por exemplo, pacientes com AIDS, são mais susceptíveis a doenças por fungos, inclusive os oportunistas, como os zigomicetos (CHAYAKULKEEREE, GHANNOUM & PERFECT, 2006).

Em condições normais, o hospedeiro possui mecanismos de defesa capazes de inibir a doença pelos Zigomicetos. Entretanto, alguns fatores de risco predisõem à instalação da mucormicose como a diabetes melito, cetoacidose, neutropenia, lupus eritematoso sistêmico, neoplasias, pacientes submetidos a transplantes, quimioterapia e diálise (GONZALEZ, 2002; PAGANOL et al., 1997; BOELAERT et al., 1991). Normalmente, em um hospedeiro imunodeprimido (com neutropenia ou neoplasias hematológicas), a doença se apresenta na forma pulmonar ou disseminada, enquanto a forma rino-orbito-cerebral é mais comum em pacientes com diabetes, especialmente aqueles com cetoacidose (ADAM et al., 1994). Outro fator de risco é o aumento do

nível sérico de ferro, causado por tratamento com deferoxamina. Fungos da ordem Mucorales são capazes de se ligar ao complexo deferoxamina-ferro, deslocando o ferro desse quelante. Por outro lado, pacientes com cetoacidose em que o pH do sangue fica abaixo de 7.4, também são predispostos a mucormicose, devido a influência do pH sérico na ligação do ferro à transferrina (BOELAERT et al., 1993). Nesse caso, o ferro livre pode facilitar o crescimento dos Mucorales. A diminuição do pH, com liberação de ferro, observada em pacientes com diabetes é inclusive o fator de risco mais importante a ser controlado, já que estudos demonstraram que o alto nível de glicose nesses casos não acelera o crescimento do fungo (PRABHU & PATEL, 2004).

Em cerca de 75% dos casos de mucormicose avaliados histologicamente por FRATER, HALL e PROCOP (2001) foi constatada a presença de neutrófilos nos tecidos, demonstrando a importância dessas células na resposta imunológica contra a doença. Os neutrófilos participam da eliminação dos fungos impedindo a germinação dos esporos e impossibilitando a proliferação das hifas (GONZALEZ et al., 2002), que podem causar obstrução vascular e trombose, levando a infarto e necrose de tecidos adjacentes. Portanto, a neutropenia que ocorre, por exemplo, em pacientes submetidos à quimioterapia anticâncer, pode favorecer a progressão disseminada da doença oportunista (BROWN, 1990).

Apesar de a doença por fungos da ordem Mucorales ser normalmente espécie-específica, há casos de doenças por mais de uma espécie de fungo (HORRE et al., 2004; LADOR et al., 2006; ALFANO et al., 2006). Nesses casos havia a presença de zigomicetos em co-doenças por *Candida* sp. ou *Aspergillus* sp.

Em dois casos de doenças urinárias, citados na literatura, constatou-se a presença de leveduras das espécies *Mucor circinelloides* e *Cokeromyces recurvatus*, ambas da ordem Mucorales, após exames de urina (COOPER, 1987).

O diagnóstico da Mucormicose pode ser feito *in vivo*, por meio de biópsia colhida do local da doença. Lâminas histológicas são preparadas e coradas pela reação de Schiff – ácido periódico, Grocott-Gomori nitrato de prata-metanamina, hematoxilina e eosina. Através destas colorações podem ser observadas hifas irregulares asseptadas, com ramificações ocorrendo normalmente em ângulos retos (NOSARI et al., 2000; GONZALEZ, 2002; PRABHU & PATEL, 2004). A cultura positiva é forte indicio da doença e auxilia na escolha da terapia (CHAYAKULKEEREE, GHANNOUM & PERFECT, 2006). Essas técnicas nem sempre são utilizadas, assim a incidência da mucormicose pode ser subestimada, pois o quadro clínico primário (doença dos seios paranasais) é muito semelhante ao produzido por *Aspergillus* (NOSARI et al., 2000) e o agente real da doença fica indefinido. Assim, o diagnóstico *ante-mortem* é alcançado apenas em torno de 30-40% dos casos (PRABHU & PATEL, 2004). Visto que sem o diagnóstico correto, o tratamento fica comprometido.

Técnicas moleculares para detecção de zigomicetos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e *kits* de seqüenciamento como MicroSeq[®] D2, ainda não são totalmente confiáveis, apresentando erros de identificação do fungo. Além disso, essas técnicas não estão disponíveis em vários laboratórios e são utilizadas principalmente para fins de pesquisa (HALL, WOHLFIEL & ROBERTS, 2004; RICKERTS et al., 2001).

O tratamento da mucormicose normalmente é multifatorial. Ele consiste de uma combinação de altas doses de anfotericina B (HERBRECHT et al., 2001),

remoção cirúrgica do tecido infectado e o controle das condições de predisposição (GONZALEZ et al., 2002). Contudo a anfotericina B possui alta nefrotoxicidade, limitando seu uso em pacientes com doenças renais (HARBATH et al., 2002). Para diminuir o efeito nefrotóxico foram desenvolvidas algumas formulações lipídicas da droga, as quais são preferidas atualmente para o tratamento de micoses (ROGERS, 2008; CHAYAKULKEEREE, GHANNOUM & PERFECT, 2006). Algumas drogas têm sido empregadas com relativa eficiência como o posaconazol que foi utilizado em um paciente com mucormicose recém transplantado de coração e rim (TOBON et al., 2003). Contudo a maioria dos azóis, como voriconazol, fluconazol e cetoconazol, em geral não apresenta bons resultados no tratamento do *Mucor* (VAN CUTSEM et al., 1989). Caspofungina e 5-flucitosina também são substâncias importantes contra várias doenças fúngicas, contudo são ineficazes contra os Mucorales (ROGERS, 2008; PRABHU & PATEL, 2004). Recentemente, a incidência de mucormicose nos Estados Unidos aparentemente aumentou após a adoção de voriconazol como antifúngico de amplo espectro padrão para pacientes imunossuprimidos (KAUFFMAN, 2006). Como o voriconazol não é eficaz sobre zigomicetos, há uma seleção desses fungos, o que poderia explicar o aumento da incidência da mucormicose (CHAYAKULKEEREE, GHANNOUM & PERFECT, 2006).

Como citado anteriormente, pacientes com mucormicose devem ser acompanhados clinicamente quanto aos fatores que o predispoem a essa doença. No caso de pacientes diabéticos, a acidose e os níveis glicêmicos devem ser corrigidos. Drogas imunossupressoras e corticóides devem ser descontinuadas durante o tratamento da mucormicose. Estas medidas aumentam significativamente a chance de controlar a doença, contribuindo para a sobrevivência do paciente

(CHAYAKULKEEREE, GHANNOUM & PERFECT, 2006; PRABHU & PATEL, 2004).

Outra abordagem, que vem sendo utilizada com relativo sucesso, é a utilização de oxigênio hiperbárico em paralelo à remoção cirúrgica e tratamento com anfotericina B. Estas medidas deram bons resultados com as formas cutâneas e rinocerebrais das doenças por Mucorales (GAVIRIA et al., 1999).

Como mencionado anteriormente, os organismos superiores desenvolveram sistemas imunológicos complexos, usados no combate aos fungos. Estes sistemas são extremamente eficientes já que, quadros severos de doença, são raros. A imunidade inata é importante, pois apresenta resposta imediata, ou seja, é a primeira forma de defesa dos seres vivos (ULEVITCH, 2000). A imunidade inata apresenta diversos constituintes importantes empregados no combate aos patógenos, dentre eles: lisozima, receptores semelhantes a Toll (TLRs – do inglês Toll-like receptor), citocinas, colectinas, H_2O_2 , NO, e o sistema complemento (BEUTLER, 2004; GASQUE, 2004). No entanto, o sistema complemento tanto pode auxiliar a imunidade quanto prejudicar o hospedeiro.

3. Sistema Complemento

A ativação do complemento e sua ação sobre fungos vem sendo estudadas há mais de 100 anos (SPETH et al., 2008). A propriedade intrínseca de vários patógenos em ativar o sistema complemento é um pré-requisito importante para uma resposta imune bem sucedida. A ativação da cascata do complemento é uma das primeiras linhas de defesa humoral do sistema imune dos hospedeiros. Por isso, existe grande demanda por mais informações sobre a complexa interação entre patógenos e o

sistema complemento. Os fungos intactos, ao entrarem em contato com o sistema complemento, podem ativá-lo dependendo da estrutura da parede celular da espécie infectante (PONTON et al., 2008).

O sistema complemento é constituído por mais de 30 proteínas diferentes, algumas presentes nos fluidos e outras ligadas às membranas celulares. A atividade biológica desse sistema tem importância tanto na imunidade inata quanto na imunidade adquirida. As proteínas do complemento, em geral, circulam no plasma na sua forma inativa. Quando ativadas iniciam reações enzimáticas em cascata, gerando alguns fragmentos que devem ligar-se rapidamente à superfície ativadora; caso não se liguem, perdem sua atividade. Estes fragmentos podem exercer várias funções, como por exemplo, opsonização, que facilita a fagocitose de antígenos; estimular respostas imunes humorais; quimiotaxia de células imunológicas para o sítio da doença; estimular a liberação de citocinas e histamina; remoção de imunocomplexos da circulação e lise de células, bactérias e vírus (SPETH et al., 2008).

O sistema complemento parece fazer parte da imunidade inata dos animais há longo tempo, tendo sido descrito na maioria dos grupos mais antigos de vertebrados (MATSUSHITA et al., 2004) e em alguns invertebrados (NONAKA & YOSHIKAZI, 2004; SUNYER et al., 1998). Experiências realizadas a partir da purificação de moléculas de MBL-símile (lectina ligante de manose) e clonagem de genes de fator B e componente C3, de animais invertebrados, como *Halocynthia roretzi*, sugerem que o complemento é um mecanismo muito antigo, com cerca de 600-700 milhões de anos, e que teria surgido antes da imunidade adquirida (PINTO et al., 2007; FUJITA, 2002).

A maioria dos componentes do sistema complemento humano - C1r/C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, MBL, MASPs e Fator B - é produzida por hepatócitos.

Moléculas reguladoras do sistema, como C4bBP, Fatores I e H, MAp19 e C1INH também são produzidas no fígado. Outros componentes solúveis do sistema são produzidos por células epiteliais e monócitos. Algumas moléculas reguladoras, que estão presentes em membranas celulares, são produzidas pelas próprias células em todos os tecidos (QIN & GAO, 2006).

Trabalhos recentes citam que o complemento pode estar envolvido na remoção dos restos de células apoptóticas por macrófagos. Os macrófagos têm receptores que se ligam a componentes do complemento, como C1q, MBL e pentraxinas (SAP, CRP e PTX3) os quais são capazes de se ligar às células apoptóticas (TROUW, BLOM & GASQUE, 2008; NAUTA et al., 2003). O mecanismo pelo qual ocorre esta ligação ainda não foi elucidado, contudo estudos recentes demonstram que esta ligação somente ocorre nos estágios finais da apoptose, bem depois do *flip flop* da membrana e exposição de nucleossomos (TROUW et al., 2007). A ligação dessas proteínas a receptores de complemento, CR1 e cC1qR, em macrófagos demonstra que as células apoptóticas opsonizadas são removidas por fagocitose (LU et al., 2008; GHIRAN et al., 2002).

A ativação *in vivo* do complemento, relacionada com doenças fúngicas, já vem sendo estudada desde 1976, quando Sohnle et al. observaram a presença de fragmentos de C3 em amostras histológicas de lesão cutânea causadas por *Candida albicans*. A importância do sistema complemento intacto tem sido demonstrada com estudos de doenças fúngicas em animais com deficiência de complemento. Foi demonstrado que camundongos deficientes de C5, infectados com *Cryptococcus neoformans*, eram mais susceptíveis que animais hígidos (LOVCHIK & LIPSCOMB, 1993; RHODES, 1985). Os mesmos resultados foram também observados com camundongos deficientes de C5 e infectados com *Candida albicans* (LYON,

HECTOR & DOMER, 1986). A importância do complemento em doenças de camundongos com criptococose (DIAMOND et al. 1973), candidíase (GELFAND et al. 1978), paracoccidiodomicose (CALICH et al., 1979) foi demonstrada tratando-se camundongos com o fator de veneno de cobra, que depleta C3. Conforme demonstrado, depleção experimental de fatores do complemento pelo fator de veneno de cobra, tornou os animais mais susceptíveis às doenças por estes fungos.

Esta diminuição da resistência também é verificada quando a doença é bacteriana. Estudos realizados com camundongos deficientes dos componentes C3 e C4 mostraram que os animais deficientes possuíam susceptibilidade aumentada a doenças por bactérias extracelulares (BARRINGTON et al., 2001).

Além da maior susceptibilidade a microrganismos, as deficiências de complemento podem ter como consequência doenças autoimunes. A deficiência de C1q está diretamente relacionada ao lúpus eritematoso sistêmico (LU et al., 2008) e a deficiência de C1INH, o inibidor de C1, está associado ao angioedema hereditário (BLANCH et al., 2006).

Já foi demonstrado que vários fungos patogênicos, responsáveis por doenças como aspergilose, criptococose, candidíase, paracoccidiodomicose, blastomicose e histoplasmose, são capazes de ativar o sistema complemento (SPETH et al., 2008; SPETH et al., 2004). A maioria desses fungos possui a capacidade de ativar a via alternativa do complemento, levando à deposição lenta de fragmentos de C3 na superfície celular que se torna mais intensa quando a ativação passa a ocorrer também pela via clássica através de anticorpos específicos para o antígeno (KOZEL et al., 1998).

3.1. Nomenclatura

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1968) a nomenclatura do complemento deve ser da seguinte forma: usar a letra C seguida por números para os componentes C1 a C9; letras maiúsculas para os fatores, como por exemplo: Fator \overline{D} e Fator B; ou por nomes comuns, como properdina. Os peptídios formados após clivagem são designados pelo nome do componente de onde provém, seguido de letras minúsculas (C3a, C3b). A atividade enzimática dos componentes individuais ou complexos é representada com um traço horizontal sobre eles (Fator \overline{D} , $\overline{C3bBb}$, $\overline{C4bC2b}$).

Normalmente, o fragmento maior fica preso ao ativador, em local próximo ao sítio de ativação, enquanto os fragmentos menores ficam no fluído, podendo iniciar respostas inflamatórias e/ou exercer quimiotaxia.

Três vias de ativação do complemento (Fig.4) são conhecidas: vias clássica, alternativa e das lectinas (FUJITA, 2002).

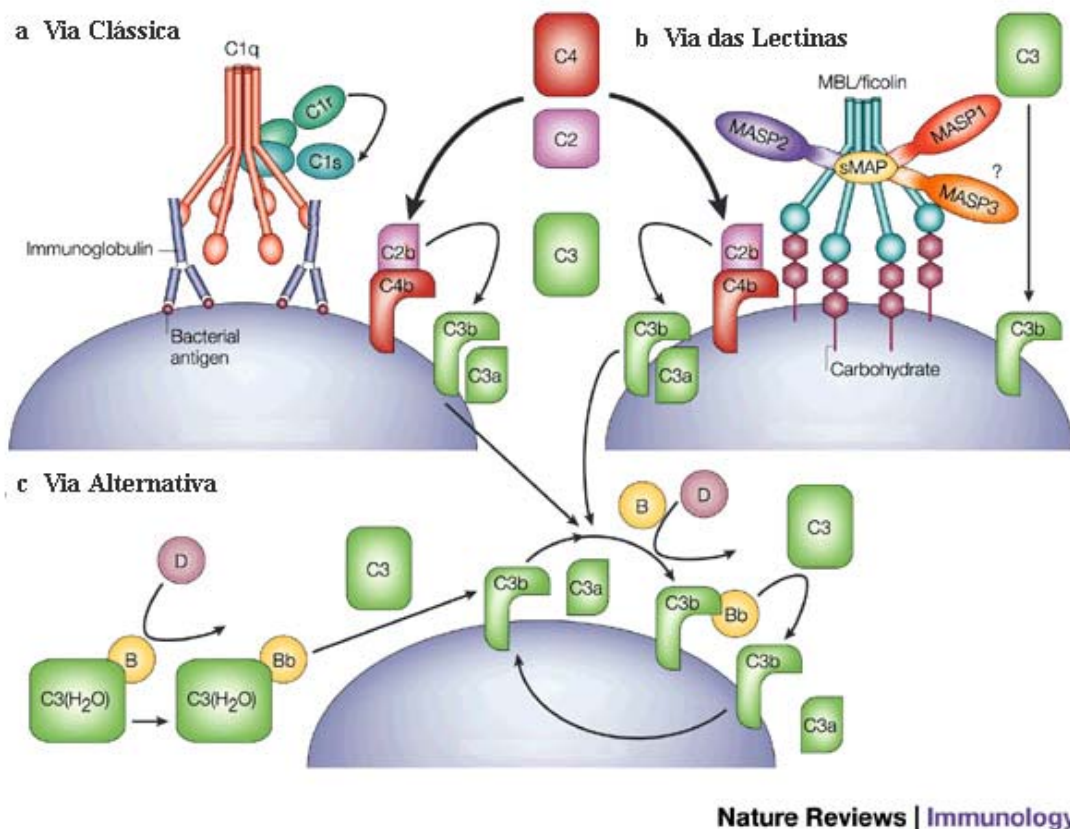


Figura 4. Vias de ativação do sistema complemento (FUJITA, 2002).

3.2. Via Clássica

A via clássica de ativação do complemento se inicia normalmente pela ligação do componente C1 ao complexo antígeno-anticorpo (AgAc). A ativação pela via clássica pode ocorrer também através da ligação direta de C1q a estruturas presentes na partícula ativadora, como por exemplo, na gp120 do envelope de Retrovírus como o HIV (SUSAL et al., 1996) ou açúcares existentes na estrutura da parede de algumas bactérias Gram-negativas, como a *Legionella pneumophila* (LOOS et al., 1974; MINTZ et al., 1992). O C1q pode ligar-se também a proteínas de fase aguda, como a Proteína C-reativa (SZALAI, 2002), associadas à partícula ativadora.

Duas moléculas de IgG (das subclasses IgG₃, IgG₁ e IgG₂), ligadas próximas uma da outra ou uma molécula de IgM, podem ativar o primeiro componente (C1) do sistema complemento. O C1 é um complexo macromolecular composto de uma molécula de C1q, duas moléculas de C1r e duas de C1s. Estas sub-unidades são mantidas juntas por íons Ca²⁺. Pelo menos duas porções globulares de C1q se ligam aos domínios C_H2 da IgG ou C_H3 da IgM, resultando na clivagem e ativação de C1r. $\overline{C1r}$ cliva então o componente C1s que passa a ter atividade enzimática de serina esterase (COOPER, 1985; SCHULTZ & ARNOLD, 1981). $\overline{C1s}$ pode atuar sobre os componentes C2 e C4. O $\overline{C1s}$ cliva a molécula de C4 em dois fragmentos, C4a e C4b que têm, respectivamente, atividades de anafilatoxina e opsonina. A clivagem de C4 expõe uma ligação tioéster altamente reativa, em uma de suas três cadeias (α , β e γ): a cadeia α . Essa ligação tioéster possibilita a ligação covalente do C4b com hidroxilas ou aminas presentes nas estruturas superficiais do antígeno. O componente C2 se liga ao C4b, via íons Mg²⁺, tornando-se susceptível à clivagem por $\overline{C1s}$. A clivagem de C2 libera C2a (cinina) para o fluido e C2b, o fragmento maior que se liga à superfície da partícula via C4b. O complexo resultante $\overline{C4bC2b}$ possui atividade de C3 convertase (OGLESBY et al., 1988). Essa enzima vai atuar sobre o componente C3, podendo gerar mais de 200 moléculas de C3b, com atividade de opsonina, resultando em intensa amplificação da ativação nessa etapa da cascata. O C3b se liga covalentemente ao antígeno pelo mesmo mecanismo que o C4b (VOLANAKIS, 1989). O fragmento C3a, com atividade de anafilatoxina, é liberado para o fluido. A ligação do C3b ao complexo $\overline{C4bC2b}$ forma uma C5 convertase ($\overline{C4bC2bC3b}$), que cliva o C5 em C5a (anafilatoxina) e C5b (JOINER, 1988), este último fragmento

inicia o complexo de ataque à membrana (MAC – do inglês *membrane attack complex*).

Os peptídios C2a, C3a, C4a e C5a, formados durante o processo de ativação, são mediadores inflamatórios locais (KOHL, 2001; CHOLIN et al., 1989).

A fase efetora da cascata do complemento se inicia quando C5 é clivado pelas C5 convertases de qualquer uma das vias de ativação do complemento. O C5b liberado, após a ação da C5 convertase, se liga à superfície da célula alvo. O C5b pode ser rapidamente inativado, a não ser que seja estabilizado pelo componente C6 e a seguir ligado ao C7 (HANSCH et al., 1981). Este novo complexo formado (C5bC6C7) adquire uma nova conformação, onde suas regiões hidrofóbicas são expostas e permitem sua ligação a fosfolipídios da membrana celular. Ocorre então a inserção do complexo na bicamada lipídica. Com a ligação de C8 ao complexo C5bC6C7 um novo sítio hidrofóbico reativo que permite a inserção de C8 na membrana plasmática, o que inicia a polimerização de moléculas de C9 (perforina-símile) ao redor do complexo C5bC6C7C8. Este processo cria um poro transmembranar, de forma tubular (diâmetro de 70-100Å) chamado de complexo de ataque à membrana ou MAC (BHAKDI & TRANUM-JENSEN, 1991; ESSER, 1991).

A formação deste poro favorece a livre passagem de íons e moléculas pequenas, causando desequilíbrio eletrolítico e osmótico e consequente lise celular.

3.3. Via Alternativa

PILLEMER e cols. em 1954 descreveu o sistema properdina, que estava relacionado com ativação do complemento independentemente da formação de AgAc.

Na década de 70, esse mecanismo de ativação do complemento foi melhor compreendido, com a utilização do soro de uma linhagem de cobaias deficiente do componente C4 (FRANK et al., 1971). Esse processo de ativação funciona como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos extracelulares, antes de a resposta adaptativa ser iniciada (KOZEL, 1998). Os componentes do complemento envolvidos nessa via são: C3, C5-C9, Fator B e Fator \bar{D} , com ou sem a participação de Properdina.

O componente C3 após hidrólise espontânea da ligação tio-éster adquire uma nova conformação, denominada C3(H₂O). Essa reação hidrolítica ocorre continuamente no organismo, mas em taxas muito baixas. O C3(H₂O) formado pode continuar momentaneamente no fluido ou ligar-se à superfície da partícula ativadora. Na presença de íons magnésio, o C3(H₂O) pode se ligar ao fator B. Esta ligação leva à exposição de um sítio reativo neste componente, permitindo a ação proteolítica do fator \bar{D} , uma serina protease plasmática. A ação do fator \bar{D} libera um pequeno fragmento, Ba, para o fluido e um fragmento maior que permanece ligado ao C3(H₂O), resultando no complexo $\overline{C3(H_2O)Bb}$ que possui atividade de C3 convertase (HOLERS & THURMAN, 2004). A ligação de Properdina a esse complexo estabiliza sua atividade de C3 convertase (MULLER-EBERHARD, 1988).

A clivagem de C3 por essa C3 convertase resulta nos fragmentos C3a e C3b. Fragmentos C3b podem ligar-se à superfície ativadora. O fator B pode ligar-se via Mg²⁺ a esses fragmentos e sofrer ação do fator \bar{D} , o que resulta na formação do complexo $\overline{C3bBb}$ que também é uma C3 convertase da via alternativa. Novas moléculas de C3 são clivadas e alguns fragmentos C3b podem se ligar ao complexo

$\overline{C3bBb}$ resultando em um complexo maior, $\overline{C3bBbC3b}$, com atividade de C5 convertase (GOTZE & MULLER-EBERHARD, 1976).

A C5 convertase vai atuar sobre as moléculas de C5, liberando os fragmentos C5a e C5b. Este último é o iniciador do complexo de ataque à membrana (MAC), referido acima.

Em 2007, foi descoberta a ligação de properdina diretamente à superfície de microrganismos, fornecendo uma plataforma para a montagem da C3 convertase da via alternativa. Também foi verificado que esta ligação influencia diretamente na velocidade da deposição de fragmentos de C3b. Isto demonstra que a via alternativa pode ocorrer pela hidrólise espontânea do C3 e ser facilitada pela presença de properdina ligada à superfície de antígenos (SPITZER et al., 2007).

