

**ALEXANDRE PAULO MACHADO**

**Cromoblastomicose:  
À procura do modelo experimental murino**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

**São Paulo, 2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



**ALEXANDRE PAULO MACHADO**

**Cromoblastomicose:  
À procura do modelo experimental murino**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. OLGA FISCHMAN GOMPERTZ**  
ORIENTADORA - DMIP  
Livre-Docente/DMIP/UNIFESP

**São Paulo, 2009**

Machado, Alexandre Paulo

**Cromoblastomicose: à procura do modelo experimental**

**murino/Alexandre Paulo Machado. - - São Paulo, 2009.**

XXIV, 217f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo.

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Título em inglês: Chromoblastomycosis: searching for experimental murine model.

- 1- Cromoblastomicose experimental, 2. Infecção murina crônica,
3. *Fosecaea pedrosoi*, 4. *Bacillus subtilis*, 5. Coestimulação antigênica

“Atenção especial deve ser dada à cromoblastomicose, pois embora, muitas vezes, seja doença negligenciada, representa uma micose subcutânea importante em nosso meio. É enfermidade mórbida, podendo ser debilitante, que ainda carece de tratamento padronizado e eficaz. Existe também o risco potencial de haver incremento da endemicidade, em particular, de casos ocupacionais relacionados a práticas extrativistas rentáveis, bem difundidas em povoados e comunidades carentes, como o crescente manejo da flora nativa que vem sendo, na atualidade, estimulado pelos programas de sustentabilidade ambiental, indústria alimentícia, cosmética e artesanato.”

Universidade Federal de São Paulo

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Clara Lúcia Barbieri Mestriner

Chefe do Departamento

Prof. Dr Renato Arruda Mortara

Coordenador do Curso de Pós-Graduação

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de São Paulo, e no laboratório de Microbiologia, Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Federal de Mato Grosso, contando com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 14170/2004-9, e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (Fapemac), processo nº 002.138/2007.

A pesquisa teve início em agosto de 2004 na Universidade Federal de São Paulo. No ano seguinte, foram realizados os experimentos de infecção animal com *Fonsecaea pedrosoi*, cepa EPM 380/03, e análises histopatológicas. Os primeiros ensaios de coestimulação antigênica ocorreram em agosto de 2005. Em 2006, tiveram início os estudos de infecção crônica, sendo finalizados em agosto de 2008. Em 2007, investigações sobre interação microbiana foram iniciadas a partir do isolamento de cepa bacteriana com propriedades antagônicas, BAC-UFMT/01, na Universidade Federal de Mato Grosso. Os trabalhos de infecção animal foram realizados conforme parecer do Comitê de Ética nº 0808/05.

# **Alexandre Paulo Machado**

## **Cromoblastomicose: À procura do modelo experimental murino**

### **Banca Examinadora**

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Fischman Gompertz**

Livre-Docente Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia  
Universidade Federal de São Paulo.

#### **Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida**

Livre-Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

#### **Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda**

Livre-Docente do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Rozental**

Professor Associado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Guadelupe Rodrigues**

Professor Adjunto da Unidade de Oncologia Experimental da Universidade Federal de São Paulo.

Suplentes

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Arlete Emily Cury**

Livre-Docente Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

#### **Prof. Dr. Mario Mariano**

Professor Titular Afiliado do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo.

## Dedicatória

### “Aos ilustres professores”

Nas ruas nos aprendemos a dura realidade da vida...  
Na escola é ensinado o sentido da dela  
e as possibilidades para transformar  
este nosso planeta num lugar melhor...

Mas embora “ser professor” seja  
uma arte anciã e tão nobre,  
praticamente uma mistura de amor e dedicação,  
parece, muitas vezes, ser uma escolha difícil.

Afinal, infelizmente, em nosso país  
eles carregam o legado de uma sub-função,  
um sub-emprego, um sub-salário,  
são apenas mais “um” – artigo indefinido.

No entanto, aprendi  
que além de meus pais,  
meu outro grande apoio na  
vida, foram meus mestres.

Agora, estou aqui!  
E apesar dos pesares,  
me orgulho de ser como eles.  
Pois, quem irá nos ajudar  
a superar os limites da vida,  
do desconhecido?  
Quem com tanta ousadia e determinação  
pode nos levar aos fantásticos cenários  
das grandes experiências humanas?

Enfim, quem como um simples entusiasta pode  
impulsionar, moldar e dar polimento em nossa  
liberdade de descobrir?

Meus amigos, sinceramente,  
quem nos dera se esse mundo  
fosse cheio de versados educadores.  
Pessoas sempre dispostas a nos ouvir  
em nossos maiores absurdos  
e a compartilhar com felicidade  
dos nossos erros e temores.

Pessoas que nunca quisessem  
extinguir a nossa utopia,  
as nossas vontades,  
sem qualquer razão...

Por isso, quero reforçar minha teoria  
sobre esse ser falível  
que com o mínimo esforço, alegria,  
compromisso e responsabilidade  
é capaz de embalar  
nossas virtudes e esperanças,  
modifica o que nos resta de mundo  
em um lugar melhor  
e mantém acesa e viva a chama do  
conhecimento.

Afinal, são tão incansáveis e convictos  
do que ensinam  
que acabam nos seduzindo.

E acho que me apaixonei  
cegamente pela missão deles,  
de modo semelhante,  
pois entrei também  
nessa estrada sem saída,  
acreditando que a ignorância nunca  
vencerá nossos ideais.

Reconheço que não é tarefa fácil!  
Mas tenho certeza que  
quando olham pra trás  
e vêem um caminho iluminado  
pelos milhares de brilhantes deixados.

Eles se emocionam  
e ficam sensibilizados  
a continuar tentando ser  
“salva-sapiens”,  
em especial, através de sua  
primordial doação  
de alimentos vocacionais  
aos sonhos de inúmeros  
desamparados.

---

### “Dever de Sonhar...”

Eu tenho uma espécie de dever,  
de dever de sonhar,  
de sonhar sempre,  
pois sendo mais do que  
um espectador de mim mesmo,  
Eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso.

E assim me construo a ouro e sedas,  
em salas supostas, invento palco, cenário  
para viver o meu sonho  
entre luzes brandas  
e músicas invisíveis.”  
(Fernando Pessoa)

## **Agradecimentos**

### **À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Fischman Gompertz**

Mesmo que me faltem memoráveis palavras de gratidão, saibas que lhe serei sempre grato por ter compartilhado, durante todos esses anos, de uma experiência grandiosa e enriquecedora. Certamente, a cada página em branco, escrevestes linhas promissoras de grandes histórias. Por isso, pretendo levar tão somente os preciosos presentes recebidos de ti, sob forma de impolutos gestos e palavras oportunas. E por onde for, quero levá-los como exemplos, pois contigo aprendi o sentido de somar conhecimento, multiplicar amizades, dividir problemas e a subtrair o que não é humanitário. Agradeço também pela amizade maternal e acolhedora que, indiscutivelmente, trouxe alento nos mais variados momentos de alegrias e dificuldades.

**À minha amiga Márcia Martins**, secretária da Disciplina de Biologia Celular, que sempre procurou ajudar, da melhor forma possível, com suas palavras de ânimo e compreensão, as quais me estimularam, muitas vezes, na superação dos desafios e na continuidade dos trabalhos para conclusão dessa tese.

### **Aos meus pais, Carlos e Ildaci,**

Pois mesmo estando distante deles, todos esses anos, sempre estiveram presentes na minha vida como meu maior expoente de refúgio cálido e sublime amor.

### **Aos meus irmãos, André e Adriana,**

Pelos muitos momentos de alegria, apoio e união.

**A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS  
E CONCRETIZADA NO AMOR!**

Francisco Cândido Xavier

À Professora Dr<sup>a</sup> Maria Regina Regis Silva, Professora Adjunta do Departamento de Patologia, da Universidade Federal de São Paulo, que sempre foi atenciosa comigo e contribuiu muitíssimo nas análises histopatológicas, repassando seus valorosos conhecimentos sobre reações teciduais e citologia.

Ao Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho, Professor Doutor do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, que permitiu a realização dos testes de filogenia molecular em seu laboratório e, conjuntamente, com os Doutorandos José Roberto Tavares, Alexandre Wilson Bisson Filho, Guilherme Meira, me auxiliou nos experimentos. Parabéns pela excelência nas pesquisas!

Aos professores Dr. Sandro Rogério de Almeida, Dr. Carlos Pelleschi Taborda e Dr<sup>a</sup>. Elaine Guadelupe Rodrigues, pela paciência e apoio na estruturação desse trabalho durante a qualificação de doutoramento. Pela solicitude nos mais variados momentos. Agradeço-lhes novamente por terem aceitado compor esta banca de avaliação da Tese de Doutorado e pela possibilidade de aprender um pouco mais com vossos comentários e sugestões. Gostaria também de agradecer ao Prof. Dr Sando R. Almeida por ter permitido a realização de alguns experimentos em seu Laboratório e aos seus alunos pós-graduandos, em especial, à Karen Spadari Ferreira, atualmente, Professora Adjunta do Departamento de Ciências Biológicas, do Campus Diadema, da Universidade Federal de São Paulo, por ter me auxiliado durante os experimentos com enorme presteza. E a Prof. Dr. Elaine pelas várias orientações nos ensaios e análises de experimentação animal.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Rozental, que tem contribuído aos estudos da cromoblastomicose de maneira significativa, por ter aceitado fazer parte desta banca de avaliação da tese de doutorado e pelas possíveis contribuições.

Aos professores Dr. Mario Mariano e Dr<sup>a</sup> Arlete Emily Cury, por terem aceitado fazer parte da banca de avaliação desta tese de doutorado como suplentes.

Ao Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, um grande amigo de todas as horas, me ajudou inúmeras vezes na compreensão dos assuntos da micologia médica e em análises das infecções experimentais, bem como nos manuscritos e resumos de congressos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro em forma de bolsa para realização do mestrado e doutorado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (Fapemat) que me forneceu apoio financeiro sob forma projeto de pesquisa e bolsa de iniciação científica para os estudos de interação microbiana.

Aos professores do DMIP/UNIFESP, em especial, ao Prof. Dr. Renato Arruda Mortara, por ter me auxiliado nos testes de imunofluorescência para proteínas do complemento. E ao, Prof. Dr. José Daniel Lopes, pelos sábios conselhos durante período em que foi Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Ao secretariado do DMIP/UNIFESP, Marcelo, Mércia, Magda, Regiane, entre outros, pelos grandes préstimos e solidariedade. E aos funcionários da Disciplina de Biologia Celular e da Microbiologia, em particular, à Maria, Rose, Américo, Darci, Vitória e Luis, pelo apoio e amizade. A todos vocês, meu “Obrigado de Coração”, pois sempre me trataram com muito respeito e auxiliaram satisfatoriamente.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Micologia, que estão realizando seus estudos nesse local ou que já concluíram, Henry Bentubo, Viviane, Clarice, Vivian, Geovana, Fabiane Camargo, Thelma, Rodrigo Mulero, Guilherme Saraiva, Flávia, Ana Flávia, Christine Loureiro, Adriana Bori, minha admiração e gratidão pelos inúmeros momentos de felicidade e aprendizado.

Aos amigos do Departamento e de outros laboratórios, sendo muitos atualmente pesquisadores e docentes, Clédja, Patrício Godoy, Vivi Reis, Alison, Thaisa Paschoalhin, Rodrigo, Jeisa, Flávia, Edmémia, Cristiane Loureiro, Ellen, Kátia, Antônio Augusto, Bianca, Júlia Rocha, Raphael, Alberto, Daniel, Cristiane, Silvia Helena, Luciene, Andrei, Anna, Valesca, Carla, Steven, entre outros que pude compartilhar momentos valiosos de saber e alegria. Enfim, a todos os colegas do oitavo andar, incluindo os novatos, pelas várias festas e amizade.

Ao médico Hugo Marcelo, agradeço pela amizade de anos, por ter me recebido, várias vezes, em sua residência sempre de braços abertos e pelas ricas contribuições que possibilitaram meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos-irmãos, Cleber e Vânia Vianna, pela grande honra, nesses últimos anos, de coabitarmos o mesmo local com muita afeição, felicidade e tolerância. Vocês são inesquecíveis! À Vânia pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao médico César Emeliano, e aos futuros médicos, Jonathan Pinheiro e André, pela amizade desde o tempo de pensionato. E a Cristiane Camargo, Dirce, Regina, entre outras amigas, por seu carisma e amizade preciosa.

A minha colega de trabalho, Prof. Jésila P. Machado Marretto, na Universidade Federal de Mato Grosso, pela paciência e compreensão durante os afastamentos e pelos momentos de sabedoria compartilhados na docência. Também pelo apoio nos diversos projetos dentro da Faculdade de Ciências Médicas, como nos trabalhos de reestruturação da Disciplina de Microbiologia, do Laboratório Multusuário de Aulas-Práticas e do Laboratório de Microbiologia.

Aos técnicos Paulo Garcez, Liliana Alves Corrêa, Adelino Cunha Neto, da FCM/UFMT, os quais sempre me auxiliaram com amizade, respeito e apoio, em especial, com meus alunos de graduação e iniciação científica. Sem vocês meu trabalho teria sido muito mais árduo!

Aos colegas e professores do Instituto de Química, Instituto de Biologia, Faculdade de Enfermagem e Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Federal de Mato Grosso, que sempre me incentivaram durante o doutorado, mesmo em estágio probatório.

À ex-Pró-Reitora de Ensino, Profª. Drª. Matilde Araki Crudo, e ex-Pro-Reitora de Pós-Graduação Profª. Drª. Marinêz Izaac Marques, que compreenderam as enormes dificuldades para conciliar atividades de ensino e do doutoramento, permitindo meu afastamento temporário para conclusão da tese de doutorado.

Aos Professores do Centro de Pesquisa do Pantanal, da Universidade Federal de Mato Grosso, Prof. Dr. Amilton, Prof. Dr Evandro e Prof. Dr Paulo Teixeira, por terem acreditado em meu trabalho na instituição e pela concretização de parcerias interinstitucionais com conquistas surpreendentes. Pela ousadia e competência impulsionadora de um instituto e um centro voltados à excelência em pesquisa numa região tão deficitária e carente de ciência. Pelas novas fronteiras a serem implantadas na UFMT, incluindo o Curso de Graduação em Tecnologia de Biocombustíveis e Curso de Pós-graduação na área de Agro-Química.

Aos meus alunos e ex-alunos de iniciação científica, Adna Omete, Katiane Vaês, Mariana Anzai, Viviane Karolina Vivi, Fernanda Viana, Cristhiano, Karina e Yuri, pela compreensão nos meus momentos difíceis e de ausência, por sempre terem buscado avidamente o conhecimento e pelas várias contribuições como monitores nas aulas práticas e nas pesquisas do Laboratório de Microbiologia. Vocês foram importantes estímulos para seguir acreditando na docência e espero que, no futuro, nossos “esporos” tenham vida além da graduação e sejam multiplicadores.

Aos alunos dos Cursos de Graduação em Medicina, Enfermagem e Nutrição, sempre compreensivos e interessados na microbiologia, minha enorme gratidão pela possibilidade de ensinar e também aprender.

Por fim, tenho certeza que fiz o melhor de mim na tentativa de realizar uma grande obra. E caso tenha me esquecido de alguém, peço desculpas, pois foram quase 5 anos de trabalho intenso e variadas convivências.

Transmito, através desta, meu eterno agradecimento a todas as pessoas que me ajudaram, direta e indiretamente, na construção dessa tese e aos meus amigos pelos momentos valiosos de vida e ciência. Que Deus possa lhes retribuir milhares de vezes em saúde, felicidade e sorte!

MUITISSÍMO OBRIGADO!