3.4. Via das Lectinas

Recentemente, foi descrito que lectinas como a MBL (que liga-se à D-manose, N-acetil-glicosamina ou glicose) e ficolinas (ligantes de N-acetil-glicosamina) são constituintes importantes do sistema imunológico inato (ENDO, TAKAHASHI & FUJITA, 2006). Essas proteínas são capazes de iniciar a ativação do sistema complemento (DEGN, THIEL & JENSENIUS, 2007; DUMESTRE-PERARD et al., 2002).

A MBL faz parte de um complexo protéico que possui estrutura e função semelhantes as do C1q. Esse complexo é constituído da MBL e MASPs 1, 2 e 3 (três serina proteases associadas à MBL). Após sua ligação à superfície do patógeno via MBL, ocorre a ativação das MASPs. MASP-1 pode clivar C3 (ROSSI et al., 2001) e MASP-2 cliva C4 e C2 (atuam como $\overline{C1s}$) dando prosseguimento à cascata de

ativação do complemento (GADJEVA et al., 2004; THIEL et al., 2002). Ficolinas comportam-se como a MBL e podem também se associar a MASPs (MATSUSHITA & FUJITA, 2001).

Uma molécula conhecida como MAp19 compete com as MASPs pela ligação à MBL e ficolina, sugerido-se que tenha papel regulador nessa via (IWAKI & FUJITA, 2005). O papel da MASP-3 ainda não foi elucidado.

A MBL pode ainda atuar diretamente como opsonina, quando é reconhecida pelo CR1, um receptor celular que reconhece fragmentos do complemento (GULATI et al., 2002).

Esta via também não depende da presença de anticorpo para sua ativação, mas apresenta um mecanismo de ação similar ao da via clássica, já que utiliza C4 e C2 para dar prosseguimento à cascata do complemento, produzindo C3 e C5 convertases.

Estudos recentes sugerem que outros processos podem iniciar a ativação do sistema complemento. Há pouco tempo foi descoberta uma nova ponte na via das lectinas. Foi verificada a deposição de C3b na superfície de diferentes espécies de *Salmonella* pela via das lectinas na ausência de C2, C4 ou MASP-1 (SELANDER et al., 2006). Teoricamente esta via seria utilizada em casos de deficiência de tais componentes, como mais uma forma de garantir a defesa do hospedeiro (ATKINSON & FRANK, 2006).

Além das vias acima referidas, foi recentemente descrito um processo envolvendo a produção de C5a a partir de C5, sem a presença de C3. A liberação do C5a foi atribuída à ação da trombina, componente da cascata da coagulação, atuando de forma conjunta com a cascata do complemento. A produção aumentada de

trombina em animais deficientes de C3, compensaria a falta de C5 convertases, ausentes nesses animais (HUBER-LANG et al., 2006).

3.5. Fragmentos e receptores do complemento

Os componentes do complemento produzidos e liberados no processo de ativação, não participantes da formação do MAC, possuem importância significativa para amplificar a resposta imunológica contra o microrganismo invasor.

Os componentes opsonizantes, C3b e C4b, são reconhecidos por um receptor de membrana de fagócitos (CR1 ou CD35), levando à fagocitose de microrganismos cobertos com estes componentes (FEARON & AHEARN, 1990). Estudos com bactérias (*Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*) e complemento mostraram que a opsonina predominante na superfície destes patógenos é o C3b, facilitando a fagocitose pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos (NEWMAN & MIKUS, 1985). Produtos oriundos da degradação do C3b podem ser reconhecidos por outros receptores celulares: CR2 (CD21) que está presente na superfície de linfoblastos, linfócitos B, algumas células T, células foliculares dendríticas e astrócitos, reconhecem C3dg e C3d; CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18) presentes em macrófagos, células NK e astrócitos e neutrófilos, reconhecem iC3b (GASQUE, 2004; ROSEN & LAW, 1990, AHEARN & FEARON, 1989).

Alguns fragmentos gerados pela ativação do complemento são anafilatoxinas, C3a, C4a e C5a. Estes fragmentos acarretam a desgranulação de mastócitos e basófilos através da ligação aos receptores C3aR, C4aR e C5aR, resultando na

liberação de histamina e outras substâncias vasoativas. Os fragmentos C3a, C4a e C5a também causam a contração da musculatura lisa. O C5a tem ainda as funções de promover a desgranulação de eosinófilos, a agregação de plaquetas e atua na quimiotaxia de leucócitos, induzindo sua migração segundo um gradiente de concentração em direção ao local onde foi gerado (KOHL, 2001). O fragmento C2a é uma cinina, envolvida nos processos inflamatórios, por promover alteração da permeabilidade vascular, vasodilatação e hipotensão (CHOLIN et al., 1989).

Há pouco tempo foi descoberto outro papel para o C3a, semelhante ao papel antibacteriano das defensinas. Esta ação parece ter efeito sobre bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*) e Gram negativas, (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). Seu mecanismo de ação independe de suas propriedades quimiotáticas já que essa atividade permanece quando há a retirada da arginina terminal do C3a (MALMSTEN & SCHMIDTCHEN, 2007), que é importante para o processo de quimiotaxia.

3.6. Regulação do Sistema Complemento

O sistema complemento participa do processo de defesa do hospedeiro atuando sobre os microrganismos invasores e causando inflamação tecidual. Para tanto ele deve discriminar entre constituintes próprios ígidos ou alterados e padrões moleculares microbianos. Por outro lado, há proteínas que se comportam como reguladores negativos, inibindo a atividade de determinados componentes do complemento. Assim, as células ígidos são preservadas da ação do complemento homólogo. Entretanto, o sistema pode detectar e eliminar constituintes próprios alterados, como os das células apoptóticas (AHMAD et al., 2007).

A ativação de C1 é controlada por uma proteína plasmática, C1 inibidor (C1INH), que reconhece o $\overline{C1r}$ e $\overline{C1s}$ ativados, limitando o tempo em que $\overline{C1s}$ ativo é capaz de clivar C4 e C2 (BOS, HACK & ABRAHAMS, 2002).

A reação catalisada pela C3 convertase é a etapa principal para amplificação da ativação do complemento, através da geração de C3b. Este fragmento além de se fixar ao microrganismo, pode também se ligar a células vizinhas, possibilitando a ação do complemento sobre células hígdos. Isto raramente ocorre devido à hidrólise da ligação tio-éster do C3b, resultado em C3b inativo (C3bi). Existe ainda, uma série de proteínas que fazem a regulação da C3 convertase. Essas moléculas reguladoras do sistema complemento são codificadas, em seres humanos, em uma única região do cromossoma 1, conhecida como RCA (do inglês – *regulators of the complement system*), como descrito por RODRIGUEZ DE CORDOBA, DIAZ-GUILLEN e HEINE-SUNER (1999). Dentre estas proteínas estão a proteína ligante de C4b (C4bBP – do inglês *C4b binding protein*) e o Fator H. Essas proteínas solúveis se ligam, respectivamente, ao C4b e ao C3b, funcionando como co-fatores para uma outra proteína reguladora chamada Fator I (também codificada na região RCA). O Fator I tem ação de serina esterase. Junto a C4bBP, este fator cliva o C4b em C4c (solúvel) e C4d o qual permanece ligado ao acceptor. Na presença do Fator H, o Fator I cliva inicialmente o C3b a iC3b (que permanece ligado ao acceptor e ainda com função opsonizante) e C3f (que é solúvel). O iC3b remanescente é clivado ainda a C3c (solúvel) e C3d (que permanece ligado), pelo Fator I. A ação do Fator H é favorecida pela presença de ácido siálico e outros poliânions normalmente presentes na superfície de várias células do hospedeiro (MERI & PANGBURN, 1990). O C3b e C4b, depois de sofrer ação do Fator I, perdem a capacidade de dar continuidade à

cascata do complemento e formar novas convertases. A presença de ácido siálico impede também a ligação de MBL a células do hospedeiro (GADJEVA et al., 2001).

O Fator J é outro exemplo de proteína reguladora. Essa proteína pode interferir na via clássica inibindo a formação do complexo C1 ou na via alternativa inibindo a clivagem de C3 pela C3 convertase (GONZALEZ-RUBIO et al., 1996).

As anafilatoxinas (C3a, C4a, C5a) podem se ligar aos mastócitos e/ou basófilos causando sua desgranulação e liberação de mediadores inflamatórios que, em excesso, causam sérios danos ao organismo. Essas anafilatoxinas são reguladas por duas enzimas presentes no soro (carboxipeptidases N e R) que clivam a arginina terminal presente nestes peptídios, impedindo sua ligação aos receptores das células responsáveis pelo processo inflamatório (CAMPBELL et al., 2002).

Várias proteínas de membrana celular também atuam no controle da ativação do complemento. A proteína co-fator de membrana (MCP ou CD46) e o receptor do complemento tipo 1 (CR1) servem como co-fatores para clivagem de iC3b/C3b/C4b pelo Fator I. O fator de aceleração de dissociação (DAF – do inglês *decay accelerating factor* ou CD55) é uma glicoproteína ancorada em membranas que dissocia as C3 convertases das vias clássica e alternativa, liberando C2b e Bb (LINDAHL, SJOBRING & JOHANSSON, 2000).

A proteína S (vitronectina), presente no plasma, liga-se ao complexo C5bC6C7 no fluido, impedindo a inserção desse complexo nas membranas biológicas, que poderiam sofrer danos ao combinar-se com os componentes terminais C8 e C9. A clusterina (SP-40,40), outra proteína plasmática, tem função semelhante a da proteína S (LISZEWSKI et al., 1996; DAVIES, 1996).

Duas outras proteínas, presentes em várias células do hospedeiro, são capazes de evitar a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). O fator de restrição

homóloga (HRF) e o inibidor de lise reativa da membrana (CD59) inibem a formação do MAC ao ligarem-se ao C8, impedindo a polimerização do C9 e sua inserção na membrana (LISZEWSKI et al., 1996; DAVIES, 1996).

A proteína C-reativa (CRP) reconhece diversas estruturas polissacarídicas de bactérias e fungos e fosfolipídios (fosfatidilcolina e esfingomielina) de células lesadas do hospedeiro. A ligação dessa proteína ao C1 inicia a ativação da via clássica. O Fator H, um regulador da via alternativa do complemento, pode associar-se a CRP, diminuindo a formação do MAC (GIANNAKIS et al., 2001).

4. Sistema Complemento x Fungos

A capacidade da parede dos fungos de comportar-se como partícula ativadora, é conhecida desde longa data. PILLEMER et al. (1954) e FIZPATRICK e DICARLO (1964) usaram um polissacarídeo (zimosan) da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* para estudar a ativação do sistema complemento. Desde então tem sido demonstrado que outros fungos também são capazes de ativar o sistema (SPETH, 2008; KOZEL, 1998).

Utilizando soro de pessoas híidas, tem sido demonstrado que conídios de *Aspergillus* ativam principalmente a via alternativa do complemento. Quando as experiências de ativação são feitas com hifas, nota-se o aumento da participação da via clássica, provavelmente pela presença de anticorpos naturais (KOZEL et al., 1989). A MBL pode reconhecer padrões moleculares na superfície de *Aspergillus* e levar à ativação do complemento, com conseqüente deposição de C4b, indicando ativação pela via das lectinas (ROSAS et al., 2002).

Experiências de ativação do complemento do soro normal por *C. albicans*, que é um fungo leveduriforme, mostram sua capacidade de ativar o sistema diretamente pela via alternativa. Entretanto, a deposição dos fragmentos de C3 na superfície do fungo é lenta. Na presença de anticorpos, o processo de deposição é mais rápido devido à ativação da via clássica (ZHANG & KOZEL, 1998; KOZEL et al., 1996).

Tem sido demonstrado que a parede de *Candida* sp. contém manoproteínas, o que favorece a ligação de MBL, e consequente deposição de C3 devido à ativação da via das lectinas (LILLEGARD et al., 2006; IP & LAU, 2004).

No caso particular da *Candida albicans*, foi mostrado que o fragmento C3a tem atividade microbicida sobre este fungo, no entanto seu mecanismo ainda não foi elucidado (SONESSON et al., 2007).

O *C. neoformans*, ativa o complemento principalmente pela via alternativa. A forma encapsulada é capaz de ligar 10 vezes mais moléculas de C3b que a forma acapsulada (YOUNG & KOZEL, 1993). A deposição de C3b nas formas encapsuladas se dá na camada mais externa da cápsula, permitindo seu reconhecimento por células fagocíticas (GATES & KOZEL, 2006). A presença desses fragmentos ligados à cápsula favoreceria a defesa do hospedeiro, visto que tem sido demonstrado que a glucuronoxilomana presente na cápsula, tem propriedades antifagocíticas (KELLY et al., 2005).

A ativação do complemento pode contribuir para a infectividade e/ou evasão desses microrganismos dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Esses fenômenos dependem fundamentalmente de suas estruturas de superfície.

Aspergillus sp. podem ligar-se a reguladores do sistema complemento do hospedeiro, como por exemplo, o fator H e C4bBP (VOGL et al., 2008), impedindo a ativação plena do sistema. HENWICK et al. (1993) evidenciaram que *A. fumigatus* e

A. flavus, espécies altamente patogênicas para o homem, apresentam menos moléculas de C3b ligadas após ativação do complemento quando comparadas com outras espécies menos patogênicas. C3b é uma importante opsonina e a diminuição deste fragmento na superfície do fungo influencia na eliminação desse agente patogênico via fagocitose. Além disso, a presença de uma enzima proteolítica que cliva C3b a iC3b, secretada por *A. fumigatus* contribui para a interrupção da cascata de ativação (STURTEVANT & LATGE, 1992; WASHBURN et al., 1990).

C. albicans libera manoproteínas da parede para o meio ambiente. Essas glicoproteínas, ao se ligarem aos componentes do complemento no fluido, impedem sua ativação junto à parede do microrganismo (DIAMOND et al., 1980). Esse fungo secreta também uma protease capaz de degradar o componente C3 (KAMINISHI et al., 1995).

Conforme referido acima, o *C. neoformans* apresenta glucuronoxilomanana na cápsula. Este polissacarídeo pode ser liberado em grandes quantidades para o meio exterior e ligar-se a receptores celulares (CR3 e CR4), o que dificultaria a fagocitose via iC3b (DONG & MURPHY, 1997). Esse polissacarídeo é capaz também de inibir a expressão de C5aR em neutrófilos, influenciando negativamente na quimiotaxia destas células e assim evadindo-se das defesas do hospedeiro (MONARI et al., 2002).

Outra evidência de que estruturas de superfície têm grande importância na interação com o sistema complemento é o fato de vários microrganismos apresentarem estruturas que mimetizam a superfície de células do hospedeiro, ou seja, com baixa capacidade de ativação do sistema complemento. Como citado anteriormente, a presença de ácido siálico e outros poliânions na superfície celular de microrganismos pode favorecer a ligação de fator H ao C3b (GIANNAKIS et al., 2001). É possível que isto ocorra com os fungos, já que foi constatado que várias

espécies, como *Fonsecaea pedrosoi*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, apresentam ácido siálico em sua superfície celular (ALVIANO, TRAVASSOS & SCHAUER, 1999).

No caso dos zigomicetos, há poucos relatos na literatura sobre a ação do sistema complemento sobre esses fungos. O trabalho de MARX, FORSYTH e HENTZ (1982) demonstrou que a quimiotaxia para neutrófilos aumentava após tratamento de zigomicetos (*A. corymbifera*, *R. arrhizus*, *R. rhizopodiformis*, *Rhizomucor pusillus*) com soro normal. Em presença de soro inativado, esse efeito era abolido.

Recentemente, nosso grupo demonstrou a baixa capacidade de ativação do sistema complemento humano *in vitro* pelo micélio de *M. polymorphosporus*. Essa característica se mantinha mesmo após tratamento com sialidase e glucuronidase, indicando que estes açúcares aniônicos não são responsáveis por essa baixa ativação (GRANJA et al., 2008).

Contexto e Motivação

Conforme citado anteriormente, o número de casos de mucormicose vem aumentando ano após ano. Esse fato pode ser decorrente do número crescente de indivíduos com alguma forma de imunossupressão, como em neoplasias e o controle da rejeição de enxertos. Outro problema é o emprego de antifúngicos de amplo espectro (voriconazol) para o tratamento de aspergiloses, candidíases e criptococoses, mas que são ineficazes sobre mucormicoses. Apesar de ser uma doença oportunista, o índice de mortalidade para a maioria das formas desta doença ultrapassa 60% dos casos (CHAYAKULKEEREE, GHANNOUM & PERFECT, 2006).

A partir da década 90, a mucormicose subiu no rol das principais doenças fúngicas invasivas, chegando à terceira colocação. Não obstante, pouco é conhecido sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro contra esta doença (PRABHU & PATEL, 2004). Entretanto, como o sistema complemento tem papel essencial no controle das doenças por microrganismos extracelulares e pouco se conhece sobre a ação desse sistema no controle de doenças por zigomicetos.

A partir de 1997, uma cooperação entre os laboratórios de Imunoquímica II e de Estrutura de Superfície de Microorganismos foi estreitada visando o estudo da interação de fungos com o sistema complemento. Desde então duas monografias e duas teses de mestrado foram desenvolvidas neste tema. Minha monografia de conclusão da graduação foi desenvolvida com o estudo da ativação do sistema complemento humano com o micélio de *M. polymorphosporus* (Granja, 2003). Em 2004, auxiliei na tese de mestrado envolvida com a ativação do sistema complemento por melanina de *F. pedrosoi* (Pinto, 2004). Durante meu mestrado, aprofundei o estudo do complemento com *M. polymorphosporus* utilizando as formas de esporo e

levedura, além do micélio. Verifiquei ainda a influência da remoção de ácido siálico e ácido glucurônico, pelo uso de sialidase e glucuronidase, nessa ativação (Granja, 2005). Com esse conteúdo alcançado durante essas etapas foi possível desenvolver a tese de doutorado, verificando a ação do complemento sobre algumas espécies do gênero *Mucor*: *M. circinelloides*, *M. ramosissimus* e *M. polymorphosporus*, que são agentes da mucormicose.

Diversos casos de mucormicose foram associados a *M. circinelloides*. Os três mais recentemente descritos foram: dois casos de doença cutânea (Iwen et al., 2007; CHANDRA & WOODGYER, 2002) e um de mucormicose sistêmica (CHAN-TACK, NEMOY & PERENCEVICH, 2005).

Na literatura encontramos três casos de mucormicose causadas por *M. ramosissimus*. O primeiro foi em 1964 quando esse fungo foi associado a um caso de mucormicose rinocerebral (VIGNALE et al., 1964). O segundo caso, uma doença mucocutânea (BULLOCK et al., 1974). Finalmente, o caso mais recente foi de uma doença cutânea (WEITZMAN et al., 1993). Em 2007, Quesada et al. relataram a associação dessa espécie à perda de penas e dermatite em canários (*Serinus canarius*), indicando que esta espécie tem importância médica e veterinária.

A cepa de *M. polymorphosporus*, referida neste trabalho, foi isolada de biópsia de apêndice de um paciente hospitalizado no Estado de Pernambuco.

Com o objetivo de relacionar a ativação do complemento e capacidade de causar a mucormicose, incluímos no estudo o *M. plumbeus*, sobre o qual não há relatos clínicos de envolvimento nessa doença. Esta espécie é utilizada na biotransformação de produtos naturais, como: jhanol (Fraga et al., 1998), teideadiol (Fraga et al., 2003), maalióxido (Wang et al., 2006) e ácido mulin-11,13-dien-20-óico (Areche et al., 2008).

Objetivos

- Avaliar a ativação do sistema complemento:
 - pelas formas de esporo e micélio de *M. circinelloides*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. polymorphosporus*
 - pelas formas de levedura e esporos em diferenciação de *M. polymorphosporus*
- Comparar os perfis de ativação do sistema complemento por essas espécies.
 - Detecção de fragmentos de C3 e C4 depositados sobre as estruturas de superfície dos fungos.
 - Detecção de IgG, MBL, CRP e fragmentos de C4 para relacionar o envolvimento das diferentes vias de ativação.
 - Detecção de Fator H e C3d, relacionados com processos de regulação da ativação do sistema.
- Verificar indiretamente a presença de melanina nas espécies de *Mucor* usando anticorpo anti-melanina do fungo patogênico *F. pedrosoi*.

Materiais e Métodos

1. Fungos

Os fungos utilizados nestes estudos são:

- *Mucor circinelloides* isolado de amostra clínica. Está registrado sob o número de 0066 no catálogo do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), da Universidade Federal do Pernambuco.
- *Mucor ramosissimus* isolado de folhas de *Alibertia myrcifolia*. Este fungo está registrado sob o número 3087 no catálogo da Coleção de Culturas da Micoteca URM (University of Recife Mycologia) da Universidade Federal do Pernambuco.
- *Mucor polymorphosporus* isolado de uma biópsia de apêndice de um paciente hospitalizado no Estado de Pernambuco. O fungo está registrado sob o número 1044 no catálogo da Coleção de Culturas da Micoteca URM.
- *Mucor plumbeus* isolado de castanhas do Pará e está registrado sob o número 3232 no catálogo da Coleção de Culturas da Micoteca URM.

As amostras dos fungos são mantidas no laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos do Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goes.

2. Cultura das espécies do gênero *Mucor*

2.1. Obtenção de micélio

Cada uma das espécies fúngicas foi inoculada no meio quimicamente definido Czapeck-Dox (CD) pH 6,5 e mantida à temperatura ambiente durante 30 dias com agitação. Após cultivo, as amostras foram filtradas, lavadas com PBS 7.2 e mantidas a -20°C até o momento do uso.

2.2. Obtenção de esporangiosporos

Amostras da suspensão de micélios foram semeadas em placas com meio ágar Sabouraud-dextrose e mantidas durante 5 dias à temperatura ambiente. A suspensão dos esporos em salina (NaCl 0,85%) foi obtida por raspagem da cultura (MARX, FORSYTH & HENTZ, 1982). Os esporos foram lavados com PBS 7.2 e mantidos a -20°C. Para experiências de ativação, o número foi determinado por contagem em câmara de Neubauer.

2.3. Obtenção de leveduras de *M. polymorphosporus*

Amostras de micélio do fungo *M. polymorphosporus* foram semeadas em placas com meio ágar Sabouraud-dextrose e incubadas em jarras GasPaK sob atmosfera de 30% de CO₂, durante 48 horas a 37°C (COOPER, 1987). As leveduras foram lavados com PBS 7.2 e mantidas a -20°C. O número de leveduras foi determinado conforme referido acima.

2.4. Obtenção de esporos em diferenciação de *M. polymorphosporus*

Esporos do *M. polymorphosporus* foram distribuídos em tubos de ensaio (10⁸ células/ml de PBS 7.2), sob condições de assepsia, e colocados a 4°C. Após 1, 9 ou 18 dias de incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo e utilizados a seguir nas experiências de ativação do complemento.

Amostras do tubo original de distribuição foram conservadas a -20°C e consideradas como tempo zero da diferenciação.

3. Soros humanos (Fonte do complemento)

Mistura de soros humanos de indivíduos hígidos (SHN), obtidos após punção venosa de doadores voluntários saudáveis, após prévio consentimento, foi utilizada como fonte de complemento. Essas amostras foram previamente absorvidas com fungos e/ou eritrócitos de carneiro, conforme descrito abaixo.

3.1. Absorção do Soro Humano com Micélio

A mistura dos soros foi absorvida uma vez com aproximadamente 100mg (peso úmido) de micélio de cada espécie do gênero *Mucor*. A absorção foi realizada a 4°C por 30 minutos, com agitação esporádica. A seguir o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos, a $1400 \times g$. O sobrenadante (soro absorvido) foi coletado e submetido à absorção com eritrócitos de carneiro.

3.2. Absorção do Soro Humano com Eritrócitos de Carneiro (EC)

O soro previamente absorvido com o fungo foi adicionado a eritrócitos de carneiro sedimentados (na proporção de 10^9 células por 1 ml de soro) e mantido a 4°C por 30 minutos, com agitação esporádica. Após absorção, a amostra foi centrifugada e o soro resubmetido duas vezes ao mesmo tratamento.

Uma aliquota da mistura de soros hígidos foi absorvida apenas com eritrócitos de carneiro (10^9 células/ml) nessas mesmas condições.

Após as absorções, as amostras de soro foram aliqüotadas e conservadas a -80°C até o momento do uso.

4. Ativação do Sistema Complemento

Os estudos da ativação do sistema complemento foram realizados de acordo com LIMA & SILVA (1970) utilizando-se o sistema EA (Eritrócito de carneiro-Anticorpo de coelho anti-eritrócito) como indicador da ação lítica do Complemento.