### **"The Impossible Dream"**

To dream ... the impossible dream  
To fight ... the unbeatable foe  
To bear ... with unbearable sorrow  
To run ... where the brave dare not go  
To right ... the unrightable wrong  
To love ... pure and chaste from afar  
To try ... when your arms are too weary  
To reach ... the unreachable star

This is my quest, to follow that star  
No matter how hopeless, no matter how far  
To fight for the right, without question or pause  
To be willing to march into Hell, for a Heavenly cause

And I know if I'll only be true, to this glorious quest,  
That my heart will lie will lie peaceful and calm,  
when I'm laid to my rest  
And the world will be better for this:  
That one man, scorned and covered with scars,  
Still strove, with his last ounce of courage,  
To reach ... the unreachable star

(Joe Darion/Mitch Leigh, 1965)

## Lista de ilustrações

Figura 1 – Microscopia óptica de formas micelianas de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> .....	32
Figura 2 – Conídios e tubos germinativos observados pós-infecção.....	45
Figure 3 – Corte histopatológico de pata infectada com CCC.....	46
Figura 4 – Cinética da lesão nas patas de camundongos BALB/c infectados com CCC	47
Figura 5 – Correlação da evolução clínica (A) e micológica (B) dos camundongos infectados com CCC.....	48
Figura 6 – Características de abscesso formado pela inoculação de CCC.....	50
Figura 7 – Células escleróticas obtidas após infecção com CCC.....	51
Figura 8 – Características dos abscessos peritoneais formados após inoculação de hifas.....	53
Figura 9 – Zona de degeneração dos neutrófilos pós-infecção com hifas.....	54
Figura 10 – Maior intumescimento da pata e infecção persistente causados por coestimulação antigênica.....	56
Figura 11 – Coestímulo antigênico de camundongos C57BL6 e Swiss.....	57
Figura 12- Características histopatológicas de tecido proveniente de camundongos coestimulados.....	58
Figura 13 – Metástase da infecção em camundongo coestimulado.....	59
Figura 14 - Estímulo antigênico das mucosas e infecção plantar.....	61
Figura 15 – Cinética da infecção de camundongos KO CD4 e CD8, coestimulados antigenicamente.....	63
Figura 16 – Cinética da infecção de animais KO MHC-II, TNF- $\alpha$ e IL-10, coestimulados antigenicamente.....	64
Figura 17 - Cinética da infecção de animais XID e irradiados.....	66

Figura 18 - Características histopatológicas das lesões focais em camund. Xid.....	67
Figura 19 – Bacilo Gram-positivo.....	69
Figura 20 – Cocultivo entre <i>Aspergillus niger</i> e <i>Bacillus subtilis</i> .....	70
Figura 21 – Cocultivo entre fitopatógenos e <i>B. subtilis</i> em meio de DNase.....	70
Figura 22 – Pigmentos secretados em cocultivos por fungos melanogênicos.....	71
Figura 23- Secreção de pigmento escuro após cocultivo entre <i>F. pedrosoi</i> e bacilo.....	72
Figura 24 – Modificação das hifas de <i>F. pedrosoi</i> após cocultivo com bacilo.....	73
Figura 25 – Clamidoconídios fúngicos formados após cocultivo com <i>B. subtilis</i> .....	73
Figura 26 - Fagocitose de <i>B. subtilis</i> .....	74
Figura 27 – Cortes histopatológicos de tecido infectado com hifas cocultivadas.....	75
Figura 28 – Morfologia das células fúngicas cultivadas por 6 meses.....	76
Figura 29 – Células fúngicas, mais melanizadas do que outras, após cultivo por tempo prolongado.....	77
Figura 30 – Microscopia óptica e eletrônica das células cultivadas por 6 meses.....	77
Figura 31 – Cinética das lesões, acompanhadas durante 7 meses pós-infecção, com células fúngicas cultivadas por longo período.....	79
Figura 32 – Corpos escleróticos observados em exame direto, 7 meses após infecção, com células fúngicas cultivadas por 6 meses.....	80
Figura 33 – Características histopatológicas de tecido proveniente de animais com sete meses de infecção crônica.....	81
Esquema 1- Camadas de abscesso formado após infecção com células fúngicas.....	87

## **Lista de Abreviaturas**

APC, célula apresentadora de antígeno;  
B&B, Brown-Brenn (método de coloração histológica);  
CBM, cromoblastomicose;  
CCC, células conidiogênicas e conídios;  
CD4, *cluster of differentiation 4*;  
CD8, *cluster of differentiation 8*;  
EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético);  
gyrA, DNA girase subunidade A;  
H&E, hematoxilina-eosina (método de coloração histológica);  
IFN, interferon;  
IL, interleucina;  
i.p., intraperitoneal;  
i.t., intratraqueal;  
KO, *knockout* (animal geneticamente modificado, nocaute);  
MET, Microscopia eletrônica de transmissão;  
MHC-II, complexo principal de histocompatibilidade de classe II;  
PAS, ácido periódico de Schiff (método de coloração histológica);  
PBS, tampão salino fosfato;  
PCR, reação da polimerase em cadeia;  
PDB, Potato dextrose broth (caldo de batata dextrose);  
PMNs, leucócitos polimorfonucleares;  
RNAr, Ácido ribonucléico ribosomal;  
rpoB, RNA polimerase subunidade B;  
s.c., subcutânea;  
SDA, Sabouraud dextrose ágar;  
SDB, Sabouraud dextrose broth (caldo);  
TNF, fator de necrose tumoral;  
v.o., via oral;  
Xid, *X-linked immunodeficiency*.

## **Resumo**

A ausência de um modelo animal adequado de infecção crônica para estudo da cromoblastomicose experimental e o desconhecimento sobre as formas fúngicas infectantes de *Fonsecaea pedrosoi* estimularam a realização da presente investigação. Inicialmente, diferentes formas micelianas de *F. pedrosoi*, hifas, conídios e células conidiogênicas, foram testadas quanto ao seu potencial infectivo em camundongos BALB/c. Cada estrutura demonstrou capacidade distinta de sobrevida frente à resposta tecidual do hospedeiro. A transformação *in vivo* do inóculo fúngico para corpos escleróticos somente foi verificada nas infecções com células conidiogênicas. Neutrófilos parecem ser importantes no controle de *F. pedrosoi*, possivelmente pela degranulação e liberação de produtos tóxicos, enquanto macrófagos podem ser mais relevantes nos processos de *clearance*. A inoculação do fungo em único sítio produziu resposta inflamatória com formação de abscesso rico em fagócitos, ocorrendo eliminação da infecção em até dois meses. No entanto, coestímulo antigênico em dois sítios distintos, tais como pata s.c. e peritônio, respectivamente, com células fúngicas viáveis e inviáveis, nas diferentes linhagens de camundongos e animais *knockouts*, provocou a formação de lesões multifocais ricas em histiócitos e infecção persistente por *F. pedrosoi*, ocorrendo cura clínica e micológica desses animais, em geral, após 4 meses. Nos animais coestimulados, quando o foco primário (abscesso rico em neutrófilos) desaparecia, a migração de neutrófilos se intensificava para o sítio secundário (lesões focais ativas), culminando com a eliminação fúngica. Tais dados corroboraram para hipótese de atuação individualizada da resposta imune em focos múltiplos, porém com resolução, sistemicamente, coordenada das lesões. Após imunização das mucosas e infecção da pata com células de *F. pedrosoi* também foi verificada maior duração das lesões infecciosas, indicando que a apresentação antigênica de sítios distintos poderia estar envolvida com mecanismos tolerogênicos aos抗ígenos fúngicos. Camundongos CD4 KO que receberam duplo-estímulo, embora

manifestassem agravamento das lesões nos períodos iniciais pós-inoculação fúngica, controlaram a infecção mais tarde. Progressão exacerbada e agravamento da infecção foram verificados em animais KO CD8 coestimulados. Camundongos co-estimulados apresentaram lesões com perfil anatômopatológico similar, no entanto, os animais IL-10 KO não desenvolveram infecção prolongada após coestimulação. Animais XID coestimulados desenvolveram infecção crônica, o que demonstrava a possibilidade das células B1 atuarem antagonicamente à resposta imunossupressora. Em outro estudo, selecionamos uma cepa bacteriana com propriedades antagônicas aos fungos filamentosos, identificada como *B. subtilis*, para ser utilizada em ensaios de interação com a cepa de *F. pedrosoi*. Em cocultivos, verificamos alterações celulares, como modificação das hifas para formas artroconidiadas, produção de clamidoconídios terminais e indução da síntese de melanina fúngica. Tais células cocultivadas foram inoculadas em camundongos, sendo os clamidoconídios terminais mais resistentes *in vivo* a ação dos fagócitos. No último experimento, utilizamos culturas axênicas de *F. pedrosoi*, mantidos em cultivos por seis meses. Formas fúngicas variadas, tais como células arredondadas, clamidoconídios terminais e intercalares, com parede celular composta por múltiplas camadas, foram analisadas por microscopia óptica e eletrônica. Essas células fúngicas foram inoculadas em camundongos BALB/c, produzindo infecção crônica, principalmente em grupo de animais infectados em dois sítios. Por fim, nossos achados evidenciaram que o desenvolvimento de um modelo murino adequado para cromoblastomicose depende de fatores ligados ao parasito e hospedeiro. Células fúngicas ou formas, potencialmente, infectantes devem ser utilizadas de modo preferencial no desenvolvimento dos modelos experimentais, devendo os mecanismos de imunossupressão, como a coestimulação antigênica, ser empregados como “ferramenta auxiliar” para ampliar as chances de sucesso na obtenção de lesões crônicas em animais hígidos.