A ativação do Complemento foi realizada utilizando-se micélio (20mg, peso úmido) e esporos (10^8 esporos) das diferentes espécies do gênero *Mucor*. A ativação por amostras de levedura (10^7 leveduras) e esporos em diferenciação (10^8 células) foi realizada apenas para o *Mucor polymorphosporus*.

Para tanto, as amostras de fungos foram incubadas a 37°C com 1,0 ml de soro diluído a 1/10 em tampão veronal/salina (VBS) contendo gelatina 0,1% e íons Ca^{2+} e Mg^{2+} durante 60 min.

Para quantificação da ativação do Complemento, as misturas de reação foram centrifugadas (a fim de remover os sedimentos) e o teor de Complemento residual foi determinado nos sobrenadantes pela técnica de MAYER (1961). Resumidamente, após diluição do soro a 1/5, alíquotas de 0,1 a 0,8ml foram levadas ao volume final de 2,0 ml com o mesmo tampão de reação. A essas amostras adicionou-se o sistema revelador EA (0,25ml) e incubou-se em banho-maria a 37°C durante 60 min. A leitura do conteúdo de hemoglobina liberada pela ação do Complemento sobre o EA é avaliada pela absorvância a 540nm. A porcentagem de lise é obtida comparando-se os valores de absorvância das amostras do ensaio com absorvância da suspensão de EA em água destilada (100% de lise). Esses dados possibilitam a determinação das unidades de CH_{50} /ml (Complemento capaz de lisar 50% das hemácias) usando a equação de von Krogh (LIMA & SILVA, 1970). Os sedimentos obtidos foram lavados três vezes com PBS 7.2 e mantidos a -20°C.

Como controle positivo foi utilizada uma amostra de 1mg de zimosan (polissacarídeo de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de consumir todo o Complemento principalmente pela via alternativa). O zimosan (Sigma Chemical, Co. St. Louis, MO. EUA) foi preparado de acordo com LIMA e SILVA (1970) antes do uso: zimosan foi suspenso em solução salina (NaCl 0,85%), aquecido em banho-maria a 100°C, por 30 min e lavado duas vezes com PBS 7.2.

Como controle negativo de ativação do Complemento foram utilizadas amostras de soro sem partículas ativadoras.

O sistema revelador ou sistema hemolítico (EA) é preparado da seguinte forma: sangue de carneiro, coletado em solução de Alsever, é centrifugado a 1400 x g, durante 10 minutos em centrífuga clínica (Internacional Clinical Centrifuge). A papa de hemácias é lavada inicialmente com tampão veronal sódico/salina (VBS) adicionado de EDTA 10mM e gelatina a 0,1% e mais 2 vezes com VBS contendo íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e gelatina 0,1%. A suspensão dos eritrócitos é preparada no mesmo tampão, de modo a conter 1×10^9 céls/ml. Ao volume dessa suspensão é adicionado volume igual de hemolisina, previamente titulada (LIMA & SILVA, 1970). A mistura é incubada a 37°C durante 20 min., sob agitação e depois centrifugada durante 5 min. O sedimento é lavado duas vezes com VBS contendo íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e gelatina. A suspensão final de EA utilizada nas dosagens de complemento residual contém 5×10^8 céls/ml.

O estudo das diferentes vias de ativação do Complemento foi efetuado usando-se quelantes dos íons Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} e o sistema hemolítico (EA) de acordo com MAYER (1961). Em resumo, amostras de fungo foram misturadas com 1,0 ml de soro humano, diluído a 1/10 em VBS/gelatina 0,1% contendo íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , conforme referido acima. A duas outras misturas de reação acrescentaram-se 100µl de soluções

contendo quelantes: EDTA 0,1M (ácido etileno diamino tetra acético) ou EGTA 0,1 M (ácido etilenoglicol bis (éter β -amino etil éter) N, N, N', N' tetra acético) contendo $MgCl_2$ 0,1M. Essas misturas foram incubadas em banho-maria a 37°C durante 60 min., com agitação nos primeiros 10 min. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (1400 x g) sob refrigeração (4°C) durante 5 minutos.

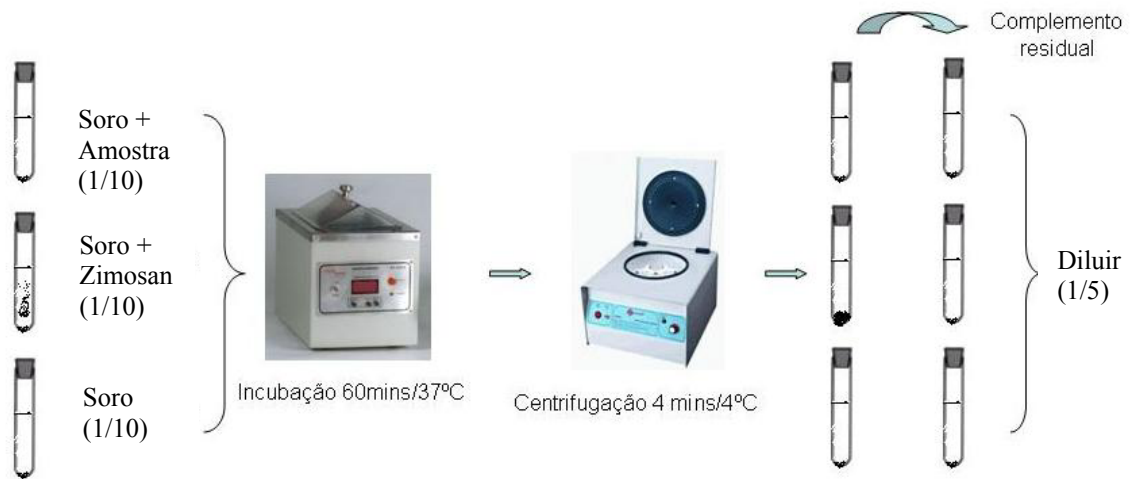
O EDTA é um quelante de íons divalentes, como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , que são importantes para a manutenção da estrutura e, conseqüentemente, da atividade de alguns componentes do Complemento. A remoção destes íons do soro impede a ativação de todas as vias do complemento.

O EGTA age de forma semelhante ao EDTA, entretanto, ele remove preferencialmente os íons Ca^{2+} , impedindo desta forma a manutenção da estrutura do complexo C1 e da MBL-MASPs. A adição deste quelante juntamente com $MgCl_2$ ao soro, leva ao bloqueio das vias clássica e das lectinas e permite a ativação da via alternativa.

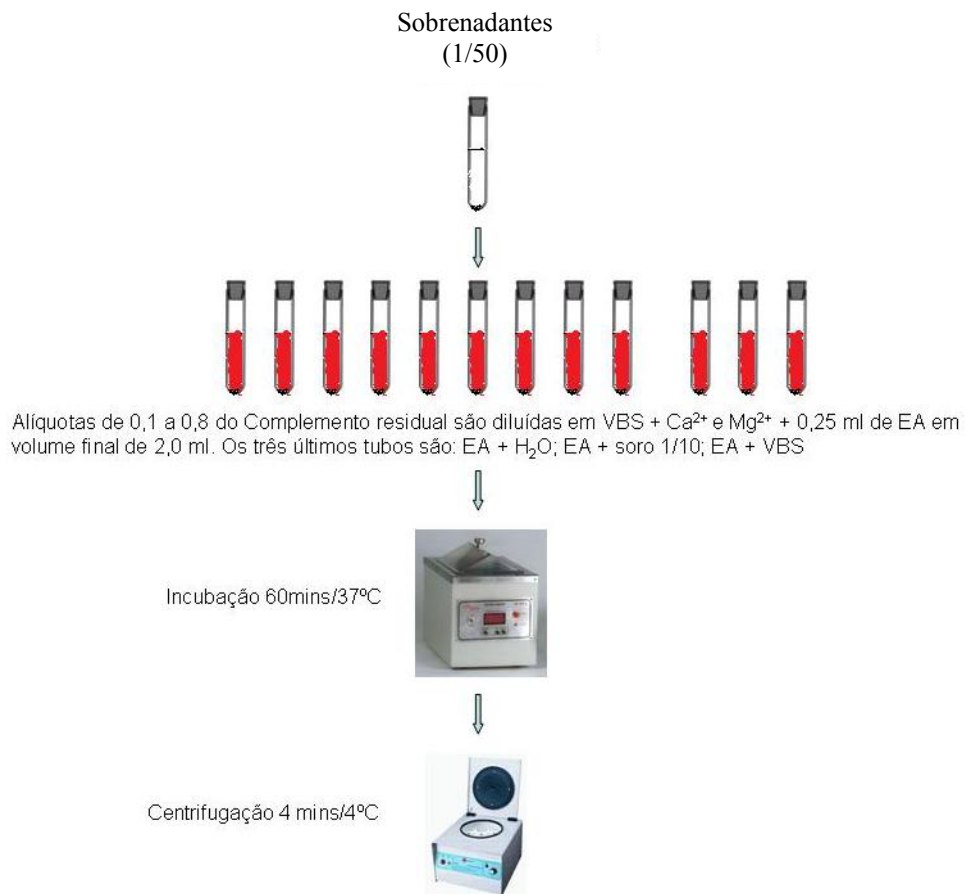
Para verificação da ativação do Complemento, foram utilizados os sobrenadantes das reações diluídos em tampão VBS contendo Ca^{2+} e Mg^{2+} , conforme referido acima. No caso das reações contendo quelantes, os sobrenadantes foram primeiro recalificados com solução de $CaCl_2$ 0,2 M, para que a estrutura e atividade dos componentes do Complemento fossem restauradas.

O esquema abaixo representa o ensaio de ativação do sistema Complemento. A etapa 1 corresponde à ativação do Complemento pelas amostras ensaiadas e os respectivos controles (Zimosan e soro sem ativadores). A etapa 2 representa o procedimento para a quantificação do Complemento residual, proveniente da etapa 1. Nos testes utilizando-se quelantes (EDTA e EGTA), 100 μ l de $CaCl_2$ são adicionados ao Complemento residual a 1/50 no início da etapa 2.

Primeira Etapa:



Segunda Etapa





5. Imunofluorescência

5.1. Detecção de Fragmentos de C3 por Imunofluorescência Direta

Os sedimentos das formas de esporo e levedura das diferentes espécies do gênero *Mucor*, obtidos após ativação do complemento com ou sem quelantes, foram lavados 3 vezes com PBS pH 7.2 e em seguida ressuspensos em 1ml do mesmo tampão. Aliquotas de 10 μ l de fungo e zimosan foram distribuídas em lâminas apropriadas para imunofluorescência. As lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 2 horas e a seguir fixadas pelo calor. Após fixação, as amostras foram tratadas com 10 μ l de anticorpo de coelho anti C3c humano, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (DAKO, Dinamarca) diluído a 1/30 de acordo com as indicações e adicionado de azul de Evans 0,1%.

As lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 60 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS, as lâminas foram secas e montadas com tampão fosfato-glicerina, cobertas com lamínula e observadas ao microscópio de epi-fluorescência (Zeiss, Alemanha).

5.2. Detecção de IgG humana por Imunofluorescência Direta

As amostras de esporo e levedura dos fungos, após ativação do complemento sem a presença de quelantes, foram tratadas conforme referido acima. Os fungos fixados às lâminas foram tratados com 10µl de IgG de cabra anti-IgG humana conjugada com fluoresceína (Sigma Chemical Co., EUA) diluído 1/50 de acordo com as indicações e adicionado de azul de Evans 0,1%. Após incubação as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, secas e montadas com tampão fosfato-glicerina, cobertas com lamínula e observadas ao microscópio de epi-fluorescência (Zeiss, Alemanha).

5.3. Detecção de melanina por Imunofluorescência Indireta

As amostras de esporo e levedura, após ativação do complemento na presença de EDTA, foram fixadas conforme referido acima e tratados com 10µl soro de cobaio anti-melanina de *F. pedrosoi* (diluído a 1/250), preparado conforme PINTO (2004). As lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 60 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS, as amostras foram incubadas com 10µl de soro de coelho anti-IgG de cobaio (1/250) durante 60 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS (3x), as amostras foram novamente incubadas com 10µl de IgG de cabra anti-IgG de coelho marcada com fluoresceína (Sigma Chemical Co., EUA) diluído a 1/50 e adicionado de azul de Evans 0,1%. As lâminas foram incubadas novamente em câmara úmida durante 60 minutos a 37°C e a seguir lavadas com PBS (3x), secas e montadas com tampão fosfato-glicerina, cobertas com lamínula e observadas ao microscópio de epi-fluorescência (Zeiss).

6. Ensaio Imuno Enzimático Indireto (ELISA)

Amostras de 100µl das suspensões dos esporos das diferentes espécies de *Mucor* (10^7 cels/ml), levedura de *M. polymorphosporus* (10^6 cels/ml) e zimosan (200 µg/ml), após ativação do complemento, foram transferidas para placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo plano, incubadas a 37°C durante 2 h e conservadas a 4°C por 18 h. Posteriormente, a placa foi lavada com PBS pH 7.2, bloqueada com 300µl de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS e incubada novamente a 37°C durante 60 min. Após o bloqueio, adicionaram-se aos poços anticorpos específicos para os diferentes componentes do Complemento a serem pesquisados.

Após adsorção das amostras às placas, foram usados anticorpos específicos para detecção de diferentes constituintes do complemento e IgG humana, a saber: soro de cabra anti-C3 (Calbiochem-Novabiochem Co., EUA) diluído 1/3000, anticorpo anti-C3d monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc. EUA) diluído 1/100, soro de coelho anti-C4 (DAKO, Dinamarca) diluído a 1/500, soro de cabra anti-IgG humana (Sigma Chemical Co., EUA) diluído 1/20000, soro de coelho anti-MBL (diluído a 1/100), soro de coelho anti-proteína C-reativa (diluído a 1/100) e soro de cabra anti Fator H, diluído a 1/100 (Santa Cruz Biotechnology Inc. EUA). Amostras de 100µl desses reagentes diluídos em PBS contendo 5% de leite desnatado, foram acrescentadas aos poços das placas contendo as amostras de fungo e controles. A ligação dos anticorpos específicos foi revelada com os correspondentes conjugados marcados com peroxidase (IgG de coelho anti-IgG de cabra, IgG de cabra anti-IgG de camundongo ou com IgG de cabra anti-IgG de coelho), obtidos da Sigma Chemical Co., EUA. As etapas de incubação foram realizadas a 37°C durante 1 h.

Após lavagem com PBS, a reação foi revelada com 100 µl da solução de ortofenilenodiamina (OPD - 4,0 mg) em 10 ml de tampão citrato-fosfato de sódio 0,1

M, pH 5,0, acrescido de 4µl de H₂O₂ a 30% (Sigma Chemical Co. St Louis, EUA). Após 20 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2N (50 µl/poço). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (Spectra Vision – SLT, Austria) a 492 nm.

O controle do anticorpo primário foi realizado utilizando amostras não tratadas com soro. O controle do anticorpo secundário foi efetuado adicionando-se o conjugado às amostras, tratadas ou não com soro, mas na ausência do anticorpo primário. Para controle da adsorção inespecífica dos anticorpos à placa, adicionou-se esses anticorpos aos poços tratados apenas com salina. Os resultados obtidos para esses controles foram subtraídos daqueles obtidos para as amostras sob análise.

Como controles positivos foram utilizados soluções de C3 e C4 (Cordis Labs, Miami, FL, EUA), de IgG humana (Cappel Labs., PA, EUA), amostra de soro contendo alta concentração de proteína C-reativa (241µg/ml), gentilmente cedido pela Dra. Rosângela do Laboratório de Imunologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

7. Métodos Estatísticos

A ativação do complemento, ELISAs e imunofluorescências foram repetidas três vezes. As médias dos resultados e o respectivo desvio padrão foram utilizados para análise de variância usando o teste de *t-student* não pareado.

Resultados

1. Ativação do Sistema Complemento por formas miceliais

As diferentes espécies de *Mucor* foram avaliadas quanto a sua capacidade de ativar o sistema complemento humano *in vitro*. Amostras de micélio (20mg) foram incubadas com soro humano/VBS (absorvido com fungo e eritrócitos de carneiro) e, conforme podemos observar na Fig.5, todas as espécies de fungo foram capazes de consumir em torno de 25-40% do complemento, quando comparadas com o controle positivo (zimosan) que consome 100% ($p < 0.001$). As espécies *M. polymorphosporus* e *M. ramosissimus* deram resultados similares ($p > 0.05$) consumindo aproximadamente 40% do complemento, enquanto *M. plumbeus* e *M. circinelloides*, que também apresentaram resultados semelhantes entre si ($p > 0.05$), consumiram em torno de 25%.

Esses resultados podem ser comparados com aqueles obtidos na presença de quelantes (Fig.5). Pelas experiências realizadas com EGTA-Mg²⁺, que mostra a ativação do complemento pela via alternativa, verifica-se que todas as diferentes espécies de fungos consomem somente 15% do complemento sérico ($p > 0.05$). Esses resultados, comparados com os obtidos sem o quelante, indicam que deve haver envolvimento das outras vias (clássica e/ou das lectinas) quando a ativação é realizada na presença apenas do tampão (VBS). Essa diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.01$).

Os resultados das experiências com EDTA, que impede a ativação da cascata do complemento (0% de consumo), demonstram que os efeitos observados com ou sem EGTA-Mg²⁺ são decorrentes da ativação do complemento e não da ação dos fungos sobre as proteínas do sistema. (Fig. 5). Esse resultado pode ser comparado

ainda com o controle negativo (soro sem ativadores), que submetido às mesmas condições de temperatura, não perdeu sua atividade hemolítica, tanto na presença quanto ausência de quelantes, validando o teste.

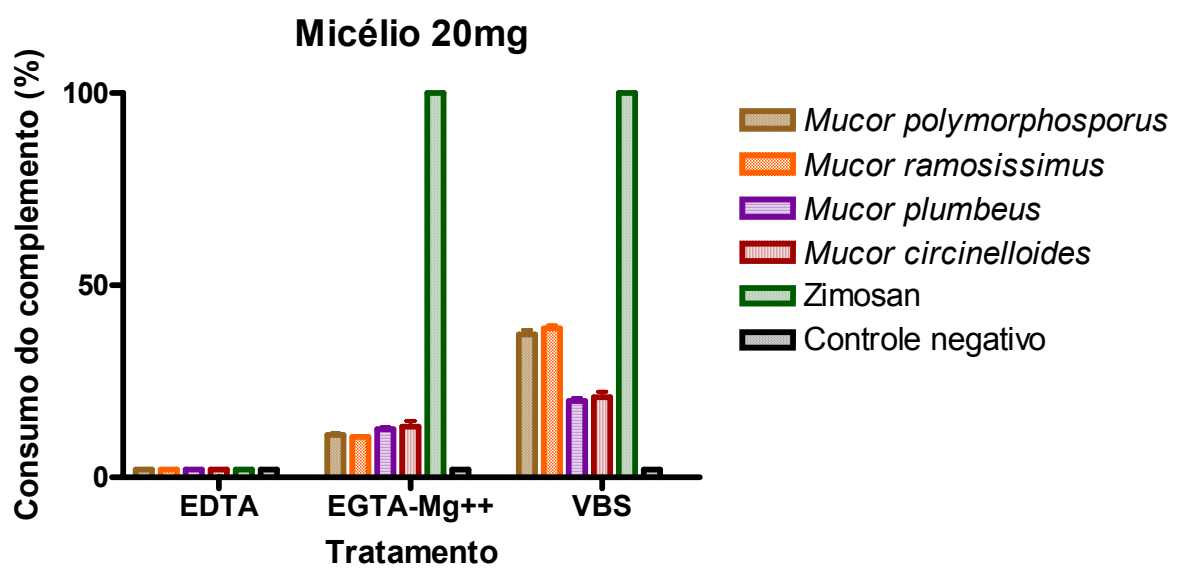


Figura 5. Porcentagem de consumo do complemento pelas formas miceliais (20mg) das espécies de *M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides*, após ativação na presença ou ausência de quelantes (EDTA ou EGTA).

A utilização de soro absorvido com fungo e hemácias de carneiro ou somente com hemácias de carneiro, não influenciou nos resultados ($p > 0.05$) de ativação (Fig. 6), indicando que anticorpos naturais não influem na ativação pelas amostras miceliais. Esses testes foram realizados com ou sem a presença de quelantes. Na fig. 6 são apresentados os resultados dos testes de ativação em presença de VBS ou de EGTA Mg^{2+} . Esses resultados são semelhantes aos apresentados na Fig.5, inclusive quanto à ação do EDTA e dos controles (que não são mostrados na Fig. 6).

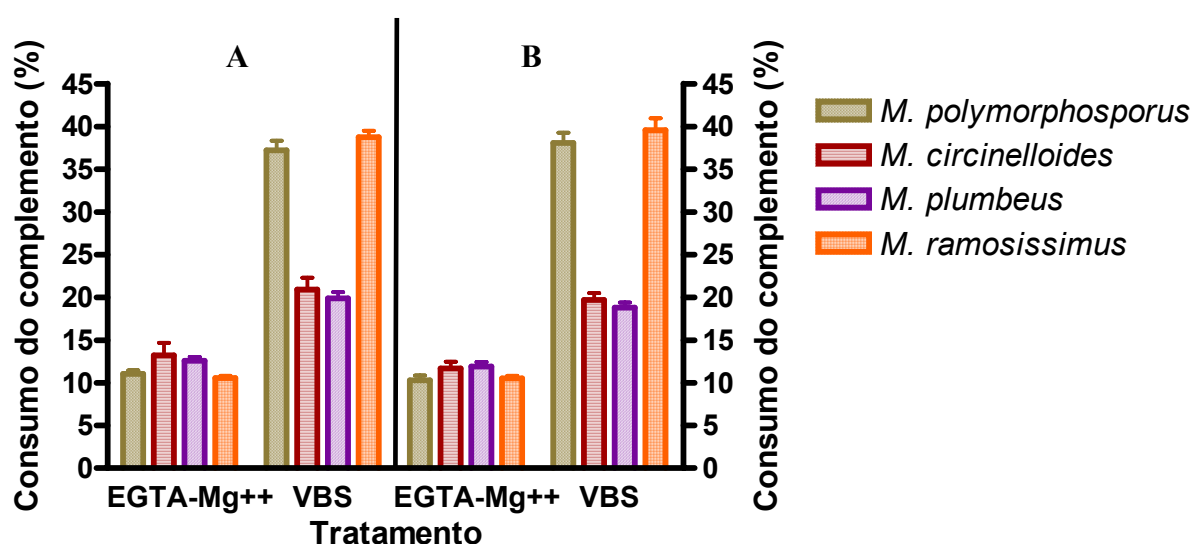


Figura 6. Análise comparativa das porcentagens de consumo do complemento pelas formas miceliais dos fungos *M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides*, após ativação na presença ou ausência de EGTA utilizando:
 A) soros absorvidos com hemácias de carneiro e micélio das respectivas espécies;
 B) soros absorvidos apenas com hemácias de carneiro

2. Ativação do Sistema Complemento por esporos

Os resultados das experiências realizadas com esporos das diferentes espécies de *Mucor* são apresentados na Fig.7. Diferentemente das amostras miceliais, os esporos consomem 100% da atividade do complemento da mistura de soros absorvida com hemácias de carneiro, com ou sem a presença do quelante EGTA ($p > 0,05$). Conforme esperado, não há consumo de complemento na presença do quelante EDTA. Todas as espécies testadas mostraram o mesmo perfil de ativação ($p > 0.05$). Estes dados são comparáveis aos obtidos com o controle positivo de ativação (Zimosan) ($p > 0.05$).

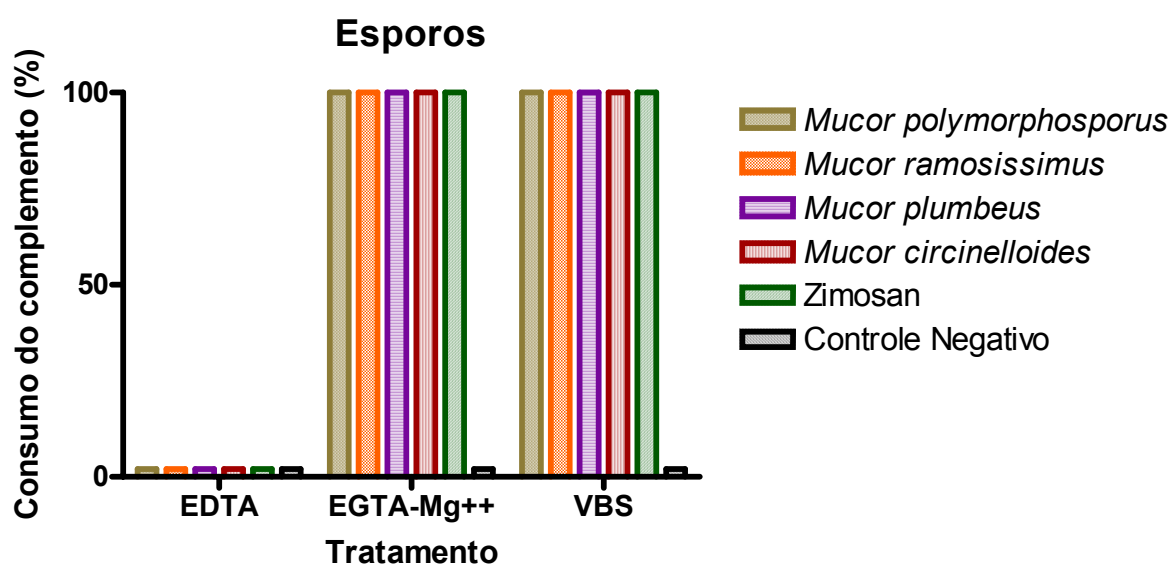


Figura 7. Porcentagem de consumo do complemento por esporos (10^8) das espécies *M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides*, após ativação na presença ou ausência de quelantes (EDTA ou EGTA).

3. Ativação do complemento pelas formas de Micélio, Levedura e Esporos de *Mucor polymorphosporus*

A fig. 8 mostra os resultados das experiências realizadas com diferentes formas de *M. polymorphosporus*. Conforme observado acima, a forma micelial (20mg), apresenta baixo consumo do complemento, quando comparada ao controle positivo ($p < 0.001$). Entretanto, as formas de levedura (10^7) e esporo (10^8), mostraram-se ativadores eficientes, ou seja, 100% de consumo do complemento. Os resultados obtidos na presença de EGTA-Mg²⁺ mostram que essas formas consomem o complemento principalmente pela via alternativa.

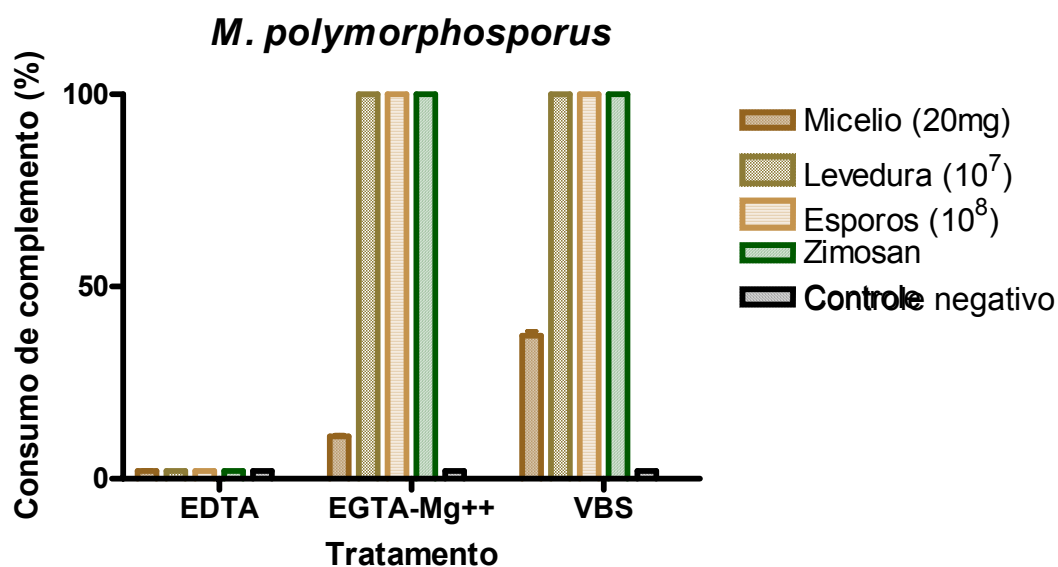


Figura 8. Análise comparativa da porcentagem de consumo do complemento por micélio (20mg), levedura (10^7) e esporos (10^8) de *M. polymorphosporus*, após ativação na presença ou ausência de quelantes (EDTA ou EGTA).

Na Fig.9 são mostrados os resultados das experiências de ativação frente aos esporos de *M. polymorphosporus* em vários tempos de diferenciação. Como pode ser observado, não há diferença de consumo entre as diferentes amostras utilizadas ($p > 0.05$), ou seja, todas consomem 100% de complemento sérico.

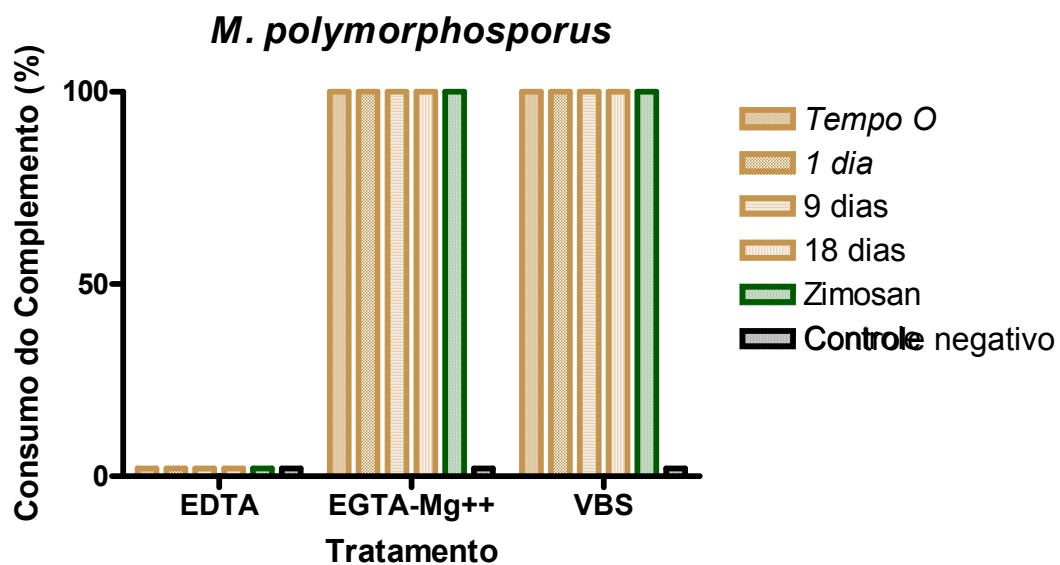


Figura 9. Porcentagem de consumo do complemento por esporos de *M. polymorphosporus*, de diferentes tempos de diferenciação a 4°C, após ativação do complemento na presença ou ausência de quelantes (EDTA ou EGTA).

4. Ensaio Imuno Enzimáticos (ELISA)

4.1. Detecção de fragmentos de C3 em esporos das espécies de *Mucor*

Na fig. 10 são mostrados os resultados da deposição de fragmentos de C3 em esporos, conforme avaliado por ensaio imunoenzimático. Os resultados dessas experiências mostram que houve ligação de fragmentos de C3 de modo semelhante nos esporos das espécies estudadas, tanto na presença quanto a ausência de EGTA-Mg²⁺. Entretanto, na presença desse quelante os valores foram ligeiramente inferiores àqueles obtidos sem o EGTA ($p < 0.05$). Estes dados demonstram ativação eficiente da via alternativa e confirmam os resultados obtidos para o consumo do complemento (Fig.7). Conforme esperado, não houve deposição de fragmentos de C3 nas amostras ensaiadas na presença de EDTA porque não houve ativação de nenhuma via na presença deste quelante.

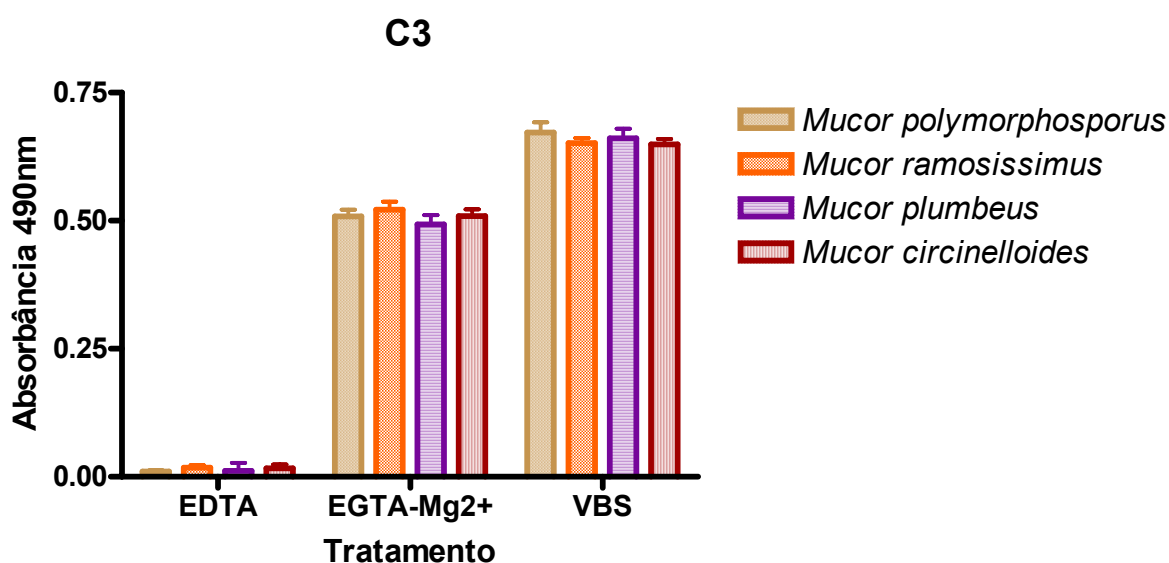


Figura 10. Detecção de fragmentos de C3 em esporos de *M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides* por ELISA indireto. Anticorpos primários anti-C3 foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. Os valores dos controles negativos foram descontados dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações.

4.2. Detecção de fragmentos de C4 em esporos das espécies de *Mucor*

Na Fig. 11 são mostrados os resultados da detecção de C4 nos esporos das quatro espécies estudadas, observando-se que não há diferença significativa entre elas ($p > 0.05$). Entretanto, comparando os resultados obtidos para as amostras tratadas com o soro, na presença ou não de EGTA-Mg²⁺, observam-se diferenças significativas ($p < 0.001$) entre os dois tratamentos, ou seja, fragmentos de C4 só foram detectados nas amostras incubadas sem quelantes. Este resultado sugere a participação da via clássica e/ou das lectinas no processo.

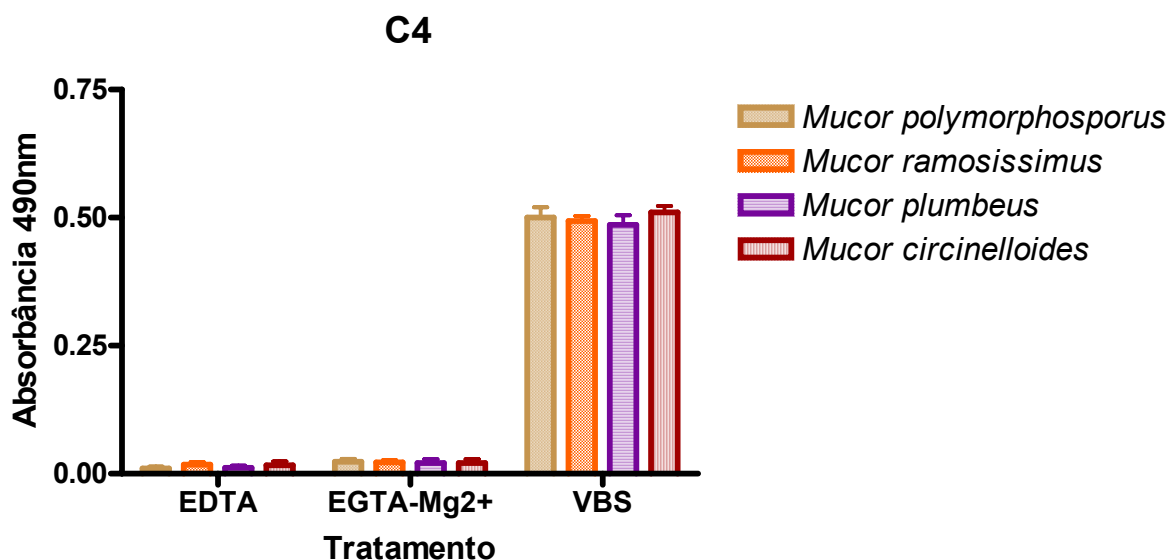


Figura 11. Detecção de fragmentos de C4 em esporos de *M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides* por ELISA indireto. Anticorpos primários anti-C4 foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações.

4.3. Detecção de MBL, CRP e IgG em esporos das espécies de *Mucor*

A presença de MBL, CRP e IgG na superfície dos esporos, após ativação do complemento, é mostrada na Fig. 12. O perfil de deposição das proteínas investigadas foi semelhante em todas as espécies testadas ($p > 0.05$). A presença dessas proteínas nas amostras corrobora os resultados obtidos para a deposição de fragmentos de C4 (Fig.11) visto que essas proteínas participam dos processos de ativação do complemento pelas vias clássica e das lectinas. Por outro lado, a presença de traços de IgG indicam que há anticorpos naturais contra esse fungo ou antígenos com estruturas semelhantes, dando a reação cruzada observada.

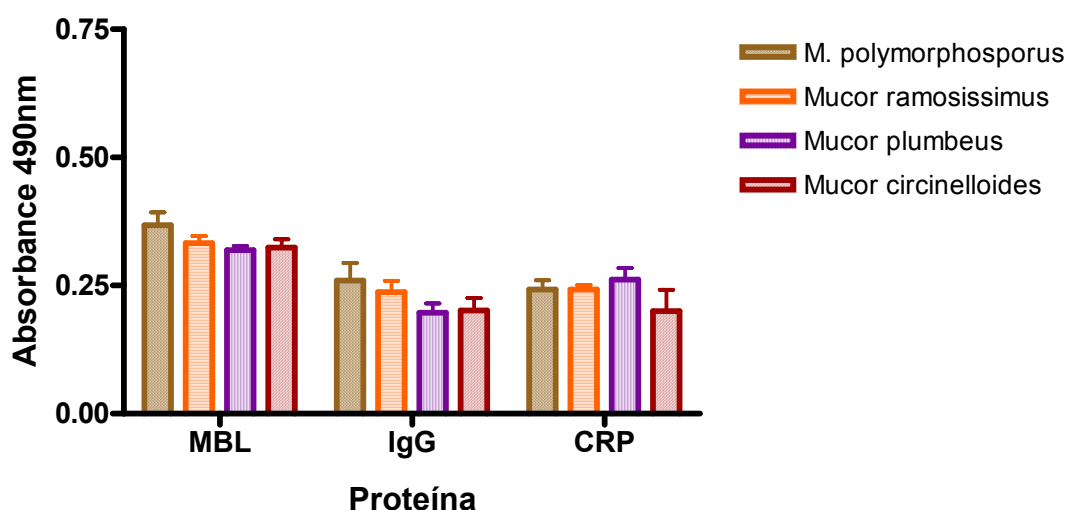


Figura 12. Detecção de MBL, CRP e IgG em esporos de *M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides* por ELISA indireto. Esporos incubados com soro sem quelantes foram usados neste teste. Anticorpos primários contra cada componente foram adicionados e sua ligação às amostras avaliada após incubação com o respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações.

4.4. Detecção de Fator H e C3d em esporos das espécies de *Mucor*

Na fig. 13 estão os resultados da pesquisa de Fator H e fragmento C3d, na superfície dos esporos. A ausência dessas moléculas indica que não houve interrupção da via alternativa mediada pelo Fator H. Os resultados foram constantes para todas as espécies estudadas ($p > 0.05$).

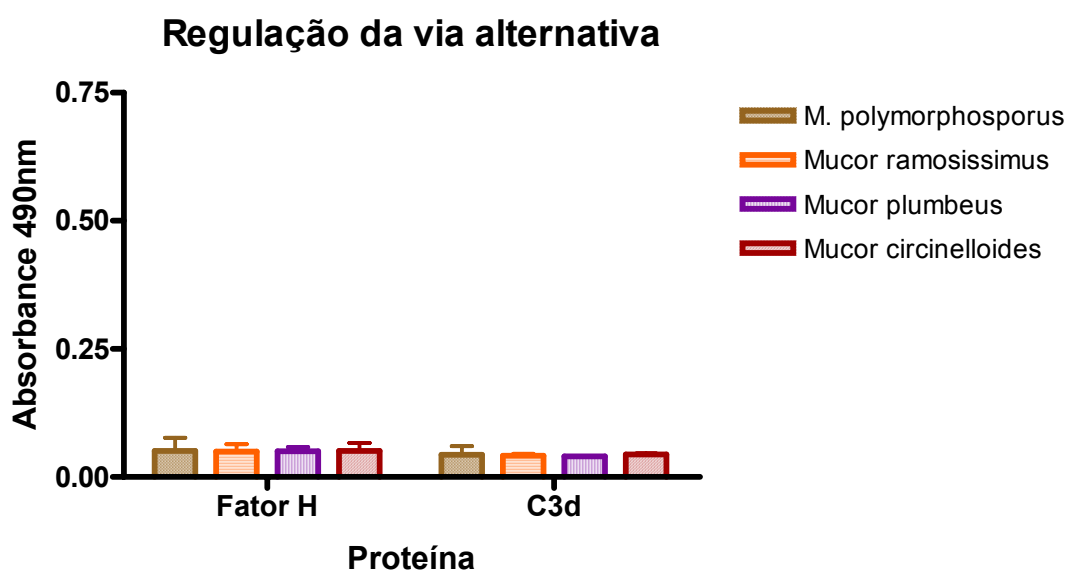


Figura 13. Detecção de Fator H e fragmento C3d em esporos de *M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides* por ELISA indireto. Esporos incubados com soro na presença de EGTA-Mg²⁺ foram usados neste teste. Anticorpos primários contra cada componente foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações.

4.5. Detecção de fragmentos de C3 na superfície de esporo e levedura de *Mucor polymorphosporus*

Na fig. 14 são mostrados os resultados da deposição de C3 em leveduras e esporos em diferenciação de *M. polymorphosporus*, conforme avaliado por ensaio imunoenzimático. Os resultados desses experimentos mostram que houve ligação dos fragmentos de C3 nas formas testadas. Entretanto, a ligação dos fragmentos de C3 variou entre a forma de levedura e esporo ($p < 0.05$). Entretanto, não se observa variação significativa quando se comparam os resultados obtidos com os esporos de diferentes tempos de diferenciação ($p > 0.05$). Por outro lado, observa-se que a incubação com EGTA-Mg²⁺ resultou em ligação de C3 com menos eficiência que aquela obtida com soro sem quelante ($p < 0.001$). A levedura comporta-se de forma semelhante aos esporos quanto à ativação das vias, avaliada pela presença ou não de quelante.

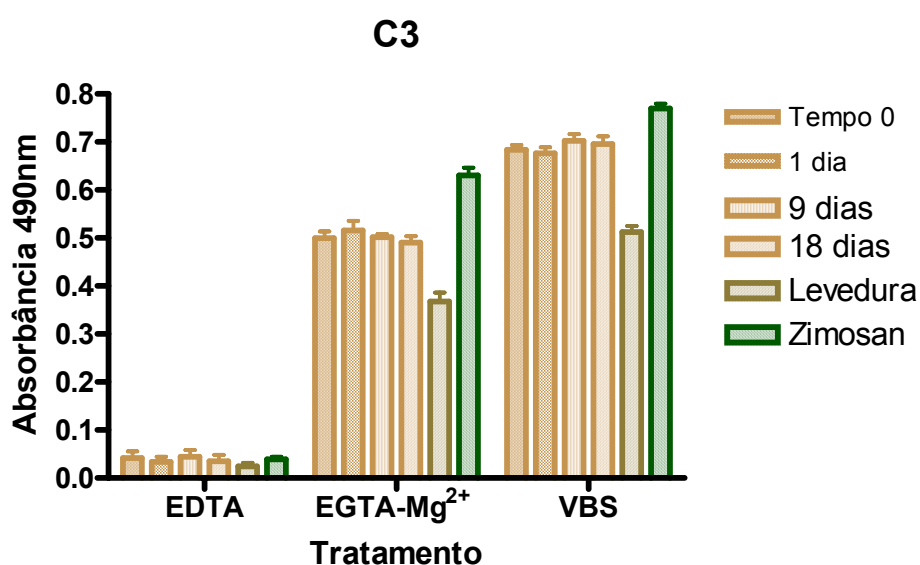


Figura 14. Detecção de fragmentos de C3 em levedura e esporos em diferenciação de *M. polymorphosporus* por ELISA indireto. Anticorpos primários anti-C3 foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. Os valores dos controles negativos foram descontados dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações.

4.6. Detecção de fragmentos de C4 na superfície de esporo e levedura de *Mucor polymorphosporus*

Os resultados da detecção de C4, demonstrados na fig. 15, indicam que houve primeiramente a ativação da via clássica ou das lectinas, pelas formas de levedura e esporos em diferenciação. Este componente não é observado nas experiências em que o complemento é ativado na presença de EGTA-Mg²⁺, confirmando a não deposição de fragmentos de C4 nos ensaios de pesquisa de ativação da via alternativa. Por outro lado, pode-se constatar que os esporos são mais eficientes em ativar a via clássica ou das lectinas que as leveduras ($p < 0.001$). Os níveis de C4 foram semelhantes nos esporos em diferentes tempos de diferenciação ($p > 0.05$).

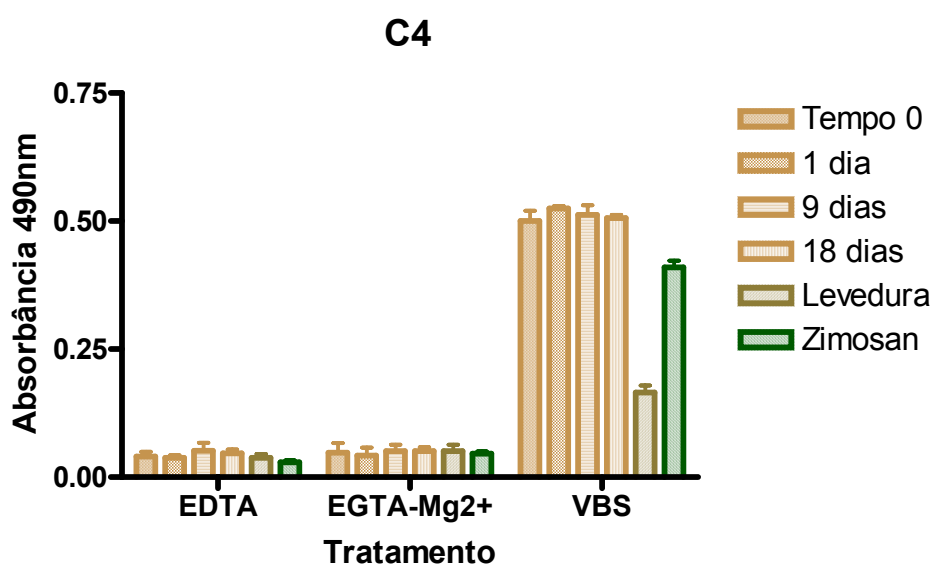


Figura 15. Detecção de fragmentos de C4 em levedura e esporos em diferenciação de *M. polymorphosporus* por ELISA indireto. Anticorpos primários anti-C4 foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações.

4.7. Detecção de MBL, CRP e IgG em esporo e levedura de *Mucor polymorphosporus*

A presença de MBL, CRP e IgG na superfície da levedura e esporos de *M. polymorphosporus*, após ativação do complemento, é comparada na Fig. 16. A presença das proteínas (MBL, CRP e IgG), que participam das vias clássica e das lectinas, sobre os esporos mostram que essa forma do *M. polymorphosporus* é capaz de ativar o complemento por essas vias, além da alternativa, que foi observada em resultados anteriores. Os resultados obtidos para as leveduras indicam que essas formas não são tão eficazes na ativação do complemento por essas vias ($p < 0.001$). Por outro lado, a presença de traços de IgG indicam que há anticorpos naturais contra esse fungo ou antígenos com estruturas semelhantes, dando a reação cruzada observada. A baixa deposição destas proteínas nas leveduras corrobora os resultados da pesquisa de fragmentos de C4, mostrada acima. A presença de C4 está diretamente ligada à ativação pelas vias clássica e/ou das lectinas.