## **Abstract**

This study was prompted by the lack of a satisfactory chronic infection animal model for studies of experimental chromoblastomycosis and the fact that very little is known about the infective fungal forms of *Fonsecaea pedrosoi*. First, we investigated the infective potential of different mycelial forms of *F. pedrosoi*, hyphae, conidia and conidiogenous cells, in BALB/c mice. The extent to which each structure could survive the host tissue response was found to vary. *In vivo* transformation of the fungal inoculum into muriform cells was only observed when the mice were infected with conidiogenous cells. Neutrophils appeared to play an important role in the control of *F. pedrosoi*, possibly by degranulating and releasing toxic products, while macrophages may be of greater importance in clearance. Fungal inoculation of a single site led to an inflammatory response accompanied by the formation of abscesses rich in phagocytes. The fungus was eliminated efficiently in up to two months. However, antigenic co-stimulation with viable and nonviable fungal cells in two different sites, such as the footpad (s.c.) and peritoneum, led to the formation of multifocal lesions rich in histiocytes and to prolonged *F. pedrosoi* infection in different strains of mice and knockout animals. Clinical and mycological cure in these animals generally occurred after 4 months. When the primary focus in the co-stimulated animals (an abscess rich in neutrophils) disappeared, neutrophil migration to the secondary site (active multifocal lesions) increased, culminating in the elimination of the fungi. These data support the hypothesis that multifocal infections show individual immune responses, while systemic resolution of lesions is coordinated as a whole. After the mucosae had been immunized and footpads had been infected with *F. pedrosoi* cells, infectious lesions were found to be more prolonged, indicating that antigen presentation at different sites may be involved in peripheral tolerance

mechanisms. Although lesions in co-stimulated CD4 KO mice worsened during the initial period following inoculation with the fungus, the mice were found to control the infection later. Exacerbated inflammatory progression and a worsening of the infection were observed in co-stimulated CD8 KO animals. Lesions in co-stimulated KO mice had a similar pathologic profile, but IL-10 KO animals did not develop prolonged infection after co-stimulation. Co-stimulated xid mice developed chronic infection, showing that B1 cells may have an antagonistic effect on the immunosuppressive response. In another study, we selected the bacterial strain *B. subtilis*, which has known antagonistic properties against filamentous fungi, for use in interaction assays with the *F. pedrosoi* strain. The main cell changes observed after co-culture were the transformation of hyphae into arthroconidial forms and the production of terminal chlamydoconidia. The induction of synthesis of fungal melanin was also observed. Fungal cells from co-cultures were inoculated into mice. The chlamydoconidia from these co-cultures were more resistant *in vivo* to the actions of phagocytes. In the final experiment, we used axenic *F. pedrosoi* cultures that had been maintained for six months. Various fungal forms, such as round cells and terminal and intercalary chlamydoconidia, with cell walls made up of multiple layers, were found in aged cultures. When inoculated into BALB/c mice, these fungal forms produced chronic infection, primarily in the group of animals infected at two sites. Our findings show that the development of a satisfactory murine model of chromoblastomycosis depends on factors associated with the parasite and the host. Potentially infective fungal cells should preferably be used when developing experimental models, and immunosuppression mechanisms such as antigenic co-stimulation should be used as “auxiliary tools” to increase the likelihood of obtaining chronic lesions in healthy animals.

## Sumário

Dedicatória.....	VII
Lista de ilustrações.....	XIV
Lista de abreviações.....	XVI
Resumo.....	XVII
Abstract.....	XIX
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
1.1 Fungos demácios.....	02
1.2 Doenças causadas por fungos demácios.....	02
1.3 Histórico da cromoblastomicose.....	03
1.4 Etiologia e características das espécies fúngicas.....	04
1.5 Ecologia e Epidemiologia .....	06
1.6 Anatomopatologia.....	09
1.7 Terapêutica.....	10
1.8 Infecção experimental.....	13
1.9 Antígenos fúngicos e resposta humoral.....	14
1.10 Melanina e virulência fúngica.....	16
1.11 Tolerância infecciosa.....	18
1.12 Interação microbiana.....	19
1.13 <i>Bacillus</i> spp e curiosidades.....	21
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Justificativa.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
4.1 Microrganismo.....	30
4.1.1 <i>Fonsecaea pedrosoi</i> .....	30
4.1.1.1 Cepa.....	30
4.1.1.2 Inóculo fúngico.....	30
4.1.1.2.1 Conídios.....	30
4.1.1.2.2 Células conidiogênicas e conídios.....	30
4.1.1.2.3 Hifas.....	31
4.1.1.2.4 Antígeno.....	32

4.1.1.2.5 Viabilidade celular.....	32
4.2 Análises microscópicas.....	32
4.3 Animais.....	33
4.3.1 Infecções.....	33
4.3.1.1 Infecção em único sítio	
com diferentes formas micelianas de <i>F. pedrosoi</i> .....	34
4.3.1.2 Coestimulação antigênica.....	35
4.3.1.2.1 Infecção em dois sítios.....	35
4.3.1.2.2 Estímulo antigênico das mucosas.....	35
4.4 Ensaio de interação microbiana.....	36
4.4.1 Microrganismos testados.....	36
4.4.2 Cocultivos.....	36
4.4.3 Identificação clássica de isolado bacteriano	
com propriedades antagônicas.....	37
4.4.4 Identificação molecular.....	38
4.4.4.1 Extração e purificação do DNA genômico.....	38
4.4.4.2 Amplificação dos genes 16S rRNA, rpoB e gyrA.....	39
4.4.4.3 Seqüenciamento e alinhamento dos	
genes 16 S rDNA, rpoB e gyrA.....	39
4.5 Infecção com células fúngicas cocultivadas com <i>Bacillus subtilis</i> ....	40
4.6 Estudo das células de <i>F. pedrosoi</i> cultivadas	
por longos períodos de tempo.....	40
4.6.1 Cultivo fúngico.....	40
4.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	40

4.6.3 Infecção com células de <i>F. pedrosoi</i> cultivadas por longos períodos.....	41
4.7 Análises estatísticas.....	41
4.8 Exame micológico.....	42
4.9 Histopatologia.....	42
<b>5. Resultados.....</b>	<b>43</b>
5.1 Infecção com diferentes formas em único sítio.....	44
5.1.1 Infecção com conídios.....	44
5.1.2 Infecção com CCC.....	46
5.1.3 Infecção com hifas.....	52
5.2 Coestimulação antigênica de dois sítios.....	55
5.2.1 Inoculação de CCC em mais de um sítio.....	55
5.2.2 Estímulo antigênico das mucosas e infecção plantar.....	60
5.2.3 Coestímulo em camundongos KO para CD4, CD8, IL-10, MHC-II e TNF.....	62
5.2.4 Coestímulo antigênico de camundongos Xid e irradiados.....	65
5.3 Ensaio de interação microbiana.....	68
5.3.1 Identificação por métodos clássicos e moleculares do isolado bacteriano.....	68
5.3.2 Antagonismo <i>in vitro</i> .....	69
5.3.3 – Cocultivo entre <i>B. subtilis</i> e <i>F. pedrosoi</i> .....	71
5.3.3.1 Secreção de pigmento escuro em meio de cultura.....	71
5.3.3.2 Modificações da morfologia fúngica.....	72
5.3.4 Infecção por células de <i>F. pedrosoi</i> cocultivadas com bacilo.....	74
5.4 Células fúngicas cultivadas por longos períodos.....	76

5.4.1 Microscopia óptica e MET.....	76
5.4.2 Infecção com células fúngicas cultivadas por longo período.....	78
<b>6. Discussão.....</b>	<b>82</b>
6.1 Infecção experimental com diferentes formas em único sítio.....	83
6.2 Coestimulação antigênica.....	90
6.3 Ensaios de interação microbiana.....	95
6.3.1 Identificação de <i>Bacillus subtilis</i> .....	95
6.3.2 Antagonismo fúngico por <i>B. subtilis</i> .....	96
6.3.3 Cocultivo entre <i>F. pedrosoi</i> e bacilo e infecção animal.....	99
6.4 Infecção com células cultivadas por longos períodos.....	100
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>103</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>106</b>

## Anexos

### **Anexo 1 – Paper 1**

Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells. Submitted to Mycoses, 2008.

### **Anexo 2 – Paper 2**

Antibiosis and dark-pigments secretion of phytopathogenic and environmental fungal species after interaction *in vitro* with an environmental isolate identified as *Bacillus subtilis*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2009.

### **Anexo 3 – Paper 3**

Prolonged infection by *Fonsecaea pedrosoi* after antigenic co-stimulation at different sites in experimental murine chromoblastomycosis. Submitted to Virulence, 2009.

### **Anexo 4 – Paper 4**

Experimental murine chromoblastomycosis obtained with *Fonsecaea pedrosoi* isolate cultivated for a long period. Submitted to The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (JVATiTD), 2009.

### **Anexo 5 – Paper 5**

*Bacillus subtilis* induces morphological changes in *Fosecaea pedrosoi* cells *in vitro* and results in fungal forms that are more resistant to the host response *in vivo*. Submitted to The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (JVATiTD), 2009.

### **Anexo 6 – Currículo Lattes**

## **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1- Fungos Demáciros**

Uma diversidade de espécies fúngicas é agrupada pela característica comum de apresentar coloração variável de verde escuro a marrom e negro devido à presença de melaninas (Henson et al, 1999; De Hoog et al, 2000; Nosanchuck e Casadevall, 2003; Revankar, 2007). Esses microrganismos, conhecidos como fungos demáciros, feóides ou escuros, podem viver como sapróbios ou parasitas (Henson et al, 1999; De Hoog et al, 2000). Os propágulos fúngicos de tais agentes são encontrados no ar, água, solos e alimentos, sendo frequentemente identificados em associações com vegetais, como decompositores (Okeke e Gugnani, 1986; Vicente et al, 2001; Vicente et al, 2008). As espécies que acometem os animais e humanos, em sua maioria, são encontradas na sua forma assexuadas, sendo também descritas como formas imperfeitas (anamorfás) ou mitospóricas (Guarro et al, 1999; Lacaz et al, 2002). Todos os fungos demáciros patogênicos pertencem ao filo dos acosmictetos (Vitale et al, 2009a).

## **1.2- Doenças causadas por fungos demáciros**

O termo feo-hifomicose tem sido empregado para designar doenças cutâneas, subcutâneas e sistêmicas, causadas por hifomicetos, que nos tecidos se apresentam como formas fúngicas micelianas, leveduriformes, entre outras, com coloração escura, marrom ou acastanhada (Lacaz et al, 2002; Revankar, 2007). Entidades clínicas de espectro variado, como piedra negra, tinea nigra, cromoblastomicose (CBM) e feo-hifomicoses são causadas por fungos demáciros (Silveira e Nucci, 2001; Revankar, 2007). Outras manifestações como micetomas, ceratites, sinusites e onicomicoses podem ter etiologia semelhante. Em imunocomprometidos, tais fungos são importantes agentes de infecções

oportunísticas (Silveira e Nucci, 2001; Revankar et al, 2002; Revankar, 2007). Doenças causadas por fungos demácios, como feo-hifomicose, micetoma e CBM, são distinguíveis por sua patogênese, características clínicas e microbiológicas (De Hoog, 1997; Silveira e Nucci, 2001; Lopez-Martinez e Mendez-Tovar, 2007; Revankar, 2007; Santos et al, 2007). No entanto, embora existam tais fronteiras mencionadas, a mesma etiologia, no caso de algumas espécies, pode ser verificada entre essas manifestações dependendo das condições do hospedeiro e modo de infecção (Esterre e Queiroz-Telles, 2006; Queiroz-Telles et al, 2009).

### **1.3 Histórico da cromoblastomicose**

A cromoblastomicose é infecção crônica que acomete o tecido cutâneo e subcutâneo, principalmente, pela presença de células globosas, escurecidas, com ou sem septos, que podem ser observadas de forma isolada ou agrupadas (Esterre e Queiroz-Telles, 2006; Lopez-Martinez e Mendez-Tovar, 2007).

Embora a doença tenha sido estudada por Alexandrino Pedroso em 1911, sob a designação de “blastomicose negra”, somente em 1914, o médico-alemão Max Rudolph, radicado no Brasil, descreveu seis casos de uma infecção conhecida como “figueira”, em pacientes provenientes da cidade de Estrela do Sul (na época situada entre os Estados de Goiás e Minas Gerais), com isolamento de fungo escuro em quatro deles (Al-Doory e Pairon, 1974; Elgart, 1996; Silva, 1998). Nos Estados Unidos da América, um estudo clínico, micológico e patológico minucioso de paciente com “dermatite verrucosa” foi descrito por Medlar e Lane em 1915 (Al-Doory e Pairon, 1974; Elgart, 1996). Pedroso e Gomes, em 1921, relataram um caso da doença, sob nome popular de “formigueiro”, em paciente do interior do Estado de São Paulo (Queiroz-Telles et al, 2009). Várias sinônimas foram atribuídas à

doença, tais como figueira, formigueiro, dermatite verrucosa blastomicótica, dermatite verrucosa cromomicótica, cromomicose, cromomicose cutânea, cromoblastomicose cutânea, doença de Medlar, doença de Gomes, doença de Pedroso, doença de Carrion, doença de Pedroso e Carrion, micose de Lane e Pedroso, doença de Fonseca, sundra, susna, blastomicose negra e moléstia de Guiteras (Al-Doory e Piron, 1974; Lopez-Martinez e Mendez-Tovar, 2007). Em 1922, Terra, Fonseca e Area-Leão, do Instituto Manguinhos, no Rio de Janeiro, estabeleceram o termo “cromoblastomicose” para designar a moléstia. Pablo Negroni, na Argentina, em 1936, em homenagem a Olympio da Fonseca Filho, criou o gênero *Fonsecaeae* em substituição à *Acrotheca* e *Hormodendrum* (Al-Doory, 1972).

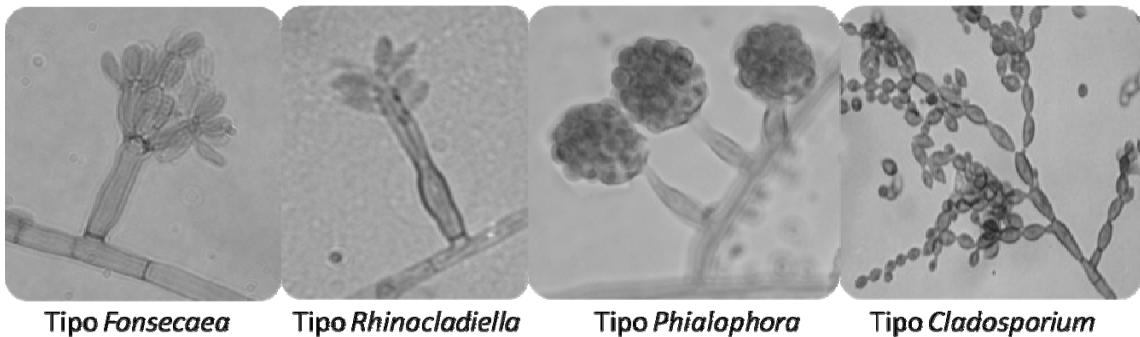
#### **1.4 Etiologia e características dos agentes fúngicos**

Os agentes de CBM pertencem à família *Herpotrichiellaceae*, ordem *Chaetothyriales*, formada por organismos que apresentam história evolutiva relacionada ao parasitismo em hospedeiros vertebrados (De Hoog, 1997; Vicente et al, 2001). De modo geral, a doença tem natureza multietiológica e ocorre pela implantação traumática de fungo demácio na pele e tecido subcutâneo. Uma variedade de agentes fúngicos tem sido descrita em casos de CBM. No entanto, *Fonsecaeae pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* são as espécies mais frequentemente diagnosticadas, enquanto os isolados de *Phialophora verrucosa*, *Exophiala dermatitidis* e *Rhinocladiella aquaspersa* são ocasionais (Elgart, 1996; Esterre e Richard-Blum, 2002; Lopez-Martinez e Mendez-Tovar, 2007; Queiroz-Telles et al, 2009). *Exophiala* spp podem ser agentes de eumicetomas, CBM ou feohifomicoses (sistêmicas ou subcutâneas) o que denota a capacidade desses

microrganismos de causar três entidades clínicas distintas com formas parasitárias diferentes, como hifas, grãos micelianos, leveduras ou células escleróticas (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

Estudos taxonômicos moleculares revelaram que *F. compacta* representa uma variante morfológica de *F. pedrosoi* (De Hoog et al, 2004). Recentemente, *F. monophora* foi descrita como uma nova espécie com fenótipo similar à *F. pedrosoi*, porém, geneticamente distinta (Xi et al, 2008). Embora *F. monophora* seja considerada espécie oportunista, pouco relacionada à CBM (Najafzadeh et al, 2009), estudos moleculares revelaram ser agente predominante em casos da doença no sul da China (Xi et al, 2009). No Brasil, *F. pedrosoi* é o agente mais importante (Silva et al, 1995; Telles-Filho, 1996; Silva, 1998; Minotto et al, 2001).