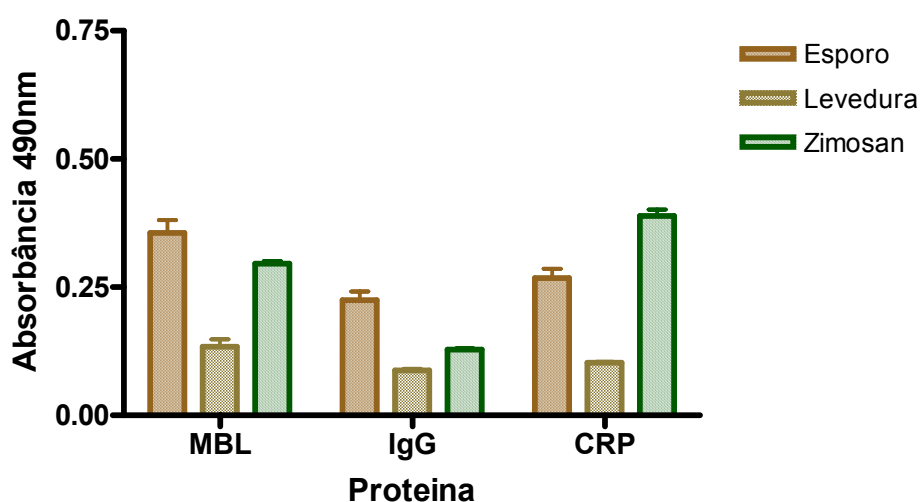


Figura 16. Detecção de MBL, CRP e IgG em leveduras e esporos de *M. polymorphosporus* por ELISA indireto. Esporos incubados com soro sem quelantes foram usados neste teste. Anticorpos primários contra cada componente foram adicionados e sua ligação às amostras foi avaliada após incubação com respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores são de densidade óptica, medida em 490nm. As leituras dos controles negativos foram descontadas dos valores mostrados. Os resultados apresentados são a média de três determinações.

5. Imunofluorescência

5.1. Distribuição de fragmentos de C3 nas amostras de esporos de *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides*

A ligação e distribuição de fragmentos de C3 na superfície dos esporos das diferentes espécies de *Mucor* foram observadas por imunofluorescência direta. Nestas três espécies, foi possível observar a distribuição confluenta por toda superfície dos esporos, tanto quando o complemento foi ativado pela via alternativa (Fig. 17), como quando todas as vias estavam atuando (Fig. 17). Quando as espécies foram incubadas na presença de EDTA, que impede a ativação do complemento, nenhuma fluorescência foi observada (Fig. 17).

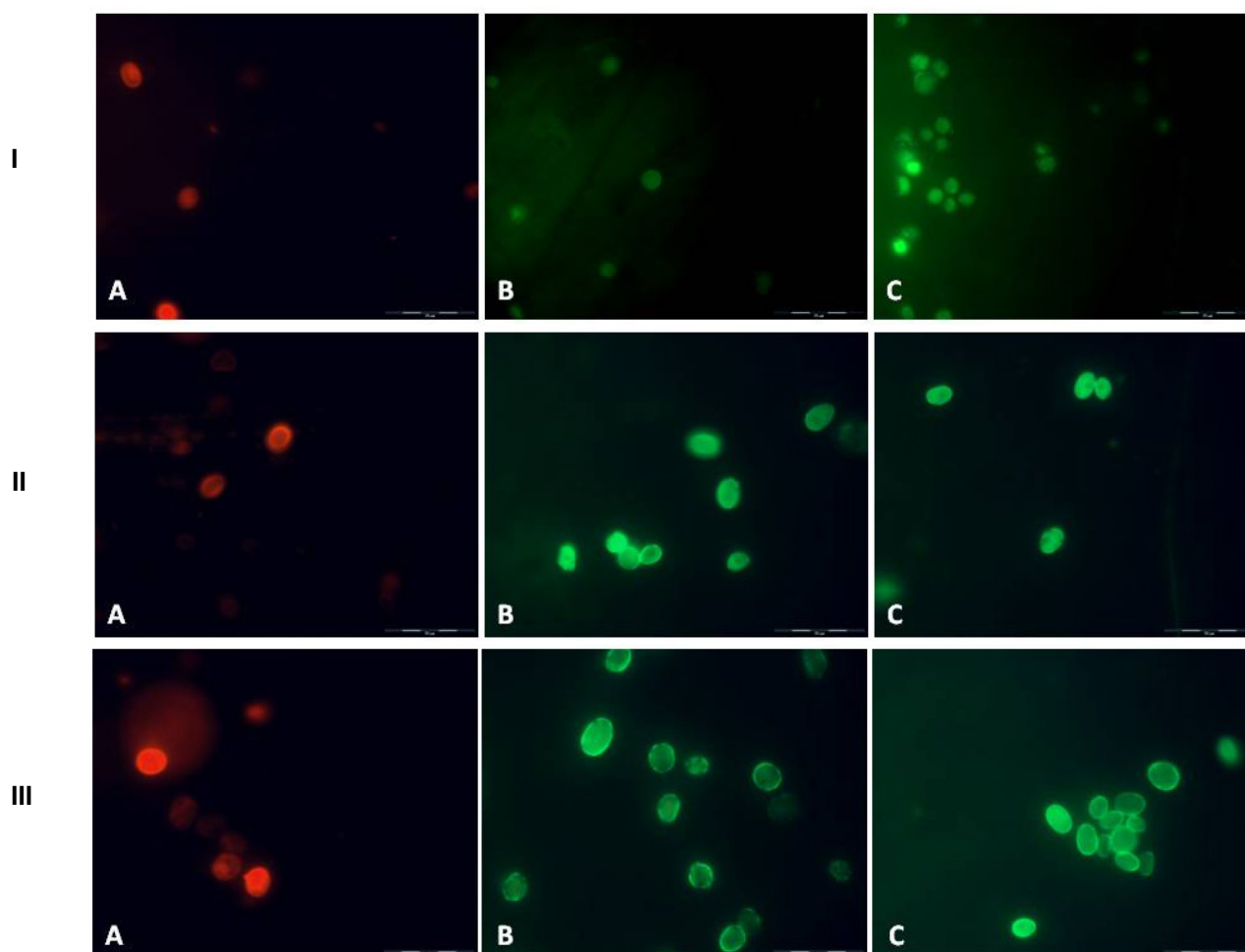


Figura 17. Detecção de fragmentos de C3 em esporos de diferentes espécies de *Mucor* por imunofluorescência direta. I. *M. ramosissimus*. IA) esporo incubado com soro + EDTA. IB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg²⁺. IC) esporo incubado com soro sem quelantes. II. *M. plumbeus*. IIA) esporo incubado com soro + EDTA. IIB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg²⁺. IIC) esporo incubado com soro sem quelantes. III. *M. circinelloides*. IIIA) esporo incubado com soro + EDTA. IIIB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg²⁺. IIIC) esporo incubado com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm.

5.2. Distribuição de fragmentos de C3 nas amostras de esporos e leveduras de *M. polymorphosporus*

A distribuição de fragmentos de C3 na superfície dos esporos e leveduras de *M. polymorphosporus* foi avaliada por imunofluorescência direta. Nestas duas formas, é possível observar a distribuição confluenta por toda superfície das amostras, tanto quando o complemento foi ativado pela via alternativa (Fig. 18.I), como quando todas as vias estavam atuando (Fig. 18.II). Quando as amostras foram incubadas na presença de EDTA, nenhuma fluorescência foi observada

As amostras de esporos em diferentes tempos de diferenciação a 4°C mostram que a ativação do complemento vai diminuindo à medida que o micélio vai se formando. Estes resultados estão de acordo com baixa ativação do complemento observada pelo micélio. Enquanto que as formas de esporo apresentaram distribuição confluenta (Fig. 19.I), as formas de hifa apresentaram pouca ou nenhuma fluorescência (Fig. 19.II e 19.III), inclusive quando somente a via alternativa estava atuando. Conforme esperado, as amostras incubadas com EDTA não mostraram fluorescência.

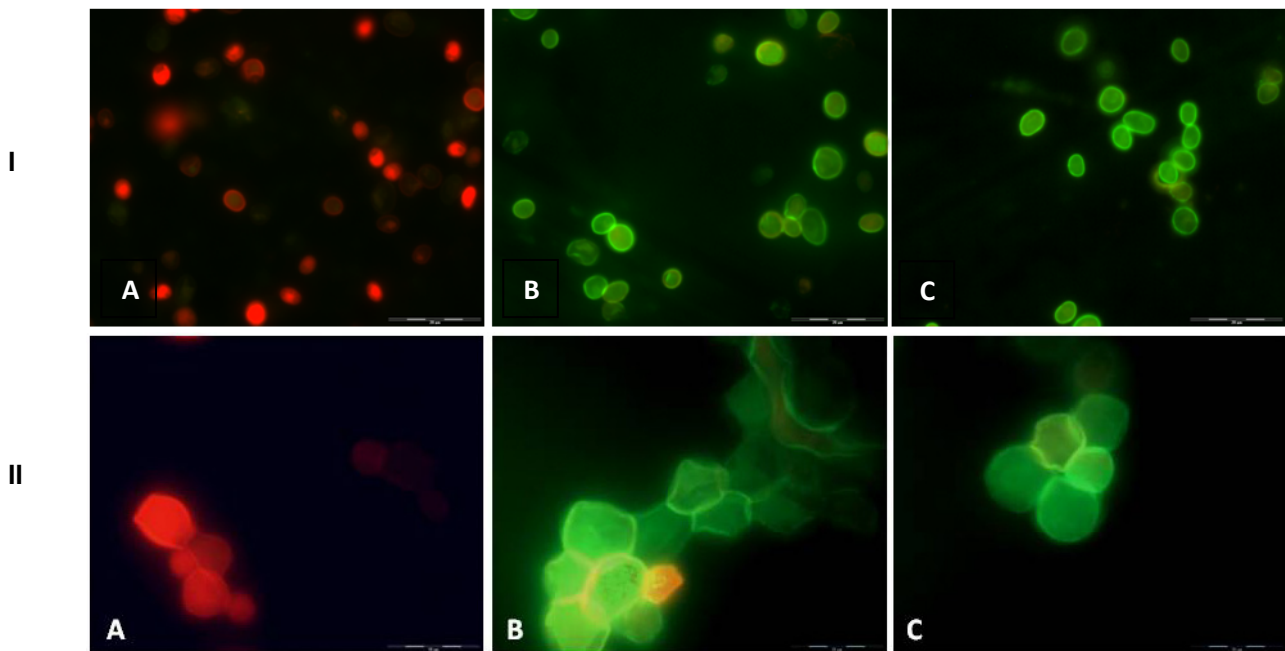


Figura 18. Detecção de fragmentos de C3 em *M. polymorphosporus* por imunofluorescência direta. I. Esporos. IA) esporo incubado com soro + EDTA. IB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg²⁺. IC) esporo incubado com soro sem quelantes. II. Leveduras. IIA) levedura incubada com soro + EDTA. IIB) levedura incubada com soro + EGTA-Mg²⁺. IIC) levedura incubada com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm.

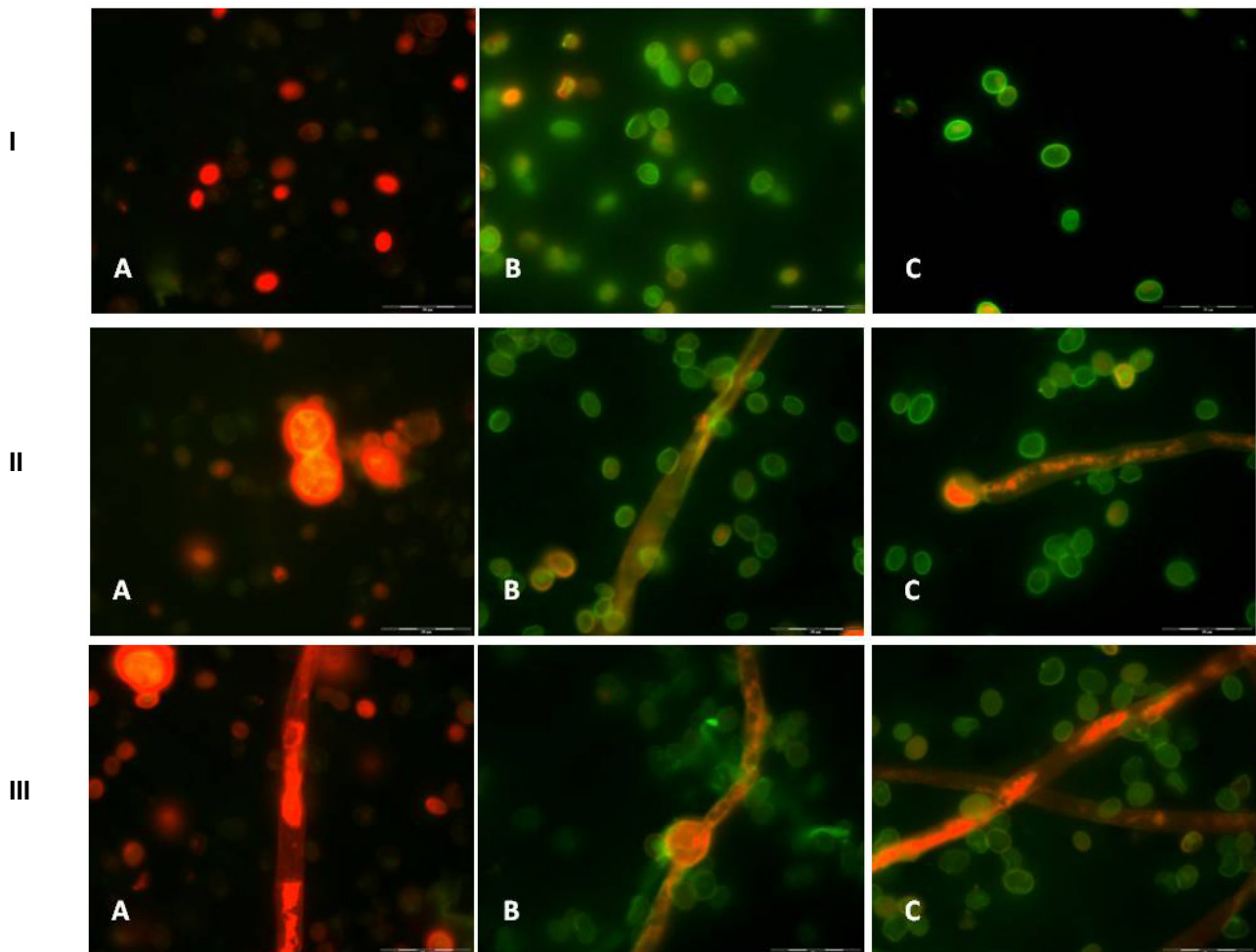


Figura 19. Detecção de fragmentos de C3 em esporos em diferenciação de *M. polymorphosporus* por imunofluorescência direta. I. 1 dia de diferenciação. IA) esporo incubado com soro + EDTA. IB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg²⁺. IC) esporo incubado com soro sem quelantes. II. 9 dias de diferenciação. IIA) esporo incubado com soro + EDTA. IIB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg²⁺. IIC) esporo incubado com soro sem quelantes. III. 18 dias de diferenciação. IIIA) esporo incubado com soro + EDTA. IIIB) esporo incubado com soro + EGTA-Mg²⁺. IIIC) esporo incubado com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm.

5.3. Distribuição de IgG nas amostras de esporos de *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides*

A distribuição de IgG humana na superfície dos esporos das diferentes espécies de *Mucor* foi observada por imunofluorescência direta, após a ativação do complemento usando soro sem quelantes. Nas três espécies testadas, foi possível observar fraca fluorescência, contudo com distribuição confluenta (Fig. 20). Este dado corrobora a possível ativação pela via clássica, já que a presença de duas gamaglobulinas próximas é necessária para que isso ocorra.

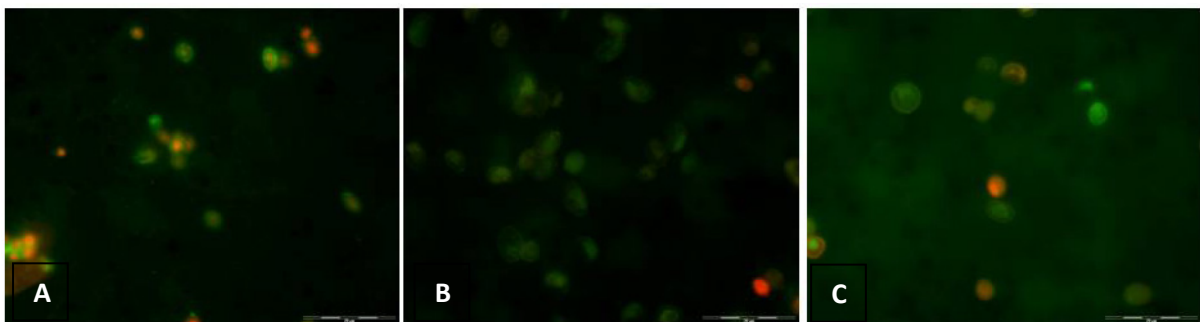


Figura 20. Detecção de IgG em esporos das diferentes espécies de *Mucor* por imunofluorescência direta. A) *M. ramosissimus* incubado com soro sem quelantes. B) *M. plumbeus* incubado com soro sem quelantes. C) *M. circinelloides* espora incubado com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20 μ m.

5.4. Distribuição de IgG nas amostras de esporos e leveduras de *M. polymorphosporus*

A distribuição de IgG humana na superfície dos esporos e leveduras de *M. polymorphosporus* foi observada por imunofluorescência direta, após a ativação do complemento usando soro sem quelantes. Na forma de esporo, foi possível observar fraca fluorescência, contudo com distribuição confluenta (Fig. 21A, 21C). Esses resultados são comparáveis aos obtidos com os esporos das outras espécies. Nessa figura, podemos observar ainda que as leveduras ou hifas recém diferenciadas não apresentam fluorescência (Fig. 21B, 21C), indicando ausência de IgG ligada. As diferenças mais marcantes com relação à fixação de IgG pelos esporos em diferenciação, são notadas aos 18 dias, quando já se observa hifas em formação (Fig. 21C).

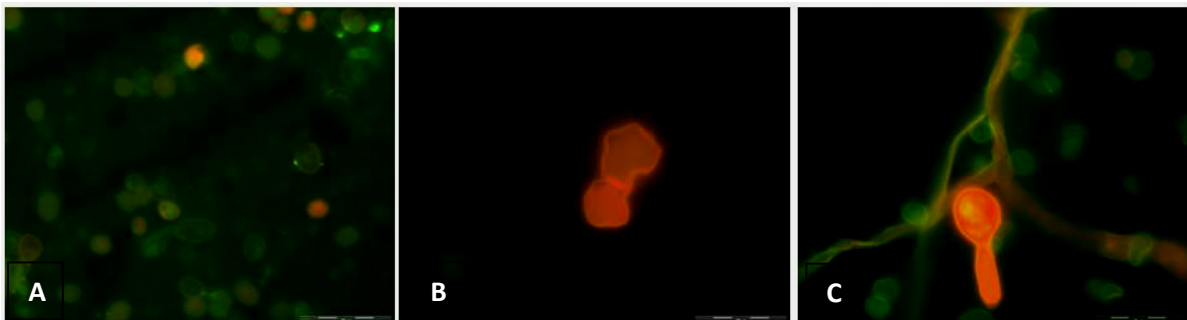


Figura 21. Detecção de IgG em esporos e levedura de *Mucor polymorphosporus* por imunofluorescência direta. A) esporo incubado com soro sem quelantes. B) levedura incubada com soro sem quelantes. C) esporo com 18 dias de diferenciação incubado com soro sem quelantes. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20 μ m.

5.5. Distribuição de melanina nas amostras de esporos de *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides*

A distribuição de melanina na superfície dos esporos das diferentes espécies de *Mucor* foi observada por imunofluorescência indireta, após a ativação do complemento usando soro na presença de EDTA. Nas três espécies testadas, foi possível observar fluorescência, com distribuição confluenta, para a maioria dos esporos (Fig. 22), mostrando a possível reação cruzada do anticorpo anti-melanina de *F. pedrosoi* com as espécies de *Mucor*.

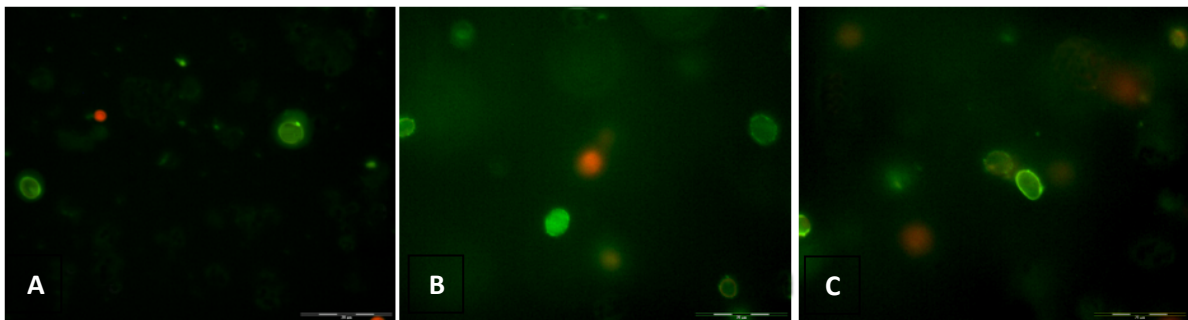


Figura 22. Detecção de melanina em esporos das diferentes espécies de *Mucor* por imunofluorescência indireta. A) *M. ramosissimus* incubado com soro + EDTA. B) *M. plumbeus* incubado com soro + EDTA. C) *M. circinelloides* esporo incubado com soro + EDTA. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20 μ m.

5.6. Distribuição de melanina nas amostras de esporos e leveduras de *M. polymorphosporus*

A distribuição de melanina na superfície dos esporos e leveduras de *M. polymorphosporus* foi observada por imunofluorescência indireta, após a ativação do complemento usando soro na presença de EDTA. Na forma de esporo, foi possível observar fluorescência com distribuição não confluenta (Fig. 23A, 23C). Esta fluorescência não é observada com as formas de leveduras ou hifas recém diferenciadas (Fig. 23B, 23C). Alguns esporos na amostra em diferenciação, também não apresentaram fluorescência (Fig. 23C).

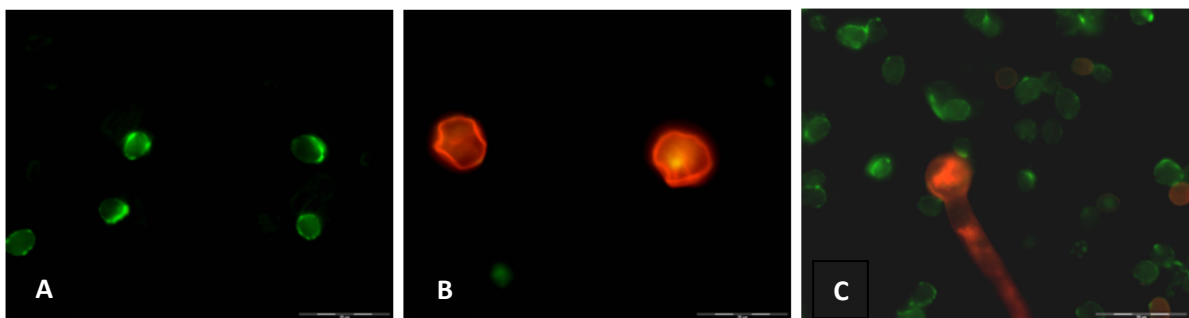


Figura 23. Detecção de melanina em esporos e levedura de *Mucor polymorphosporus* por imunofluorescência indireta. A) esporo incubado com soro + EDTA. B) levedura incubada com soro + EDTA. C) esporo com 18 dias de diferenciação incubado com soro + EDTA. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20 μ m.

5.7. Distribuição de fragmentos de C3, IgG e melanina nas amostras de Zimosan

A distribuição de fragmentos de C3 na superfície do zimosan foi observada por imunofluorescência direta, após a ativação do complemento. Na figura 24 podemos observar a fluorescência das amostras que foram incubadas como soro na presença de EGTA-Mg²⁺ (Fig. 24B) e na ausência deste quelante (Fig. 24C). Esses resultados mostram que o zimosan é capaz de ativar o sistema complemento, inclusive pela via alternativa. Na presença de EDTA, nenhuma fluorescência é observada (Fig. 24A).

A presença de IgG sobre o zimosan é observada na Fig. 24D, que mostra a presença de IgG distribuída de forma irregular em algumas partículas.