A identificação específica dos fungos demácios, muitas vezes, é difícil de ser realizada devido a fatores como: ausência de conidiação, polimorfismo e similaridade fenotípica. Condições especiais de crescimento, incluindo nutrientes e incubação em temperaturas diversificadas, bem como a participação de especialistas, podem ser necessárias para a caracterização desses fungos. A identificação das principais espécies envolvidas em CBM, normalmente, é realizada pela observação dos aspectos morfológicos das células reprodutivas, as quais podem apresentar quatro formas de conidiação: tipo acropleurógena, cladospório, fialófora e rinocladiela (Ajello e Hay, 1998; Queiroz-Telles et al, 2003). Somente *F. pedrosoi* apresenta os quatro tipos de conidiação, cuja disposição acropleurógena, característica particular dessa espécie, tem semelhança à copa de um arbusto (Santos et al, 2007).



Tipo *Fonsecaea*      Tipo *Rhinocladiella*      Tipo *Phialophora*      Tipo *Cladosporium*

Em ágar Sabouraud dextrose, à temperatura de 25 C°, a colônia de *F. pedrosoi* é velutina, cinza-escuro-oliváceo ou negra, plana com centro elevado, convexo e reverso negro (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

### **1.5 Ecologia e epidemiologia**

As formas fúngicas envolvidas no estabelecimento do processo infeccioso ainda não são perfeitamente conhecidas, nem como tais células se adaptam do saprofitismo à fase parasitária. Hifas e conídios têm sido citados como possíveis estruturas implantadas no tecido subcutâneo após traumatismo (De Hoog et al, 2000; Corbellini et al, 2006).

A transformação das células fúngicas para células escleróticas tem sido sugerida como possível fator de virulência (De Hoog et al, 2000). Formas arredondadas, similares a corpos escleróticos, também foram verificadas em tecido medular vegetal e espinhos, sendo indicativo da existência *in natura* de estruturas fúngicas pré-adaptadas ao parasitismo (Zeppenfeldt et al, 1994; De Hoog et al, 2000; Badali et al, 2008). Inoculação experimental em cactos de suspenção, predominantemente, composta por conídios de *C. carrionii* demonstrou que as células fúngicas se modificavam nos tecidos vegetais, adquirindo morfologia similar às formas parasitárias, inclusive em espinhos (De Hoog et al, 2007). Corpos escleróticos têm sido obtidos *in vitro* (Alviano et al, 1992; Alviano et al, 2003),

particularmente em meios ácidos, contendo propranolol, mas o seu potencial infectivo ainda não foi estudado experimentalmente. Fatores do hospedeiro podem estar envolvidos na transformação celular *in vivo* de *F. pedrosoi*. Fator ativador de plaquetas (PFA), um fosfolipídio produzido por neutrófilos, macrófagos, basófilos, eosinófilos e células endoteliais, foi demonstrado como indutor da conversão de elementos micelianos de *F. pedrosoi* para corpos escleróticos (Alviano et al, 2003).

Os relatos de CBM ocorrem devido à implantação transcutânea de propágulos fúngicos, em geral, através de traumas por fragmentos vegetais contaminados, como espinhos e lascas de madeira (Ajello e Hay, 1998; Silva et al, 1998). A doença incide, endémicamente, em residentes ou frequentadores de meio rural, através de processos traumáticos por implantação transcutânea de propágulos fúngicos, sendo prevalente nas regiões tropicais e subtropicais (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Lopez-Martinez e Mendez-Tovar, 2007). Borelli (1959) sugeriu, pela primeira vez, a relação de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* com a climatologia regional, associando esses agentes às zonas de clima úmido e semi-árido, respectivamente (Al-Doory, 1972; Esterre e Richard-Blum, 2002). Espécies de Cactaceae, predominantes em regiões desérticas, têm sido indicadas como reservatório natural de *C. carrionii* e como fonte de infecção para população rural (Al-Doory, 1972; De Hoog et al, 2000). Esterre et al (1996), revisando casos da doença em Madagascar, citaram o isolamento de *F. pedrosoi* nas áreas de florestas perenes da ilha, enquanto *C. carrionii* era frequente em áreas secas com vegetação decídua, associada a cactos da região (Esterre et al, 1996a). Babaçu (*Orbignya phalerata*), no Estado do Maranhão, tem sido citado como provável fator de risco ocupacional de infecção humana por *F. pedrosoi* (Silva et al, 1995). Salgado et al (2004) relataram a ocorrência accidental da doença após

contato com espinhos de *Mimosa pudica*, conhecida popularmente como dormideira.

A virulência, viabilidade e quantidade de inóculo do parasita, além dos fatores relacionados ao hospedeiro como idade e condições imunológicas, são importantes no curso da infecção. A manifestação clínica é predominante em homens caucasianos, com idade entre 30 e 60 anos (Silva et al, 1998; Bonifaz et al, 2001; Minotto et al, 2001). Muitos pacientes com lesão ativa na vida adulta referem o trauma, ao tempo de sua infância ou juventude. Esses fatos corroboram para a explicação de que os agentes de CBM, após implantação nos tecidos do hospedeiro, podem permanecer latentes por longos períodos antes de se tornarem invasivos (Rippon, 1988; Attapattu, 1997).

A maioria dos casos da micose procede do continente americano, em especial, do México, América Central (Cuba e República Dominicana) e América do Sul (Brasil, Colômbia, Equador e Venezuela). Apesar de apresentar características climáticas similares, o continente asiático registra baixos índices da doença, sendo a maioria dos casos observados no Sri Lanka, Índia, China e Japão (Attapattu, 1997; Rajendran et al, 1997; Xi et al, 2009). Pequeno número de casos tem sido descrito nos Estados Unidos e Europa (Rippon, 1988; Queiroz-Telles et al, 2009). Madagascar é área endêmica de CBM com elevado número de ocorrências, sendo registrados cerca de 1400 casos entre os anos de 1955 a 1996 (Esterre et al, 1999). Estudos retrospectivos, na região, mostraram que a incidência anual da infecção é de 1:200.000 habitantes, com sub-áreas de elevada ocorrência, como o distrito de Ambovombe, onde os índices chegam a 1:480 habitantes (Esterre et al, 1996a). No Brasil, a micose tem sido registrada da região sul ao extremo norte do país (Silva et al, 1995; Silva, 1998; Minotto et al, 2001). No Sul do país, Minotto et al (2001)

citaram 100 casos da doença em 35 anos, sendo *F. pedrosoi* o agente etiológico em 96% deles, seguido por *P. verrucosa*. Estudo retrospectivo de 325 casos diagnosticados em 55 anos no Estado do Pará, com 78 (24%) culturas identificadas, revelou *F. pedrosoi* em 77 ocasiões e *P. verrucosa* em uma ocorrência (Silva, 1998).

### **1.6 Anatomopatologia**

Corpos fumagóides, muriformes, escleróticos ou células de Medlar são terminologias usadas para descrever as formas parasitárias do fungo na CBM. Nas reações granulomatosas, tais estruturas fúngicas aparecem envoltas por células do hospedeiro, muitas vezes, dentro de células gigantes, estando também presentes em microabscessos situados na interface do tecido epitelial e derme (Esterre e Richard-Blum, 2002; Esterre e Queiroz-Telles, 2006). Estudos histopatológicos têm demonstrado que as lesões teciduais podem exibir hiperplasia pseudoepiteliomatosa com microabscessos, sendo a epiderme importante na eliminação transepitelial do fungo; ou granulomas organizados, ricos em fagócitos polimorfonucleares (Uribe et al, 1989; Esterre e Richard-Blum, 2002).

A lesão inicial pode ser única ou múltipla e, evolutivamente, tende a transformar-se em nódulos que, por sua vez, podem expandir-se lateralmente formando placas, com ou sem exsudato (Telles-Filho, 1996; Queiroz-Telles et al, 2009). A região de implantação e a proximidade com áreas mais vascularizadas podem ser fatores relevantes durante o desenvolvimento de processos fibróticos. Os locais frequentemente acometidos são, em ordem decrescente, os membros inferiores e superiores, seguidos da região glútea, tronco e face (Esterre e Richard-Blum, 2002; Queiroz-Telles et al, 2003; Lopez-Martinez e Mendez-Tovar, 2007). Outros sítios, menos comuns, como nuca, pirâmide nasal, abdome e pavilhão auricular também foram descritos (Esterre et al, 1996a; Lacaz et al, 2002). As

lesões possuem características polimórficas e nos pacientes, geralmente, são unilaterais. No início, apresentam-se de forma papular com superfície lisa e eritematosa que, gradualmente, vão aumentando em tamanho e adquirindo aspecto verrucoso, tumoral, nodular, cicatricial ou de placas queloidianas (Telles-Filho, 1996; Silva, 1998; Esterre e Queiroz-Telles, 2006; Queiroz-Telles et al, 2009). Extensas placas tegumentares podem se formar e, muitas vezes, tendem à ulceração, resultando numa aparência tecidual de couve-flor, além da hiperacantose e hiperceratose (Lacaz et al, 2002). Infecções secundárias por bactérias são comuns e influenciam no aumento da morbidade (Telles-Filho, 1996; Silva, 1998). Propagação linfática, hematológica e metástase cerebral têm sido raramente observadas (Vollum, 1977). Lesões disseminadas foram descritas em paciente HIV-positivo (Duggan et al, 1995). A CBM deve ser diferenciada de outras doenças granulomatosas que apresentam semelhança clínica, como leishmaniose, lacaziose, bouba, esporotricose, lepra, piôdermite vegetante, epiteloma espinocelular e certas formas de lupus (Ajello e Hay, 1998; Silva, 1998).

## **1.7 Terapêutica**

Resistência de alguns agentes fúngicos à terapia antifúngica convencional, elevado custo dos antifúngicos, carência de experimentação animal com drogas mais eficazes e acentuado número de recidivas têm inviabilizado o estabelecimento de regimes terapêuticos satisfatórios para CBM (Elgart, 1996; De Hoog et al, 2000; Brandt e Warnock, 2003; Bonifaz et al, 2004; Esterre e Queiroz-Telles, 2006). Condições imunológicas do hospedeiro, tolerabilidade às drogas e extensão das lesões, têm sido também relacionadas à dificuldade no tratamento da doença (Bonifaz et al, 2004). Quando as lesões são pequenas ou circunscritas, a retirada

cirúrgica parece ideal (Elgart, 1996; Lopez-Martinez e Mendez-Tovar, 2007). Quimioterapia e métodos físicos têm sido empregados, mas ainda não existe um procedimento totalmente eficaz. Calor local, raios *laser* com luz de dióxido de carbono e crioterapia são os métodos físicos mais utilizados no tratamento da CBM, mas os resultados ainda são paliativos, podendo haver recorrência e/ou recrusdecência (Conti-Dias et al, 1964; Boop, 1974; Tagami et al, 1979; Tuffanelli e Milburn, 1990). A crioterapia tem aumentado a porcentagem de pacientes clinicamente curados (Castro et al, 2003), sendo um método bastante empregado devido ao seu baixo custo. No entanto, não é recomendado para infecções crônicas de profundidade, especialmente em regiões de enervação ou vascularização (Bonifaz et al, 1997; Castro et al, 2003).

A eficácia do tratamento da CBM com antifúngicos, no que se refere à duração e posologia, está diretamente relacionada à resistência do agente, sua localização, intensidade dos processos fibrosos e tempo de evolução da doença. Isolados clínicos de *F. pedrosoi* têm demonstrado resistência *in vitro* aos antifúngicos comumente empregados em quimioterapia, tais como azólicos clássicos (De Bedout et al, 1997; Andrade et al, 2004). A droga de escolha para CBM tem sido o itraconazol (Vitale et al, 2009b). Novos azólicos como voriconazol, raviuconazol, posoconazol e isavuconazol têm apresentado atividade antifúngica de largo-espectro *in vitro* e com boa eficácia aos fungos demácios (Fothergill et al, 2009; Gonzalez, 2009). Infecções por *C. carrionii* têm apresentado maior índice de cura do que por *F. pedrosoi* (Esterre et al, 1996b). Lesões extensas e antigas apresentam, em geral, mau prognóstico durante o tratamento. Bons resultados clínicos foram obtidos com terbinafina (500 mg ao dia por 6 a 12 meses) e itraconazol (200-400 mg/dia durante 6 a 4 meses), sendo relatada diminuição do número médio de células fúngicas no

tecido, em cerca de 70%, durante dois a quatro meses pós-tratamento com terbinafina. Nesse período, também ocorreu redução das infecções secundárias por bactérias e de linfoedemas (Esterre et al, 1996b).

Embora exista relevante avanço quanto à produção de novos antifúngicos e testes de susceptibilidade às drogas, o tratamento de micoses causadas por fungos demácios, como a cromoblastomicose, micetomas e feo-hifomicoses sistêmicas, ainda é um grande desafio. Saperconazol (SPZ - R 66905) é um novo derivado triazólico que inibe *F. pedrosoi*, consideravelmente, *in vitro* e *in vivo* (Cardona-Castro et al, 1996). O tratamento da CBM humana com esse antifúngico demonstrou negatividade dos cultivos após 9 meses e não foi observado efeito colateral durante regime diário de 100 a 200 mg (Franco et al, 1992). A utilização de novos antifúngicos, como terbinafina e posococonazol, tem mostrado bons resultados em casos refratários às terapias convencionais (Esterre et al, 1996b; Negroni et al, 2005). A resistência dos fungos demácios aos antimicóticos e a intensa reação de fibrose formada nos processos granulomatosos pode representar um revés para uniformidade de uma quimioterapia ideal à CBM. Em geral, o tratamento com antifúngicos é recomendado por tempo prolongado (Queiroz-Telles et al, 2003; Bonifaz et al, 2004). No entanto, existem pontos agravantes que inviabilizam o regime terapêutico e o acompanhamento clínico, pois os medicamentos podem apresentar nefro/hepatotoxicidade, o nível sócio-econômico baixo da maior parte dos pacientes que dificulta a aquisição das drogas por possuirem custo elevado e residência em áreas rurais, algumas vezes, de difícil acesso (Telles-Filho, 1996; Silva, 1998; Silva et al, 1998).