Quanto à presença de melanina nessa levedura, a Fig. 24E mostra a ausência deste pigmento no zimosan.

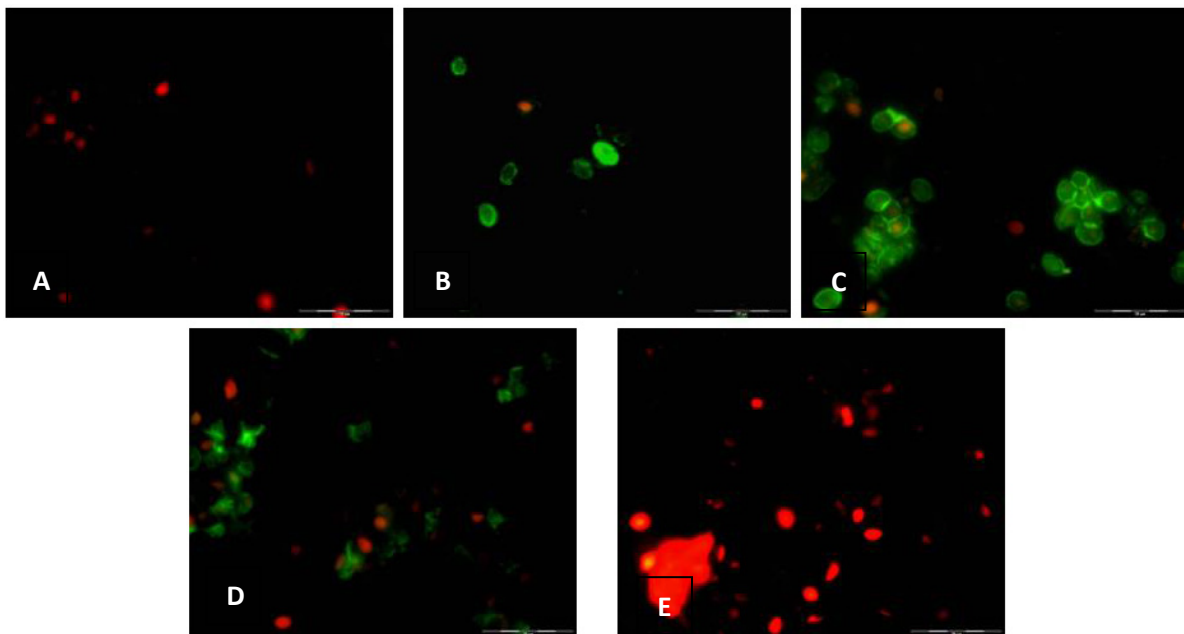


Figura 24. Detecção de fragmentos de C3, IgG e Melanina sobre zimosan. Imunofluorescência direta (C3 e IgG) e indireta (melanina). Detecção de C3: A - Zimosan incubado com soro + EDTA. B - Zimosan incubado com soro + EGTA-Mg²⁺. C - Zimosan incubado com soro sem quelantes. Detecção de IgG: D – Zimosan incubado com soro sem quelantes. Detecção de melanina: E - Zimosan incubado com soro + EDTA. Aumento de 1000x. A barra de aumento indica 20µm.

Discussão

O número de casos de mucormicose aumenta a cada ano e atualmente já consta como sendo a terceira causa mais comum de doenças fúngicas invasivas nos Estados Unidos (BOUZA, MUNOZ & GUINEA, 2006). Dentre as espécies escolhidas para este estudo, *M. circinelloides* é a principal espécie de *Mucor* responsável por mucormicose (CHAN-TACK, NEMOY & PERENCEVICH, 2005; CHANDRA & WOODGYER, 2002). O fungo *M. ramosissimus* já foi identificado como o agente etiológico dessa doença em alguns casos (WEITZMAN et al., 1993; BULLOCK, JAMPOL & FEZZA, 1974; VIGNALE et al., 1964). A espécie *M. polymorphosporus* foi relacionada com apenas um caso de mucormicose (GRANJA et al., 2008). Não há caso clínico documentado de mucormicose causada pela espécie de *M. plumbeus* apesar do ser humano estar em contacto com essa espécie por ser utilizada em processos industriais.

As doenças fúngicas iniciam-se, em geral, pela inalação ou contacto traumático do hospedeiro com os esporos (ALONSO et al., 1997; BHADURI et al., 1983). Nesses casos, quando o microrganismo ainda se encontra no exterior das células, um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro é a fagocitose, eventualmente facilitada pelas atividades do sistema complemento.

Por outro lado, microrganismos intracelulares em geral podem utilizar os processos de opsonização mediados pelo complemento para infectar células como os macrófagos (MITCHELL, 2007).

Fungos extracelulares também são alvos da ação do complemento e ataque das células fagocíticas que podem liberar seus conteúdos lisossomais sobre o parasita (MITCHELL, 2007).

Tendo em vista a importância crescente das doenças fúngicas oportunistas, o presente trabalho visou avaliar a ativação do sistema complemento humano *in vitro* por diferentes espécies do gênero *Mucor* (*M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides*).

Os fungos desse gênero, para causarem doenças invasivas assumem a forma de micélio (BOUZA, MUNOZ & GUINEA, 2006). A ativação do complemento no início dos processos infecciosos é inespecífica, isto é, pelas vias alternativa e/ou das lectinas. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que estas vias foram as mais ativadas pelo micélio das espécies estudadas sugerindo que essa forma de ativação do complemento pode ser um fator importante na defesa dos hospedeiros contra essas infecções. Entretanto, esses resultados mostram que esse efeito (Fig.5) é observado tanto para os fungos envolvidos em doenças (*M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, e *M. circinelloides*) quanto para uma espécie não causadora de doença (*M. plumbeus*).

A baixa ativação do complemento por essa forma micelial sugere que a etapa crítica para a eliminação do microrganismo seria aquela anterior à formação das hifas. Os resultados obtidos quanto à ativação do complemento pelos esporos poderiam explicar a eliminação do microrganismo no início dos processos de defesa do hospedeiro pela ação do complemento (imunidade inata). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, os esporos de todas as espécies estudadas são capazes de ativar o complemento principalmente pelas vias alternativa e/ou das lectinas.

Tem sido discutido por vários autores que a estrutura da parede dos microrganismos influencia na sua capacidade de ativar o complemento e, conseqüentemente, sua eliminação por fagocitose (SPETH et al., 2008). A partir dos resultados obtidos neste trabalho, as possíveis diferenças estruturais entre as espécies

não parecem ser responsáveis por sua infectividade. Na ausência de quelantes, ou seja, com todas as vias do complemento liberadas, dois perfis distintos foram detectados (Fig. 5): *M. polymorphosporus* e *M. ramosissimus* apresentaram resultados semelhantes porém distintos daqueles obtidos para *M. plumbeus* e *M. circinelloides*. Estas duas últimas espécies de *Mucor* correspondem, respectivamente, a um microrganismo não patogênico e um que é responsável pela maioria dos casos descritos de mucormicose causadas por espécies desse gênero. Em todos os casos, entretanto, é possível verificar que a forma micelial de todas estas espécies não é capaz de ativar eficientemente o complemento.

Com relação aos esporos de todas as espécies, o consumo total do complemento foi verificado quando a mistura de soros foi incubada com EGTA-Mg²⁺ (Fig. 7), indicando que a ativação da via alternativa foi eficiente. Estes resultados são corroborados pela deposição de fragmentos C3 (Fig. 10). Quando a incubação ocorreu sem quelantes, foi possível detectar uma quantidade maior de C3 que pode ser explicada pela ação concomitante de todas as vias de ativação do complemento. A técnica de imunofluorescência direta demonstrou que a distribuição de fragmentos de C3 foi confluyente nos esporos de todas as espécies testadas (Fig. 17 e 18). Este tipo de deposição mostra a possível opsonização eficiente dos esporos por fragmentos de C3.

Inúmeros fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* são capazes de ativar o sistema complemento pela via alternativa (SPETH et al., 2008; KOZEL, 1998). Vários trabalhos filogenéticos mostram que certos componentes da via alternativa, tais como C3 e Fator B, se apresentam como o mecanismo mais antigo do sistema complemento (PINTO et al., 2007; ZHU et al., 2005; SMITH, CLOW & TERWILLIGER, 2001). Por isso vários organismos superiores são capazes de utilizar via alternativa na

eliminação de microrganismos invasores. Por outro lado, para alguns microrganismos, a opsonização auxilia a doença das células fagocíticas. Após ativação do complemento, os fragmentos C3b e iC3b são depositados e agem como opsoninas, sendo reconhecidos por receptores de fagócitos CR1 (AHEARN & FEARON, 1989) e CR3 (FEARON & AHEARN, 1990), respectivamente. Assim sendo, a presença de C3b é crucial para as respostas envolvendo o sistema complemento, que pode eventualmente levar à fagocitose dos microrganismos invasores e sua eliminação ou não.

Os fragmentos C3b e iC3b podem formar ligações do tipo éster ou amida com as partículas ativadoras (LAW, MINICH & LEVINE, 1981). Diferentes trabalhos mostram que essas proteínas estão presentes na superfície de diversos fungos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*) após ativação pelo complemento (ZHANG & KLEIN, 1997; YOUNG & KOZEL, 1993; KOZEL et al., 1989; KOZEL, BROWN & PFROMMER, 1987). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que este efeito também ocorra com as espécies de *Mucor* estudadas.

A via alternativa é regulada por proteínas pertencentes ao sistema complemento, tais como, o Fator I e o Fator H. Este regulador é capaz de ligar-se a diversas estruturas como C3b, CRP, ácidos siálicos e outros poliânions (JOZSI & ZIPFEL, 2008). Também foi relatado que o Fator H só se liga ao ácido siálico se houver a presença de C3b, indicando que deve haver uma possível ligação simultânea (RODRIGUEZ DE CORDOBA & GOICOECHEA DE JORGE, 2008; RODRIGUEZ DE CORDOBA et al., 2004). Esta ligação favorece a clivagem de C3b pelo Fator I, que leva à desativação da enzima C3 convertase da via alternativa. Como ácido siálico já foi evidenciado na superfície de vários fungos (ALVIANO, TRAVASSOS &

SCHAUER, 1999) pesquisamos a presença do Fator H nos esporos das espécies estudadas (Fig. 13). A ausência desse fator indica que essa forma de regulação não ocorre para essas amostras.

Uma consequência direta da regulação da via alternativa é a clivagem de C3b a moléculas menores como C3d, acarretando a interrupção da via. A presença de C3d também foi avaliada nos esporos, por ELISA, e os resultados negativos confirmaram a não participação do Fator H como regulador do complemento ativado por essas espécies (Fig. 13).

A ativação da via clássica foi confirmada pela presença de fragmentos de C4 na superfície dos esporos (Fig. 11). A deposição de IgG e CRP em todas as espécies (Fig. 12) reafirmou a utilização dessa via. Além disso, foi verificado que a distribuição da IgG na superfície desses fungos era confluyente (Figs. 20 e 21). Como há a necessidade de duas moléculas de IgG próximas para que haja a ligação do complexo C1, essa distribuição confluyente reforça a possibilidade de ativação pela via clássica, utilizando complexos imunes. Como estas experiências foram feitas com misturas de soros hígidos, as ligações dessas imunoglobulinas podem ser de natureza inespecífica ou de reação cruzada dos anticorpos naturais.

A deposição de fragmentos de C3 ocorre de forma mais rápida pela via clássica do que pela via alternativa, o que sugere que essa via seria mais valiosa para o processo de defesa (KOZEL, 1998). Entretanto, a produção de anticorpos específicos é mais tardia e portanto o uso da via alternativa ou das lectinas é mais importante para o controle inicial das doenças (GADJEVA et al., 2008; FEARON & AHEARN, 1990; AHEARN & FEARON, 1989). Por outro lado, a formação de complexos imunológicos pode levar a processos inflamatórios sistêmicos decorrentes da ativação do complemento.

A ativação da via clássica por determinados fungos é mediada por anticorpos específicos para constituintes de parede. A ativação desta via por *Candida* sp. ocorre após a ligação de anticorpos anti-manana (ZHANG et al., 1998). Outros fungos como *Aspergillus fumigatus* (STURTEVANT & Latge, 1992; KOZEL et al., 1989), *Aspergillus niger* (ROSAS et al., 2002) e *Paracoccidioides brasiliensis* (DE MESSIAS & MOHREN, 1994) também podem ativar esta via. Entretanto, a especificidade dos anticorpos envolvidos não está completamente descrita.

Além de permitir ativação pela via clássica, tanto CRP quanto IgG podem atuar como opsoninas (CASEY et al., 2008; SOBOTA et al., 2005), sendo reconhecidas por receptores de fagócitos como FcγR (SOBOTA et al., 2005; MOLD & DU CLOS, 2006). O consumo total do complemento revela que deve haver a formação de C3a e C5a, que podem agir como quimioatraentes para neutrófilos e células dendríticas, mediados pela ligação em C3aR e C5aR (MARKIEWSKI & LAMBRIS, 2007; GUTZMER et al., 2006). Isto ainda contribuiria para uma resposta mais eficiente na eliminação desses microrganismos.

A participação da via das lectinas foi verificada pela deposição de MBL nos esporos das espécies em estudo (Fig. 12). A detecção de MBL juntamente com fragmentos de C3 e C4 (Figs. 10 e 11) confirmam a possibilidade da ativação do complemento humano por esta via.

Como MBL tem afinidade por carboidratos ricos em manose e N-acetilglicosamina (RUNZA SCHWAEBLE & MANNEL, 2008; GADJEVA et al., 2004), é provável que estes açúcares façam parte da estrutura de parede dessas espécies. Em 1968, BARTINICKI-GARCIA demonstrou que esporos de *Mucor rouxii* têm manose na composição de sua parede celular. A MBL é uma proteína sérica, com estrutura similar ao C1q, e é encontrada em concentrações variáveis no soro de pessoas

saudáveis. A ligação de MBL às estruturas contendo carboidratos, incluindo mananas de leveduras, leva à ativação independentemente da presença de anticorpos e C1q, resultando na ativação do complemento pela via das lectinas (FUJITA, 2002). Essa via portanto pode ser importante para a defesa inata contra fungos.

Dando continuidade à linha de pesquisa de nosso laboratório (GRANJA, 2005; GRANJA, 2003), o presente trabalho compara a ativação do complemento pelas diferentes formas do fungo *M. polymorphosporus* e o efeito do número de células nos processos. A partir dos resultados obtidos anteriormente modificamos a quantidade de células utilizadas em cada experimento e foi constatado que o aumento na concentração de esporos de 10^6 para 10^8 acarretou na mudança do consumo de aproximadamente 30% para 100%. Isto confirmou as hipóteses que a baixa ativação do complemento, observada anteriormente, era decorrente da quantidade de partículas ativadoras utilizada e não incapacidade das formas de esporo ativarem o complemento. O mesmo foi verificado para as leveduras que passaram de aproximadamente 60% de consumo com 10^6 para 100% em 10^7 . Essa propriedade não foi observada no estudo com micélio, já que o aumento da massa do fungo não modificou o perfil de ativação do complemento neste caso. Esses dados auxiliaram o estudo das outras espécies analisadas neste trabalho.

Constatamos também que a diferença de ordem de grandeza (10^7 leveduras ou 10^8 esporos) é consistente com a diferença de área relativa superficial ($\cong 57 \mu\text{m}^2$ para esporo; $\cong 630 \mu\text{m}^2$ para levedura). Esse dado nos permite ainda comparar resultados obtidos por ELISA para ambas as formas. A deposição de C3 (Fig. 14) nas leveduras foi menor do que em esporos, inclusive quando somente a via alternativa estava atuando. A deposição aparentemente maior de fragmentos de C3, com todas as vias liberadas, deve ser devido à participação das vias clássica e/ou das lectinas inclusive.

A distribuição de fragmentos de C3 nos esporos e na levedura foi confluenta, novamente demonstrando um alto grau de opsonização.

A diferenciação dos esporos de *M. polymorphosporus*, obtida a 4°C nos tempos de 1, 9 ou 18 dias, possibilitou estudar a ativação do complemento diante de diferentes formas (esporos e esporos diferenciados) em hifas na mesma experiência. Com um dia de diferenciação, poucas alterações morfológicas puderam ser observadas (Fig. 19). Com nove dias de diferenciação, várias leveduras com início de formação de hifas e algumas hifas já formadas puderam ser observadas (Fig. 19.II). Finalmente, aos 18 dias de diferenciação, uma grande quantidade de hifas estava presente junto aos esporos sem diferenciação (Fig. 19.III). Essa diferenciação lenta permitiu avaliar a ativação do sistema complemento na coexistência de formas diferentes do *M. polymorphosporus*.

As amostras de esporos *M. polymorphosporus* submetidas à diferenciação a 4°C em diferentes intervalos, apresentaram resultados semelhantes aos obtidos com o esporo em tempo 0. Não houve alteração quanto ao consumo de complemento, que continuou sendo de 100%, e a deposição de fragmentos de C3, avaliada por ELISA, foi estatisticamente igual para todos os tempos de diferenciação. A deposição de C3 foi confluenta sobre os esporos que não sofreram diferenciação. Entretanto, aqueles esporos que se diferenciaram em hifas, não apresentaram fluorescência (Fig. 19). Este dado demonstra que apesar do consumo total do complemento, as hifas de *M. polymorphosporus* não demonstram a presença de aceptores para C3b ou iC3b. Os resultados de fluorescência mostram que à medida que os esporos se diferenciam em hifas, o microorganismo consegue escapar desse mecanismo opsonizante. Esses resultados são confirmados quando se analisa a presença de outros componentes na superfície dessas células.

A presença de C4 foi verificada tanto nos esporos quanto nas leveduras por ELISA indireto. Entretanto, as leveduras apresentaram níveis inferiores de C4, sugerindo que à medida que os esporos se diferenciam há diminuição da ação do complemento como forma de eliminação do microrganismo. Resultados semelhantes foram obtidos quando se pesquisou a presença de MBL, IgG e CRP nos esporos e nas leveduras por ELISA (Fig. 16). Em um trabalho anterior, foi verificado por imunofluorescência que a presença de MBL em *M. polymorphosporus* somente ocorria nos esporos e não nos micélios ou leveduras, após ativação do complemento (Granja, 2005), demonstrando que devem ocorrer alterações estruturais à medida que há diferenciação. Estas diferenças já foram identificadas em *M. rouxii* (BARTINICKI-GARCIA, 1968).

O sistema complemento faz parte dos mecanismos da defesa inata, e sua forte ativação pelos esporos das espécies testadas, bem como da levedura de *M. polymorphosporus*, aumentam a chance de eliminação do fungo pelo hospedeiro. Como já foi relatado anteriormente (GONZALEZ et al., 2002), uma das etapas cruciais para a eliminação do fungo é a fagocitose dos esporos exercida por neutrófilos. MARX, FORSYTH e HENTZ (1982) demonstraram que esporos de diversas espécies de Mucorales são capazes de exercer quimiotaxia para neutrófilos após ativação do sistema complemento humano. É provável que este efeito ocorra também para as espécies de *Mucor*, visto que todo complemento é consumido. A presença de C5a, durante a ativação do complemento por estes esporos, poderia exercer essa atividade quimiotática (KOHL, 2001). Entretanto neste trabalho não foi realizada a pesquisa de fragmentos de C5, não sendo possível especular a respeito dessa hipótese com relação às espécies de *Mucor* estudadas. De qualquer modo a

confirmação desse efeito explicaria porque indivíduos com neutropenia são mais susceptíveis às mucormicoses.

Estudo sobre o crescimento de várias espécies de zigomiceto na presença de soro humano mostrou que no caso de *C. bertholletiae* e *A. corymbifera* havia diminuição do crescimento desses fungos em comparação com um controle sem a presença de soro (ENG et al. 1981). No entanto, *R. arrhizus* apresentou resultados contrários, produzido quase o dobro da massa fúngica quando cultivado com soro. Estas propriedades não pareceram estar relacionadas com a ativação do sistema complemento, já que o mesmo efeito foi obtido usando-se soro inativado. Esses dados podem significar que outras moléculas séricas podem afetar o desenvolvimento das diferentes espécies de zigomicetos e demonstrando a dificuldade de relacionar os processos de defesa inatos com as doenças fúngicas.

A melanina é um pigmento escuro de estrutura complexa que pode ser sintetizada por vários fungos como *C. neoformans*, *A. niger* e *F. pedrosoi*. Tem sido demonstrado que este pigmento está diretamente relacionado à virulência de diversos fungos patogênicos (SANTOS et al., 2007; ROSAS et al., 2002). Não há relatos na literatura sobre a presença de melanina nas espécies estudadas neste trabalho. Entretanto, seus esporos apresentam cor escura e em *M. rouxii* já foi demonstrada a presença deste pigmento (BARTINICKI-GARCIA, 1968). As melaninas de diversos microrganismos apresentam características em comuns. PINTO (2004) demonstrou a reatividade cruzada de anticorpos anti-melanina de *F. pedrosoi* e melanina de *Streptomyces drozdowickzii*. Assim sendo, procuramos verificar a possibilidade desses anticorpos reconhecerem estruturas semelhantes na superfície em espécies de *Mucor* pela técnica de imunofluorescência.

Foi possível verificar fluorescência nos esporos de todas as espécies testadas (Figs. 22 e 23), sugerindo, de fato, a presença de melanina nessas amostras. Entretanto, verificou-se que alguns esporos não estavam fluorescentes (Figs. 22 e 23). Esses resultados podem ser relacionados com os obtidos para os esporos em diferenciação, nos quais constatou-se o aumento do número de esporos que não apresentavam fluorescência conforme o maior tempo de diferenciação (Fig. 23). As formas de levedura e hifa do *M. polymorphosporus* não apresentaram fluorescência, ou seja, provavelmente não apresentam melanina. Estes dados indicam que provavelmente há perda de melanina da estrutura superficial destes fungos à medida que eles se diferenciam.

PINTO (2004) e ROSAS et al. (2002) demonstraram que melaninas fúngicas são capazes de ativar o sistema complemento. PINTO (2004) demonstrou que amostras de *F. pedrosoi*, hipopigmentadas, consumiam menos o complemento que amostras pigmentadas, indicando uma correlação direta da melanina com a superior ativação do sistema complemento. A melanina deste fungo foi ainda capaz de realizar ativação pela via clássica e das lectinas, demonstrada pela presença de C4 e MBL. ROSAS et al. (2002) demonstraram que o depósito de C3b em amostras pigmentadas de *C. neoformans* era maior do que em amostras não pigmentadas.

Os esporos de todas as espécies estudadas neste trabalho foram capazes de ativar as vias clássica e/ou das lectinas, confirmadas pela deposição de C4 e MBL (Figs. 11 e 12). Os baixos níveis de deposição de C4 e MBL na levedura, correlacionados com a baixa reatividade das leveduras com anticorpos anti-melanina, sugere que a ativação do complemento pelos esporos seja intensificada pela presença desse pigmento nos esporos. A presença de fragmentos de C3 depositados nas

leveduras, também foi inferior àquela detectada nos esporos, sugerindo que a melanina pode facilitar a ligação de fragmentos de C3 aos esporos.

As diferentes espécies escolhidas para esse estudo possuem diferentes incidências em casos clínicos. Isto ajudaria a compreender melhor o processo evolutivo da doença, utilizando o sistema complemento como base. Foi observado que os perfis de ativação por esporos dessas espécies são semelhantes (Fig. 7), entretanto a forma micelial apresentou dois perfis distintos de ativação quando todas as vias estão liberadas (Fig. 5). Nota-se que justamente a espécie com grande número de casos clínicos relatados de mucormicose, *M. circinelloides*, e a espécie sem relação direta com a doença, *M. plumbeus*, ficaram agrupadas. MARX, FORSYTH e HENTZE (1982) demonstraram que amostras clínicas e ambientais de Mucorales possuíam comportamentos semelhantes de quimiotaxia mediada pelo sistema complemento. Essas características podem ressaltar que apesar de não haver casos clínicos relatados com *M. plumbeus*, é possível que esta espécie apareça em casos clínicos futuros.

Como os fungos da ordem Mucorales são classificados como “de baixa periculosidade”, vários pesquisadores usam esses fungos para descobrir aplicações industriais. O *M. polymorphosporus* já foi utilizado para biotransformação de artemisinina (ZHAN et al., 2002), ácido glicirretínico (XIN et al., 2006), desidrocostuslactona (MA, WU & GUO, 2006) e alantolactona (XIN et al., 2008). *M. plumbeus* foi usado na biotransformação de produtos naturais, como: jhanol (FRAGA et al., 1998), teideadiol (FRAGA et al., 2003), maalióxido (WANG et al., 2006) e ácido mulin-11,13-dien-20-óico (ARECHE et al., 2008). *M. circinelloides* já foi utilizado na produção de etanol, a partir de pentoses e hexoses, (LUBBEHUSEN, NIELSEN & MCINTYRE, 2004) e enzimas como endoglucanases (SHIMONAKA et

al., 2006). Entretanto, esse uso deve ser feito com cautela já que estes fungos são, no mínimo, patógenos oportunistas em potencial.

Conclusão

- Os fungos *M. polymorphosporus*, *M. ramosissimus*, *M. plumbeus* e *M. circinelloides* são capazes de ativar o sistema complemento.
- A ativação do complemento depende da etapa de diferenciação desses fungos.
- Dois perfis de ativação foram demonstrados pelas formas miceliais: *M. polymorphosporus* e *M. ramosissimus* possuem um perfil de ativação mais alto; *M. plumbeus* e *M. circinelloides* possuem menor capacidade de consumir o complemento.
- Os esporos de todas as espécies estudadas comportaram-se de forma semelhante, consumindo totalmente o complemento envolvendo todas as vias de ativação.
- Esporos e leveduras de *M. polymorphosporus* ativam o sistema complemento humano, enquanto que a forma micelial apresenta baixa capacidade de ativação.
- A ativação pela levedura de *M. polymorphosporus* é predominantemente pela via alternativa.
- Aparentemente, não há regulação negativa da via alternativa na ativação pelos esporos das diferentes espécies.
- Anticorpo anti-melanina de *F. pedrosoi* reage cruzADAMENTE com os esporos das espécies testadas, mas não nas leveduras e hifas de *M. polymorphosporus*.

Referências Bibliográficas

- ABDEL-HAFEZ, S. I . I. **Composition of fungal flora of four cereal grains in Saudi Arabia.** Mycopathologia. 85: 53-7. 1984.
- ADAM, R. D., HUNTER, G., DITOMASSO, J. **Mucormycosis: emerging prominence of cutaneous infections.** Clinical Infectious Diseases. 19: 67-76. 1994.
- AHEARN, J. M., FEARON, D. T. **Structure and function of the complement receptors CR1 (CD35) and CR2 (CD21).** Advances in Immunology. 46: 183-219. 1989.
- AHMAD, M., PYARAM, K., MULLICK, J., SAHU, A. **Viral complement regulators: the expert mimicking swindlers.** Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 44: 331-43. 2007.
- ALFANO, C., CHIUMMARIELLO, S., DESSY, L. A., BISTONI, G., SCUDERI, N. **Combined mucormycosis and aspergillosis of the rhinocerebral region.** In Vivo. 20:311-5. 2006.
- ALONSO, A., RODRIGUEZ, S. R., RODRIGUEZ, S. M., MOUCHIAN, K., ALBONICO, J. F., IRANETA, S. G. **Interstitial pneumonites induced in GUINEA pigs by the antigens of *Rhizopus nigricans*.** Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. 7: 103-9. 1997.
- ALVES, M. H., CAMPOS-TAKAKI, G. M., PORTO, A. L. F., MILANEZ, A. I. **Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease.** Brazilian Journal of Microbiology. 33: 325-330. 2002.
- ALVIANO, C. S., TRAVASSOS, L. R., SCHAUER, R. **Sialic acids in fungi: a minireview.** Glycoconjugate Journal. 16: 545-54. 1999.
- ANDRADE, V. A., SARUBO, L. A., FUKUSHIMA, K., MIYAJI, M., NISHIMURA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate.** Brazilian Journal of Microbiology. 33: 106-10. 2002.
- ARCHER, C. **The use of honeybees as a transfer vector for core rot in apples.** Rural Industries Research and Development Corporation. 2002.
- ARECHE, C., LOYOLA, L. A., BORQUEZ, J., ROVIROSA, J., SAN-MARTIN, A. **Microbial transformation of the diterpene mulin-11,13-dien-20-oic acid by *Mucor plumbeus*.** Magnetic Resonance in Chemistry. 46: 765-8. 2008.
- ATKINSON, J. P., FRANK, M. M. **Bypassing complement: evolutionary lessons and future implications.** Journal of Clinical Investigation. 116: 1215-8. 2006.

- BAKR, A., Wafa, E., FOUda, A., ELAGROUDY, A., GHEITH, O., SOBh, M., SHOKEIR, A., GHONEIM, M. **Successful treatment of mucormycosis in a renal allograft recipient.** *Clinical and Experimental Nephrology.* 12: 207-10. 2008.
- BARRINGTON, R., ZHANG, M., FISCHER, M., CARROLL, M. C. **The role of complement in inflammation and adaptive immunity.** *Immunological Reviews.* 180: 5-15. 2001.
- BARTINICKI-GARCIA, S. **Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi.** *Annual Review of Microbiology.* 22: 87-108. 1968.
- BARTINICKI-GARCIA, S., NICKERSON, W. J. **Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*.** *Journal of Bacteriology.* 84: 841-58. 1962.
- BARTINICKI-GARCIA, S., NICKERSON, W. J. **Thiamine and nicotinic acid: Anaerobic growth factors of *Mucor rouxii*.** *Journal of Bacteriology.* 82: 142-8. 1961.
- BENITEZ, T., RINCON, A. M., LIMON, M. C., CODON, A. C. **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains.** *International Microbiology.* 7: 249-60. 2004.
- BENNY, G. L. **Classical morphology in zygomycete taxonomy.** *Canadian Journal of Botany.* 73: 725-730. 1995.
- BEUTLER, B. **Innate immunity: an overview.** *Molecular Immunology.* 40:845-59. 2004.
- BHADURI, S., KURRELE, E., VANEK, E., SPANEL, R. **Mucormycosis in the immunocompromised host.** *Infection.* 11: 170-2. 1983.
- BHAKDI, A. F., TRANUM-JENSEN, J. **Complement lysis: a hole is a hole.** *Immunology Today.* 12: 318-20. 1991.
- BLANCH, A., ROCHE, O., URRUTIA, I., GAMBOA, P., FONTÁN, G., LÓPEZ-TRASCASA, M. **First case of homozygous C1 inhibitor deficiency.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 118: 1330-5. 2006.
- BOELAERT, J. R., DE LOCHT M., VAN CUTSEM J., KERRELS V., CANTINIEAUX B., VERDONCK A., VAN LANDUYT H. W., SCHNEIDER Y. J.. **Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. In vitro and in vivo animal studies.** *Journal of Clinical Investigation.* 91: 1979-1986. 1993.
- BOELAERT, J. R., FENVES, A. Z., COBURN, J. W. **Deferoxamine therapy and mucormycosis in dialysis patients: report of an international registry.** *American Journal of Kidney Diseases.* 18: 660-7. 1991.

- BORVE, J., STENSVAND, A. **Use of a Plastic Rain Shield Reduces Fruit Decay and Need for Fungicides in Sweet Cherry.** *Plant Diseases*. 87: 523-528. 2003.
- BOS, I. G., HACK, C. E., ABRAHAMS, J. P. **Structural and functional aspects of C1-inhibitor.** *Immunobiology*. 205: 518-33. 2002.
- BOUZA, E., MUNOZ, P., GUINEA, J. **Mucormycosis: na emerging disease?** *CMI*. 12: 7-23. 2006.
- BRAVO, M., FERRER, S., ETCHARD, M., TRUJILLO, S. **Rhinocerebral mucormycosis. Report of four cases.** *Revista Medica de Chile*. 127: 712-8. 1999.
- BROWN, A. E., **Overview of fungal infections in cancer patients.** *Seminars in Oncology*. 17: 2-5. 1990.
- BULLOCK, J. D., JAMPOL, L. M., FEZZA, A. J. **Two cases of orbital phycomycosis with recovery.** *American Journal of Ophthalmology*. 78: 811-815. 1974.
- CALICH, V. L., KIPNIS, T. L., MARIANO, M., NETO, C. F., DIAS DA SILVA, W. D. **The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection.** *Clinical Immunology and Immunopathology*. 12: 12-30. 1979.
- CAMPBELL, W. D., LAZOURA, E., OKADA, N., OKADA, H. **Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N.** *Microbiology and Immunology*. 46: 131-4. 2002.
- CASEY, R., NEWCOMBE, J., MCFADDEN, J., BODMAN-SMITH, K. B. **The acute-phase reactant C-reactive protein binds to phosphorylCHOLINE-expressing *Neisseria meningitidis* and increases uptake by human phagocytes.** *Infection and Immunity*. 76: 1298-304. 2008.
- CHAN-TACK, K. M., NEMOY, L. L., PERENCEVICH, E. N. **Central venous catheter-associated fungemia secondary to mucormycosis.** *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 37: 925-7. 2005.
- CHANDRA, S., WOODGYER, A. **Primary cutaneous zygomycosis due to *Mucor circinelloides*.** *Australasian Journal of Dermatology*. 43: 39-42. 2002.
- CHATTERJEE, S., ADHYA, M., GUHA, A. K., CHATTERJEE, B. P. **Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization.** *Process Biochemistry*. 40: 395-400. 2005.
- CHAYAKULKEEREE, M., GHANNOUM, M. A., PERFECT, J. R. **Zygomycosis: the re-emerging fungal infection.** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 25: 215-29. 2006.

- CHO, S. J., RAMACHANDRAN, G., BANERJEE, S., RYAN, A. D., ADGATE, J. L. **Seasonal variability of culturable fungal genera in the house dust of inner-city residences.** Journal of Occupational and Environmental Hygiene. 5: 780-9. 2008.
- CHOLIN, S., GERARD, N. P., STRANG, C. J., DAVIS, A. E. **Biologic activity of a C2-derived peptide. Demonstration of a specific interaction with guinea pig lung tissues.** Journal of Immunology. 142: 2401-4. 1989.
- COONEY, N. M., KLEIN, B. S. **Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all.** Current Opinion in Microbiology. 11: 511-6. 2008.
- COOPER, B. H. **A case of pseudoparacoccidioidomycosis: Detection of the yeast phase of *Mucor circinelloides* in a clinical specimen.** Mycopathologia. 97: 189-93. 1987.
- COOPER, N. R. **The Classical complement pathway: activation and regulation of the first component.** Advances in Immunology. 37: 151-216. 1985.
- DANTIGNY, P., MARÍN, S., BEYER, M., MAGAN, N. **Mould germination: data treatment and modelling.** International Journal of Food Microbiology. 114: 17-24. 2007.
- DATEMA, R., VAN DEN ENDE, H., WESSELS, J. G. H. **The Hyphal Wall of *Mucor mucedo*: 1. Polyanionic Polymers.** European Journal of Biochemistry. 80: 611-9. 1977.
- DAVIES, A. **Policing the membrane: cell surface proteins wich regulate complement.** Research in Immunology. 147: 82-7. 1996.
- DEGN, S. E., THIEL, S., JENSENIUS, J. C. **New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation.** Immunobiology. 212: 301-11. 2007.
- DE LUCCA AJ. **Harmful fungi in both agriculture and medicine.** Revista Iberoamericana de Micologia. 24: 3-13. 2007.
- DE MESSIAS, I. T., MOHREN, D. **Classical and alternative complement pathway activation in paracoccidioidomycosis.** Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. 4: 91-5. 1994.
- DIAMOND, R. D., OPPENHEIM, F., NAKAGAWA, Y., KRZESICKI, R., HAUDENSCHILD, C. C. **Properties of a product of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae that inhibits contact between the fungi and human neutrophils in vitro.** Journal of Immunology. 125: 2797-804. 1980.
- DIAMOND, R. D., MAY, J. E., KANE, M., FRANK, M. M., BENNETT, J. E. **The role of late complement components and the alternate complement pathway**

- in experimental cryptococcosis.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 144: 312-15. 1973.
- DIWAKAR, A., DEWAN, R. K., CHOWDHARY, A., RANDHAWA, H. S., KHANNA, G., GAUR, S. N. **Zygomycosis--a case report and overview of the disease in India.** Mycoses. 50: 247-54. 2007.
- DOCTOR FUNGUS. Disponível em <http://www.doctorfungus.org>. Consultado em 15 de novembro de 2008.
- DONG, Z. M., MURPHY, J. W. **Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils.** Infection and Immunity.; 65: 557-63. 1997.
- DOW, J. M., RUBERY, P. H. **Chemical fractionation of the cell walls of mycelial and yeast-like forms of *Mucor rouxii*: a comparative study for the polysaccharide and glycoprotein components.** Journal of General Microbiology. 99: 29-41. 1977.
- DUMESTRE-PERARD, C., PONARD, D., ARLAUD, G. J., MONNIER, N., SIM, R. B., COLOMB, M. G. **Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma.** Molecular Immunology. 39: 465-73. 2002.
- ELMER, G. W., NICKERSON, W. J. **Nutritional requirements of growth and yeast-like development of *Mucor rouxii* under carbon dioxide.** Journal of Bacteriology. 101: 595-602. 1970.
- ENDO, Y., TAKAHASHI, M., FUJITA, T. **Lectin complement system and pattern recognition.** Immunobiology. 211: 283-93. 2006.
- ENG, R. H., CORRADO, M., CHIN, E. **Susceptibility of Zygomycetes to human serum.** Sabouraudia. 19: 111-5. 1981.
- ESSER, A. F. **Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches.** Immunology Today. 12: 316-18. 1991.
- EUCKER, J., SEZER, O., GRAF, B., POSSINGER, K. **Mucormycoses.** Mycoses. 44: 253-60. 2001.
- FEARON, D. T., AHEARN, J. M. **Complement receptor type 1(C3b/C4b receptor; CD35) and complement receptor type 2 (C3d/Epstein-Barr virus receptor; CD21).** Current Topics in Microbiology and Immunology. 153: 83-98. 1990.
- FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., THRANE, U. **Moulds in food spoilage.** International Journal of Food Microbiology. 33: 85-102. 1996.
- FIZPATRICK, F. W., DICARLO, F. J. **Zyimosan.** Annals of the New York Academy of Sciences. 118: 235-61. 1964.

- FRAGA, B. M., GONZALEZ, P., GUILLERMO, R., HERNANDEZ, M. G. **Microbiological transformation of manoyl oxide derivatives by *Mucor plumbeus***. Journal of Natural Products. 61: 1237-41. 1998.
- FRAGA, B. M., HERNANDEZ, M. G., ARTEGA, J. M., SUAREZ, S. **The microbiological transformation of the diterpenes dehydroabietanol and teideadiol by *Mucor plumbeus***. Phytochemistry. 63: 663-8. 2003.
- FRANK, M. M., MAY, J., GAITHER, T., ELLMAN, L. **In vitro studies of complement function in sera of C4-deficient guinea pigs**. Journal of Experimental Medicine. 134: 176-87. 1971.
- FRATER, J. L., HALL, G. S., PROCOP, G. W. **Histologic features of zygomycosis: emphasis on perineural invasion and fungal morphology**. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 125: 375-8. 2001.
- FUJITA, T. **Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity**. Nature Reviews Immunology. 2: 346-53. 2002.
- GADJEVA, M. G., ROUSEVA, M. M., ZLATAROVA, A. S., REID, K. B., KISHORE, U., KOJOUHAROVA, M. S. **Interaction of Human C1q with IgG and IgM: Revisited**. Biochemistry. 2008
- GADJEVA, M., TAKAHASHI, K., THIEL, S. **Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule**. Molecular Immunology. 41:113-21. 2004.
- GADJEVA, M., THIELS, S., JENSENIUS, J. C. **The mannan binding lectin pathway of the innate immune response**. Current Opinion in Immunology. 13: 74-8. 2001.
- GASQUE, P. **Complement: a unique innate immune sensor for danger signals**. Molecular Immunology. 41:1089-98. 2004.
- GATES, M. A., KOZEL, T. R. **Differential localization of complement component 3 within the capsular matrix of *Cryptococcus neoformans***. Infection and Immunity. 74: 3096-106. 2006.
- GAVIRIA J. M., GROHSKOPF, L. A., BARNES, R., ROOT, R. K. **Successful treatment of rhinocerebral zygomycosis: a combined strategy approach**. Clinical Infectious Diseases. 28: 160-1. 1999.
- GELFAND, J. A., HURLEY, D. L., FAUCI, A. S., FRANK, M. M. **Role of complement in host defense against experimental disseminated candidiasis**. Journal of Infectious Diseases. 138: 9-16. 1978.
- GHIRAN, I., TYAGI, S. R., KLICKSTEIN, L. B., NICHOLSON-WELLER, A. **Expression and function of C1q receptors and C1q binding proteins at the cell surface**. Immunobiology. 168: 5222-32. 2002.

- GIANNAKIS, E., MALE, D. A., ORMSBY, R. J., MOLD, C., JOKIRANTA, T. S., RANGANATHAN, S., GORDON, D. L. **Multiple ligand binding sites on domain seven of human complement factor H.** *International Immunopharmacology*. 1: 433-43. 2001.
- GOLDSBY, R. A. **The Complement System.** In: *Kuby Immunology*, 329-349. By Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. Nova Iorque, W. H. Freeman and Company, Estados Unidos. 2000.
- GONZALEZ, C. E., RINALDI, M. G., SUGAR, A. M. **Zygomycosis.** *Infectious Diseases Clinical North America*. 16: 895-914. 2002.
- GONZÁLEZ-RUBIO, C., GONZÁLEZ-MUÑIZ, R., JIMÉNEZ-CLAVERO, M. A., FONTÁN, G., LÓPEZ-TRASCASA, M. **Factor J, an inhibitor of the classical and alternative complement pathway, does not inhibit esterolysis by factor D.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1295: 174-8. 1996.
- GOTZE, O., MULLER-EBERHARD, H. J. **The alternative pathway of complement activation.** *Advances in Immunology*. 24: 1-35. 1976.
- GRANJA, L. F. Z., PINTO, L., ALVIANO, D. S., SILVA, M. H., ALVIANO, C. S., EJZEMBERG, R. **Activation of Human Complement System by *Mucor polymorphosporus* Mycelia.** *The Open Mycology Journal*. 2: 94-99. 2008.
- GRANJA, L. F. Z. **Estudo da ativação do complemento humano *in vitro* sobre as diferentes formas do fungo *Mucor polymorphosporus*.** Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro. 2005.
- GRANJA, L. F. Z. **Ação do complemento humano sobre o fungo *Mucor polymorphosporus*.** Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro. 2003.
- GULATI, S., SASTRY, K., JENSENIUS, J.C., RICE, P. A., RAM, S. **Regulation of the mannan-binding lectin pathway of complement on *Neisseria gonorrhoeae* by C1-inhibitor and α_2 -macroglobulin.** *Journal of Immunology*. 168: 4078-86. 2002.
- GUTIERREZ, F., RUIZ-HERRERA, J. **Mannosyl transferase from yeast and hyphal forms of *Mucor rouxii*.** *Experimental Mycology*. 3: 351-62. 1979.
- GUTZMER, R., KÖTHER, B., ZWIRNER, J., DIJKSTRA, D., PURWAR, R., WITTMANN, M., WERFEL, T. **Human plasmacytoid dendritic cells express receptors for anaphylatoxins C3a and C5a and are chemoattracted to C3a and C5a.** *Journal of Investigative Dermatology*. 126: 2422-9. 2006.
- HALL, L., WOHLFIEL, S., ROBERTS, G. D. **Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of**

- filamentous fungi encountered in the clinical laboratory.** Journal of Clinical Microbiology. 42: 622-6. 2004.
- HANSCH, G. M., HAMMER, C. H., MAYER, M. M. & SHIN, M. L. **Activation of the fifth and sixth component of the complement system: similarities between C5b6 and C(56)a with respect to lytic enhancement by cell-bound C3b or A2C, and species preferences of target cell.** Journal of Immunology. 127: 999-1002. 1981.
- HARBARTH, S., BURKE, J. P., LLOYD, J. F., EVANS, R. S., PESTOTNIK, S. L., SAMORE, M. H. **Clinical and economic outcomes of conventional amphotericin B-associated nephrotoxicity.** Clinical Infectious Diseases. 35: 120-7. 2002.
- HARI KRISHNA, S., MANOHAR, B., DIVAKAR, S., PRAPULLA, S. G., KARANTH, N. G. **Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology.** Enzyme and Microbial Technology. 26: 131-136. 2000.
- HENWICK, S., HETHERINGTON, S. V., PATRICK, C. C. **Complement binding to *Aspergillus conidia* correlates with pathogenicity.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 122: 27-35. 1993.
- HERBRECHT, R., LETSCHER-BRU, V., BOWDEN, R. A., KUSNE, S., ANAISSIE, E. J., GRAYBILL, J. R., NOSKIN, G. A., OPPENHEIM, ANDRES, E., PIETRELLI, L. A. **Treatment of 21 cases of invasive mucormycosis with amphotericin B colloidal dispersion.** European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 20: 460-6. 2001.
- HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LÜCKING, R., THORSTEN LUMBSCH, H., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y. C., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K. D., IRONSIDE, J. E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K. H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J. M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHÜSSLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y. J., ZHANG, N. **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi.** Mycological Research. 111: 509-47. 2007.

- HOLERS, V. M., THURMAN, J. M. **The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting.** *Molecular Immunology.* 41:147-52. 2004.
- HORRE, R., JOVANIC, B., HERFF, S., MARKLEIN, G., ZHOU, H., HEINZE, I., DE HOOG, G. S., RUCHEL, R., SCHAAL, K. P. **Wound infection due to *Absidia corymbifera* and *Candida albicans* with fatal outcome.** *Medical Mycology.* 42: 373-8. 2004.
- HUBER-LANG, M., SARMA, J. V., ZETOUNE, F. S., RITTIRSCH, D., NEFF, T. A., MCGUIRE, S. R., LAMBRIS, J. D., WARNER, R. L., FLIERL, M. A., HOESEL, L. M., GEBHARD, F., YOUNGER, J. G., DROUIN, S. M., WETSEL, R. A., WARD, P. A. **Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway.** *Nature Medicine.* 12: 682-7. 2006.
- INDERLIED, C. B., SYPHERD, P. S. **Glucose metabolism and dimorphism in *Mucor*.** *Journal of Bacteriology.* 133: 1282-6. 1978.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org/>. Consultado em 15 de novembro de 2008.
- IP, W. K., LAU, Y. L. **Role of mannose-binding lectin in the innate defense against *Candida albicans*: enhancement of complement activation, but lack of opsonic function, in phagocytosis by human dendritic cells.** *Journal of Infectious Diseases.* 190: 632-40. 2004.
- IWAKI, D., FUJITA, T. **Production and purification of recombinant of mouse MASP-2 and sMAP.** *Journal of Endotoxin Research.* 11: 47-50. 2005.
- IWEN, P. C., SIGLER, L., NOEL, R. K., FREIFELD, A. G. ***Mucor circinelloides* was identified by molecular methods as a cause of primary cutaneous zygomycosis.** *Journal of Clinical Microbiology.* 45: 636-40. 2007.
- JOINER, K. A. **Complement evasion by bacteria and parasites.** *Annual Reviews of Microbiology.* 42: 201-30. 1988.
- JÓZSI, M., ZIPFEL, P. F. **Factor H family proteins and human diseases.** *Trends in Immunology.* 29:380-7. 2008
- KAMINISHI, H., MIYAGUCHI, H., TAMAKI, T., SUENAGA, N., HISAMATSU, M., MIHASHI, I., MATSUMOTO, H., MAEDA, H., HAGIHARA, Y. **Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase.** *Infection and Immunity.* 63: 984-8. 1995.
- KAUFFMAN, C. A. **Fungal infections.** *Proceedings of the American Thoracic Society.* 3: 35-40. 2006.

- KELLY, R. M., CHEN, J., YAUCH, L. E., LEVITZ, S. M. **Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans***. *Infection and Immunity*. 73: 592-8. 2005.
- KOHL, J. **Anaphylatoxins and infectious and non-infectious diseases**. *Molecular Immunology*. 38: 175-87. 2001.
- KOZEL, T. R. **Complement activation by pathogenic fungi. Immunity to fungi**. *Research in Immunology*. 149: 309-20. 1998.
- KOZEL, T. R., BROWN, R. R., PFROMMER, G. S. **Activation and binding of C3 by *Candida albicans***. *Infection and Immunity*. 55: 1890-4. 1987
- KOZEL, T. R., WEINHOLD, L. C., LUPAN, D. M. **Distinct characteristics of initiation of the classical and alternative complement pathways by *Candida albicans***. *Infection and Immunity*. 64: 3360-8. 1996.
- KOZEL, T. R., WILSON, M. A., FARREL, T. P., LEVITZ, S. M. **Activation of C3 and binding to *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae**. *Infection and Immunity*. 57: 2412-17. 1989.
- LADOR, N., POLACHECK, I., GURAL, A., SANATSKI, E., GARFUNKEL, A. A. **A trifungal infection of the mandible: case report and literature review**. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 101: 451-6. 2006.
- LAW, S. K., MINICH, T. M., LEVINE, R. P. **Binding reaction between the third human complement protein and small molecules**. *Biochemistry*. 20:7457-63. 1981.
- LESTER, F. T. **Childhood diabetes mellitus in Ethiopians**. *Diabetic Medicine*. 3: 278-80. 1986.
- LILLEGARD, J. B., SIM, R. B., THORKILDSON, P., GATES, M. A., KOZEL, T. R. **Recognition of *Candida albicans* by mannan-binding lectin in vitro and in vivo**. *Journal of Infectious Diseases*. 193: 1589-97. 2006.
- LIMA, A. O., SILVA, W. D. **Provas Sorológicas com Complemento**. *In: Imunologia, Imunopatologia, Alergia-Métodos*, 79-113. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Brasil. 1970.
- LINDAHL, G., SJOBRING, U., JOHNSON, E. **Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms**. *Current Opinion in Immunology*. 12: 44-51. 2000.
- LISZEWSKI, M. K., FARRIES, T. C., LUBLIN, D. M., ROONEY, I. A., ATKINSON, J. P. **Control of the complement system**. *Advances in Immunology*. 61: 201-83. 1996.

- LOCKWOOD, L. B. **Organic Acid Production**. In: The Filamentous Fungi, Vol. I: Industrial Mycology, 140-157. Eds. J. E. Smith and D. R. Berry. London, Arnold, England. 1975.
- LOOS, M., BITTER-SUERMAN, D., DIERICH, M. **Interaction of the first (C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement with different preparations of bacterial lipopolysaccharides and with lipid A**. Journal of Immunology. 112: 935-40. 1974.
- LOVCHIK, J. A., LIPSCOMB, M. F. **Role for C5 and neutrophils in the pulmonary intravascular clearance of circulating *Cryptococcus neoformans***. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 9: 617-27. 1993.
- LOWRY, P. D., GILL, C. O. **Temperature and water activity minima for growth of spoilage moulds from meat**. Journal of Applied Bacteriology. 56: 193-9. 1984.
- LU, J. H., THE, B. K., WANG, L., WANG, Y. N., TAN, Y. S., LAI, M. C., REID, K. B. **The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity**. Cellular and Molecular Immunology. 5: 9-21. 2008.
- LUBBEHUSEN, T. L., NIELSEN, J., MCINTYRE, M. **Aerobic and anaerobic ethanol production by *Mucor circinelloides* during submerged growth**. Applied Microbiology and Biotechnology. 63: 543-8. 2004.
- LYON, F. L., HECTOR, R. F., DOMER, J. E. **Innate and acquired immune responses against *Candida albicans* in congenic B10.D2 mice with deficiency of the C5 complement component**. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 24: 359-67. 1986.
- MA, X. C., WU, L. J., GUO, D. A. **Microbial transformation of dehydrocostuslactone by *Mucor polymorphosporus***. Journal of Asian Natural Products Research. 8: 713-8. 2006 .
- MADIGAN, M. T. **Eukaryotic Microorganisms**. In: Brock biology of microorganisms, 720-39. By Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. Nova Jersey, Prentice Hall, Estados Unidos. 2000.
- MALDONADO, M. C., SANTA RUNCO, R., NAVARRO, A. R. **Isolation, identification and antifungal susceptibility of lemon pathogenic and non pathogenic fungi**. Revista Iberoamericana de Micologia. 22: 57-9. 2005.
- MALMSTEN, M., SCHMIDTCHEN, A. **Antimicrobial C3a--biology, biophysics, and evolution**. Advances in Experimental Medicine and Biology. 598: 141-58. 2007.

- MARKIEWSKI, M. M., LAMBRIS, J. D. **The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight.** American Journal of Pathology. 171: 715-27. 2007.
- MARX, R. S., FORSYTH, K. R., HENTZ, S. K. **Mucorales species activation of a serum leukotactic factor.** Infection and Immunity. 38: 1217-22. 1982.
- MATSUSHITA, M., MATSUSHITA, A., ENDO, Y., NAKATA, M., KOJIMA, N., MIZUOCHI, T., FUJITA, T. **Origin of the classical complement pathway: Lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 101: 10127-31. 2004.
- MATSUSHITA, M., FUJITA, T. **Ficolins and the lectin complement pathway.** Immunological Reviews. 180:78-85. 2001.
- MAYER, M. M. **Complement and complement fixation.** In: Experimental Immunochemistry, 133-240. By Kabat, E. A., Mayer, M. M. Springfield, Thomas Publisher, Estados Unidos. 1961.
- MERI, S., PANGBURN, M. K. **Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: Regulation via sialic acid/polyanion binding site on factor H.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 87: 3982-86. 1990.
- MILLATI, R., EDEBO, L., TAHERZADEH, M. J. **Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates.** Enzyme and Microbial Technology. 36: 294-300. 2005.
- MINTZ, C. S., SCHULTZ, D. R., ARNOLD, P. I., JOHNSON, W. ***Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway.** Infection and Immunity. 60: 2769-76. 1992.
- MIRONENKO, N. V., ALEKHINA, I. A., ZHDANOVA, N. N., BULAT, S. A. **Intraspecific variation in gamma-radiation resistance and genomic structure in the filamentous fungus *Alternaria alternata*: a case study of strains inhabiting Chernobyl reactor No. 4.** Ecotoxicology and Environmental Safety. 45: 177-87. 2000.
- MITCHELL, T. G. **Medical Mycology.** In: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 621-657. By Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J.S., Morse, S. A. Nova Iorque, McGraw-Hill Companies, Inc., Estados Unidos. 2007.
- MOLD, C., DU CLOS, T. W. **C-reactive protein increases cytokine responses to *Streptococcus pneumoniae* through interactions with Fc gamma receptors.** Journal of Immunology. 176: 7598-604. 2006
- MONARI, C., KOZEL, T. R., BISTONI, F., VECCHIARELLI, A. **Modulation of C5aR expression on human neutrophils by encapsulated and acapsular *Cryptococcus neoformans*.** Infection and Immunity. 70: 3363-70. 2002.

- MULLER-EBERHARD, H. J. **Molecular organization and function of the complement system.** Annual Review of Biochemistry. 57: 321-47. 1988
- NAUTA, A. J., DAHA, M. R., KOOTEN, C. V., ROOS, A. **Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins.** TRENDS in Immunology. 24: 148-54. 2003.
- NEWMAN, S. L., MIKUS, L. K. **Deposition of C3b and iC3b onto particulate activators of the human complement system. Quantitation with monoclonal antibodies to human C3.** Journal of Experimental Medicine. 161: 1414-31.1985.
- NIMRICHTER, L., CERQUEIRA, M. D., LEITÃO, E. A., MIRANDA, K., NAKAYASU, E. S., ALMEIDA, S. R., ALMEIDA, I. C., ALVIANO, C. S., BARRETO-BERGTER, E., RODRIGUES, M. L. **Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of Fonsecaea pedrosoi ceramide monohexosides.** Infection and Immunity. 73: 7860-8. 2005.
- NONAKA, M., YOSHIZAKI, F. **Primitive complement system of invertebrates.** Immunological Reviews. 198: 203-15. 2004.
- NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A. **Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50: 3519–28. 2006.
- NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A. **The contribution of melanin to microbial pathogenesis.** Cellular Microbiology. 5: 203–23. 2003.
- NOSARI, A., ORESTE, P., MONTILLO, M., CARRAFIELLO, G., DRAISCI, M., MUTI, G., MOLTENI, A., MORRA, E. **Mucormycosis in hematologic malignancies: an emerging fungal infection.** Haematologica. 85: 1068-1071. 2000.
- OGLESBY, T. J., ACCAVITTI, M.A., VOLANAKIS, J. E. **Evidence for a C4b binding site on the C2b domain of C2.** Journal of Immunology. 141: 926-31. 1988.
- ORLOWSKI, M. **Mucor dimorphism.** Microbiological Reviews. 55: 234-58. 1991.
- PAGANOL, L., RICCI, P., TONSO, A. **Mucormycosis in patients with haematological malignancies: a retrospective clinical study of 37 cases.** Brazilian Journal of Haematology. 99: 331-6. 1997.
- PATTERSON, T. F., DRUTZ, D. J. **Fungal diseases.** *In*: Medical Immunology, 655-672. Parlow, T.G., Stites, D. P., Terr, A. I., Imboden, J. D. Stamford, McGraw-Hill/Appleton & Lange, Estados Unidos. 2001.
- PAULO DE OLIVEIRA, J. E., MILECH, A. **A fatal case of gastric mucormycosis and diabetic ketoacidosis.** Endocrine Practice. 8: 44-6. 2002.

- PIECKOVÁ, E., WILKINS, K. **Airway toxicity of house dust and its fungal composition.** *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 11: 67-73. 2004.
- PILLEMER, L., BLUM, L., LEON, I. H., ROSS, O. A., TODD, E. W., WARDLAW, A. C. **Properdin system and immunity: demonstration and isolation of new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena.** *Science.* 120: 279-85. 1954.
- PINTO, M. R., MELILLO, D., GIACOMELLI, S., SFYROERA, G., LAMBRIS, J. D. **Ancient origin of the complement system: emerging invertebrate models.** *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 598:372-88. 2007.
- PINTO, L. **Estudos da Ativação do Sistema Complemento Humano in vitro pela Melanina Extraída de Micélios do Fungo *Fonsecaea pedrosoi*.** Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro. 2004.
- PONTON, J. **The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin.** *Revista Iberoamericana de Micologia.* 25: 78-82. 2008.
- PONTON, J., OMAETXEBARRIA, M. J., ELGUEZABAL, N., ALVAREZ, M., MORAGUES, M. D. **Immunoreactivity of the fungal cell wall.** *Medical Mycology.* 39: 101-10. 2001.
- PRABHU, R. M., PATEL, R. **Mucormycosis and entomophthoromycosis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment.** *Clinical Microbiology and Infection.* 10: 31-47. 2004.
- QUESADA, O., RODRÍGUEZ, F., HERRÁEZ, P., SEARA, D., ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A. ***Mucor ramosissimus* associated with feather loss in canaries (*Serinus canarius*).** *Avian Diseases.* 51: 643-5. 2007.
- QIN X, GAO B. **The complement system in liver diseases.** *Cellular and Molecular Immunology.* 3: 333-40. 2006.
- RHODES J. C. **Contribution of complement component C5 to the pathogenesis of experimental murine cryptococcosis.** *Sabouraudia.* 23: 225-34. 1985.
- RICKERTS, V., LOEFFLER, J., BÖHME, A., EINSELE, H., JUST-NÜBLING, G. **Diagnosis of disseminated zygomycosis using a polymerase chain reaction assay.** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 20: 744-5. 2001.
- RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., GOICOECHEA DE JORGE, E. G. **Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H.** *Clinical and Experimental Immunology.* 151: 1-13. 2008.

- RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., ESPARZA-GORDILLO, J., GOICOECHEA DE JORGE, E., LOPEZ-TRASCASA, M., SANCHEZ-CORRAL, P. **The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations.** *Molecular Immunology*. 41: 355-67. 2004.
- RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., DIAZ-GUILLEN, M. A., HEINE-SUNER, D. **An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32.** *Molecular Immunology*. 36: 803-8. 1999.
- ROGERS, T. R. **Treatment of zygomycosis: current and new options.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61: 35-40. 2008.
- ROSAS, A. L., MACGILL, R. S., NOSANCHUK, J. D., KOZEL, T. R., CASADEVALL, A. **Activation of the Alternative Complement Pathway by Fungal Melanins.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9: 144-8. 2002.
- ROSAS, A. L., CASADEVALL, A. **Melanization decrease the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation.** *Mycopathologia*. 151: 53-6. 2001.
- ROSAS, A. L., CASADEVALL, A. **Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold.** *FEMS Microbiology Letters*. 153: 265-72. 1997.
- ROSEN, H., LAW, S. K. A. **The leukocyte cell surface receptor(s) for the iC3b product of complement.** *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 153: 99-122. 1990.
- ROSSI, V., CSEH, S., BALLY, I., THIELENS, N. M., JENSENIUS, J. C., ARLAUD, G. J. **Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and-2.** *Journal of Biological Chemistry*. 276: 40880-7. 2001.
- RUIZ-HERRERA, J. **Dimorphism in *Mucor* Species with emphasis on *M. rouxii* and *M. bacilliformis*.** In: *Fungal Dimorphism with Emphasis of Fungi Pathogenic for Humans*, 361-395. Szanislo, P. J., Harris, J. L. New York, Plenum Press, Estados Unidos. 1985.
- RUNZA, V. L., SCHWAEBLE, W., MÄNNEL, D. N. **Ficolins: novel pattern recognition molecules of the innate immune response.** *Immunobiology*. 213: 297-306. 2008.
- SANTOS, A. L., PALMEIRA, V. F., ROZENTAL, S., KNEIPP, L. F., NIMRICHTER, L., ALVIANO, D. S., RODRIGUES, M. L., ALVIANO, C. S. **Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis.** *FEMS Microbiology Reviews*. 31: 570-91. 2007.

- SCHULTZ, D. R., ARNOLD, P. I. **The first component of human complement: on the mechanism of activation by some carbohydrates.** *Journal of Immunology.* 126: 1994-8. 1981.
- SELANDER, B., MÅRTENSSON, U., WEINTRAUB, A., HOLMSTRÖM, E., MATSUSHITA, M., THIEL, S., JENSENIUS, J. C., TRUEDSSON, L., SJÖHOLM, A. G. **Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2.** *Journal of Clinical Investigation.* 116: 1425-34. 2006.
- SHAO, P. L., HUANG, L. M., HSUEH, P. R. **Invasive fungal infection - laboratory diagnosis and antifungal treatment.** *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection.* 39: 178-88. 2006.
- SHARIFIA, M., KARIMI, K., TAHERZADEH, M. J. **Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 35: 1253-9. 2008.
- SHIMONAKA A, KOGA J, BABA Y, NISHIMURA T, MURASHIMA K, KUBOTA H, KONO T. **Specific characteristics of family 45 endoglucanases from Mucorales in the use of textiles and laundry.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 70: 1013-6. 2006.
- SMITH, L. C., CLOW, L. A., TERWILLIGER, D. P. **The ancestral complement system in sea urchins.** *Immunological Reviews.* 180: 16-34. 2001.
- SOBOTA, A., STRZELECKA-KILISZEK, A., GŁADKOWSKA, E., YOSHIDA, K., MROZIŃSKA, K., KWIATKOWSKA, K. **Binding of IgG-opsonized particles to Fc gamma R is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation.** *Journal of Immunology.* 175: 4450-7. 2005.
- SOHNLE, P. G. FRANK, M. M., KIRCKPATRICK, C. H. **Deposition of complement in the cutaneous lesions of chronic mucocutaneous candidiasis.** *Clinical Immunology and Immunopathology.* 5: 340-50. 1976.
- SONESSON, A., RINGSTAD, L., NORDAHL, E. A., MALMSTEN, M., MÖRGELIN, M., SCHMIDTCHEN, A. **Antifungal activity of C3a and C3a-derived peptides against *Candida*.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1768: 346-53. 2007.
- SPETH, C., RAMBACH, G., WURZNER, R., LASS-FLORL, C. **Complement and fungal pathogens: an update.** *Mycoses.* 51: 477-96. 2008.
- SPETH, C., RAMBACH, G., LASS-FLORL, C., DIERICH, M. P., WURZNER, R. **The role of complement in invasive fungal infections.** *Mycoses.* 47: 93-103. 2004.

- SPITZER, D., MITCHELL, L. M., ATKINSON, J. P., HOURCADE, D. E. **Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly.** Journal of Immunology. 179: 2600-8. 2007.
- STURTEVANT, J. E., LATGE, J. P. **Interactions between conidia of *Aspergillus fumigatus* and human complement component C3.** Infection and Immunity. 60: 1913-8. 1992
- SUES, A., MILLATI, R., EDEBO, L., TAHERZADEH, M. J. **Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*.** FEMS Yeast Research. 5: 669-76. 2005.
- SUNYER, J. O., ZARKADIS, I. K., LAMBRIS, J. D. **Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity?** Immunology Today. 19: 519-523. 1998.
- SUSAL, C., KIRSCHFINK, M., KROPELIN, M., DANIEL, V., OPELZ, G. **Identification of complement activation sites in human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein gp120.** Blood. 87: 2329-36. 1996.
- SZALAI, A. J. **The biological functions of C-reactive protein.** Vascular Pharmacology. 39:105-7. 2002.
- TABORDA, C. P., DA SILVA, M. B., NOSANCHUCK, J. D., TRAVASSOS, L. R. **Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview.** Mycopathologia. 165: 331-9. 2008.
- THIEL, S., MOLLER-KRISTENSEN, M., JENSEN, L., JENSENIUS, J. C. **Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation.** Immunobiology. 205: 446-54. 2002.
- TOBON, A. M., ARANGE, M., FERNANDEZ, D., RESTREPO, A. **Mucormycosis (Zygomycosis) in a heart kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy.** Clinical Infectious Diseases. 36: 1488-91. 2003.
- TROUW, L. A., BLOM, A. M., GASQUE, P. **Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells.** Molecular Immunology. 45: 1199-207. 2008.
- TROUW, L. A., BENGTTSSON, A. A., GELDERMAN, K. A., DAHLBÄCK, B., STURFELT, G., BLOM, A. M. **C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack.** The Journal of Biological Chemistry. 282: 28540-8. 2007.
- ULEVITCH, R. J. **Molecular mechanisms of innate immunity.** Immunologic Research. 21: 49-54. 2000.

- VAN CUTSEM, J., VAN GERVEN, F., FRANSEN, J., JANSSEN, P. A. **Treatment of experimental zygomycosis in guinea pigs with azoles and with amphotericin B.** *Chemotherapy*. 35: 267-72. 1989.
- VIGNALE, R., MACKINNON J. E., CASELLA DE VILABOIA E., BURGOA, F. **Chronic, destructive, mucocutaneous phycomycosis in man.** *Sabouraudia*. 3: 143-147. 1964.
- VOGL, G., LESIAK, I., JENSEN, D. B., PERKHOFER, S., ECK, R., SPETH, C., LASS-FLÖRL, C., ZIPFEL, P. F., BLOM, A. M., DIERICH, M. P., WÜRZNER, R. **Immune evasion by acquisition of complement inhibitors: the mould *Aspergillus* binds both factor H and C4b binding protein.** *Molecular Immunology*. 45: 1485-93. 2008.
- VOLANAKIS, J. E. **Participation of C3 and its ligand in complement activation.** *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 153: 1-21. 1989.
- WANG, Y., TAN, T. K., TAN, G. K., CONNOLLY, J. D., HARRISON, L. J. **Microbial transformation of the sesquiterpenoid (-)-maalioxide by *Mucor plumbeus*.** *Phytochemistry*. 67: 58-61. 2006.
- WANG, Y., AISEN, P., CASADEVALL, A. **Melanin, melanin “ghosts” and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*.** *Infection and Immunity*. 64: 2420–2424. 1996.
- WASHBURN, R. G., DEHART, D. J., AGWU, D. E., BRYANT-VARELA, B. J., JULIAN, N. C. ***Aspergillus fumigatus* complement inhibitor: production, characterization and purification by hydrophobic interaction and thin-layer chromatography.** *Infection and Immunity*. 58: 3508–15. 1990.
- WEINBERG, J. R., SMITH, A., LANGLEY, K., GWAVAVA, N. J. **Rhinocerebral mucormycosis diabetes mellitus and adrenogenital syndrome.** *Brazilian Journal of Clinical Practice*. 47: 108-9. 1993.
- WEITZMAN, I., DELLA-LATTA, P., HOUSEY, G., REBATA, G. ***Mucor ramosissimus* Samutsevitch isolated from a thigh lesion.** *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 2523-5. 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Bulletin of the World Health Organization.** 39: 935-38. 1968.
- XIN, X. L., MA, X. C., LIU, K. X., HAN, J., WANG, B. R., GUO, D. A. **Microbial transformation of alantolactone by *Mucor polymorphosporus*.** *Journal of Asian Natural Products Research*. 10: 933-7. 2008.
- XIN, X., LIU, Y., YE, M., GUO, H., GUO, D. **Microbial transformation of glycyrrhetic acid by *Mucor polymorphosporus*.** *Planta Medica*. 72: 156-61. 2006.

- YODER, J. A., GLENN, B. D., BENOIT, J. B., ZETTLER, L. W. **The giant Madagascar hissing-cockroach (*Gromphadorhina portentosa*) as a source of antagonistic moulds: concerns arising from its use in a public setting.** *Mycoses*. 51: 95-98, 2007.
- YOUNG, B. J., KOZEL, T. R. **Effects of strain variation, serotype and structural modification on the kinetics for activation and binding of C3 to *Cryptococcus neoformans*.** *Infection and Immunity*. 61: 2966–72. 1993.
- ZAMANI, A., JEIHANIPOUR, A., EDEBO, L., NIKLASSON, C., TAHERZADEH, M. J. **Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 8314-8. 2008.
- ZHAN, J. X., ZHANG, Y. X., GUO, H. Z., HAN, J., NING, L. L. e GUO, D. A. **Microbial Metabolism of Artemisinin by *Mucor polymorphosporus* and *Aspergillus niger*.** *Journal of Natural Products*. 65: 1693-5. 2002.
- ZHANG, M. X., KOZEL, T. R. **Mannan-specific immunoglobulin G antibodies in normal human serum accelerate binding of C3 to *Candida albicans* via the alternative complement pathway.** *Infection and Immunity*. 66: 4845-50. 1998.
- ZHANG, M. X., KLEIN, B. **Activation, binding, and processing of complement component 3 (C3) by *Blastomyces dermatitidis*.** *Infection and Immunity*. 65: 1849-55. 1997.
- ZHU, Y., THANGAMANI, S., HO, B., DING, J. L. **The ancient origin of the complement system.** *EMBO Journal*. 24: 382-94. 2005.

Anexo

1. Reagentes

- Solução Veronal Salina 5 vezes concentrada (VBS estoque);

| | |
|----------------------------------------|--------|
| NaCl | 83g |
| 5, 5' ácido dietilbarbiturato de sódio | 10,19g |

Dissolver as substâncias em 1,5 litros de água destilada. Acertar o pH para $7,35 \pm 0,05$ com solução de ácido clorídrico 1N, completando o volume para 2 litros com água destilada.

- Tampão Citrato-Fosfato de sódio 0,1M, pH 5.1;
- Tampão Fosfato Salina (PBS), fosfato de sódio 0,01M contendo NaCl 0,15M, pH 7.2;
- Tampão Veronal Salina (VBS), contendo íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e gelatina – Diluir 1 parte da solução VBS estoque com 4 partes de água destilada, adicionando íons cálcio, magnésio e gelatina de modo que a solução final contenha: $1,5 \times 10^{-4}\text{M}$, $1 \times 10^{-3}\text{M}$ e 0,1% de gelatina, respectivamente;
- Tampão Veronal Salina (VBS), sem íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , contendo 0,1% de gelatina – Diluir a solução estoque nas mesmas condições anteriores, mas sem a adição dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} ;
- Solução de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 3N;
- Solução de BSA 2% em PBS;
- Solução de Cloreto de Cálcio (CaCl_2) 0,1M;
- Solução de Cloreto de Magnésio (MgCl_2) 0,2M;
- Solução de Alsever, pH 6,1 (esterilizada por tindalização).

| | |
|-------------------------------------------------|---------|
| Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) | 20,5g/l |
| Citrato de Sódio | 8,0g/l |
| Cloreto de Sódio (NaCl) | 4,2g/l |

2. Quelantes

- Solução de EDTA 0,1M;
- Solução de EGTA 0,2M.

3. Meios de Cultura

- Meio quimicamente definido – Czapek-Dox (CD), pH 5.6.

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Sacarose | 30,0 g |
| NaNO ₃ | 2,0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1,0 g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 0,5 g |
| KCl | 0,5 g |
| FeSO ₄ . 7H ₂ O | 0,01 g |
| Água Destilada | qsp 1,0 l |

- Meio Sabouraud-dextrose

| | |
|---------------------|-----------|
| Peptona | 1,0 g |
| Extrato de levedura | 0,5 g |
| Glicose | 2,0 g |
| Agar | 1,5 g |
| Água Destilada | qsp 1,0 l |

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)