## **1.8 Infecção experimental**

A inoculação experimental dos agentes de CBM para obtenção de um modelo animal tem sido tentada desde a descoberta da doença (Kurup, 1971; Al-Doory, 1972; Kurita, 1979; Polak, 1984; Ahrens et al, 1989; Cardona-Castro e Agudelo-Florez, 1999). Todavia, os relatos sobre a infecção experimental são escassos e ainda não foi estabelecido, de maneira satisfatória, um modelo animal adequado para o desenvolvimento de doença crônica (Al-Doory, 1972; Ahrens et al, 1989; Cardona-Castro e Agudelo-Florez, 1999; Martinez et al, 2005; Esterre e Queiroz-Telles, 2006). Animais, incluindo camundongos, pombos, ratos, cães, cabras, cobaias e macacos, assim como voluntários humanos, foram infectados experimentalmente, mas, na maioria das vezes, sem sucesso na reprodução de infecção crônica ou semelhança anatomo-patológica à micose humana (Al-Doory, 1972; Borelli, 1987; Ahrens et al, 1989; Alviano et al, 1991; Esterre e Richard-Blum, 2002; Martinez et al, 2005). Esses aspectos talvez indiquem resistência natural dos animais hígidos à infecção. As lesões clínicas em camundongos BALB/c, em geral, se manifestam cinco dias após a inoculação das células de *F. pedrosoi* (Cardona-Castro et al, 1996; Cardona-Castro e Agudelo-Florez, 1999). Infecção de animais imunocompetentes em único sítio com elementos micelianos e/ou conídios de *F. pedrosoi* cultivados *in vitro* por período inferior a 30 dias, em concentrações elevadas, de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/mL, por vias distintas (i.v., s.c., e i.p.) em diferentes tecidos, incluindo subcutâneo, peritoneal e nervoso, normalmente, apresentam resolução em, aproximadamente, 2 meses (Kurup, 1971; Al-Doory, 1972; Kurita, 1979; Polak, 1984; Gugnani et al, 1986; Walsh et al, 1987). Em infecções peritoneais, alto índice de animais apresenta infecção nodular em órgãos internos, confirmada por cultura e exame histopatológico (Ahrens et al, 1989; Cardona-Castro

et al, 1996). No entanto, lesões persistentes têm sido obtidas após inoculação de *F. pedrosoi* em vários sítios de camundongos imunocompetentes (Cardona-Castro et al, 1996; Cardona-Castro e Agudelo-Florez, 1999). Recentemente, infecção crônica em ratos Wister por *F. monophora* foi descrita (Xie et al, 2009).

### **1.9 Antígenos fúngicos e resposta imune**

O papel dos antígenos de *F. pedrosoi* na imunidade natural à CBM é pouco conhecido. Soros de coelhos imunizados com antígeno de *F. pedrosoi* apresentaram reatividade com antígenos de *P. verrucosa* e *C. carriónii* (Cooper e Schneidau, 1970; Suzuki e Takeda, 1975). Alta concentração de lipídios e carboidratos tem sido detectada em antígenos de *F. pedrosoi* (Barros e Resende, 1999) o que, provavelmente, está relacionado às reações cruzadas com moléculas antigênicas de outros agentes fúngicos (Vidal et al, 2003; Vidal et al, 2004).

A resposta humoral na CBM não está bem definida, nem padronizada. Esterre et al (2000), estudando 136 amostras sorológicas de pacientes antes, durante e após o tratamento, verificaram que os parâmetros imunológicos de resposta humoral se correlacionavam com aqueles observados na paracoccidioidomicose. Na forma disseminada desta micose sistêmica, tem sido observado, tipicamente, alto índice de anticorpos específicos, ativação policlonal de células B, antigenemia e resposta celular baixa (Murphy et al, 1998). Em pacientes com CBM, altos índices de anticorpos específicos e imunoglobulinas G foram associados à cronicidade e extensão das lesões (Esterre et al, 2000). Em áreas endêmicas, a população saudável apresentava altos índices de anticorpos circulantes específicos (Esterre et al, 1997).

Os leucócitos possuem importante função contra infecções fúngicas. O balanço da resposta Th1/Th2, com predomínio do perfil Th2, tem sido associado ao

aumento da susceptibilidade à aspergilose, paracoccidioidomicose e histoplasmose, enquanto que o perfil Th1 tem sido relacionado à resistência (Murphy et al, 1998; Clemons et al, 2000; Deepe et al, 2000). Algumas linhagens de camundongos, como A/Sn, A/J e DBA/2, parecem ser mais resistentes à paracoccidioidomicose do que outros animais, o que tem sido associado ao perfil Th1. Nesses animais, foi verificado menor número de parasitas no tecido, ausência de antígenos circulantes, ativação dos fagócitos, IgG2a como principal anticorpo, incapacidade de ativação policlonal e lesões granulomatosas bem organizadas (Murphy et al, 1998). O perfil Th2 tem sido relacionado com a exacerbação da resposta imune humoral, devido ao estímulo da produção de anticorpos. Em contrapartida, células com perfil Th1 produzem determinadas citocinas que estimulam a resposta celular dos fagócitos (Polonelli et al, 2000).

Ahrens et al (1989) demonstraram que células T possuem papel importante na infecção por *F. pedrosoi*, em particular, pela regressão das lesões em camundongos atípicos (Nu/Nu) após transferência adotiva de linfócitos. Ausência de resposta protetora eficiente contra *F. pedrosoi* foi verificada em camundongos T CD4 KO (Sousa Mda et al, 2006)

Muitas especulações quanto à ação microbicida dos macrófagos frente aos microrganismos foram descritas, especialmente, com base em ensaios *in vitro*. Rozental et al. (1994, 1996) verificaram que células de *F. pedrosoi* sobrevivem e proliferam em macrófagos infectados (Rozental et al, 1994; Rozental et al, 1996). A importância dos neutrófilos na defesa imune tem sido comprovada em animais com deficiência neutrofílica, os quais são mais suscetíveis às micoses (Bonnett et al, 2006; Rodriguez et al, 2007). Os neutrófilos são considerados como importantes mediadores de imunidade protetora contra fungos e quando ativados produzem

efeito fungicida sobre *F. pedrosoi* em menos de 20 minutos, embora poucas formas fúngicas sejam fagocitadas (Stevens et al, 1998). Estas células dirigem-se aos tecidos infectados; principalmente, pelos fatores ligados à inflamação, tais como as citocinas pró-inflamatórias; são ativadas e fagocitam o patógeno, criando um fagossomo (Fuchs et al, 2007). No fagolisossomo, o patógeno é destruído através da NADPH oxidase, peptídeos e enzimas (Segal, 2005; Fuchs et al, 2007). Intensa migração de neutrófilos, normalmente, ocorre após inoculação de *F. pedrosoi* em único sítio, sendo associada com resistência à infecção (Nishimura e Miyaji, 1981; Gugnani et al, 1986; Ahrens et al, 1989; Martinez et al, 2005). Fator de necrose tumoral (TNF), presente na membrana de macrófagos, pode induzir neutrófilos à apoptose (Allenbach et al, 2006), o que causa liberação de moléculas microbicidas, oxidativas e proteínas do complemento, bem como, consequente, ativação dos fagócitos teciduais (Ribeiro-Gomes et al, 2006; Nuutila e Lilius, 2007).

O desenvolvimento de respostas imunes a antígenos exógenos pode resultar da interação entre células B e T (Yu et al, 2006). Embora macrófagos e células dendríticas sejam apresentadores profissionais de antígenos, linfócitos B maduros podem ser cruciais na apresentação antigênica, tendo grande destaque em autoimunidade (Meyer-Bahlburg e Rawlings, 2008). Tais células também podem ter relevância na apresentação de antígenos não-próprios.

### **1.10 Melanina e virulência fúngica**

Nos fungos, a formação de pigmentos não é essencial ao seu crescimento e desenvolvimento, mas intensifica sua capacidade de resistência a ambientes hostis, aumentando a sobrevida fúngica (Bell e Wheeler, 1986). Uma diversidade de organismos é capaz de sintetizar melanina, incluindo fungos, bactérias e animais

(Nosanchuck e Casadevall, 2003). Melaninas compreendem pigmentos hidrofóbicos de alto peso molecular, carregados negativamente, sendo formados por polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos, apresentando geralmente coloração negra, marrom, avermelhada ou verde (Henson et al, 1999; Jacobson, 2000). São descritos três tipos: eumelaninas, feomelaninas e alomelaninas. As primeiras são formadas por quininas e radicais livres; as segundas, por tirosina e cisteína e as terceiras por via *p*-hidroxifenilpiruvato e ácido homogentísico (Frases et al, 2007). A localização de tais moléculas na célula é bem definida, geralmente, na parede celular conjugada a glicoproteínas, como a lacase (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Jacobson, 2000; Nosanchuck e Casadevall, 2003). As melaninas tornam as células mais resistentes, em especial, por sequestrarem radicais oxidativos, absorverem luz e energia em forma de calor através de inúmeros grupos carboxílicos cíclicos, intensificarem a termotolerância e ocasionarem maior impermeabilização da parede celular (De Hoog et al, 2000; Jacobson, 2000; Gomez e Nosanchuk, 2003; Langfelder et al, 2003). Muitas espécies fúngicas, patogênicas ao homem, podem se tornar melanizadas *in vivo*, como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, o que confere maior resistência aos antifúngicos e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Silveira e Nucci, 2001; Revankar et al, 2002; Taborda et al, 2008). A presença de melanina nos fungos tem sido considerada como importante mecanismo de defesa antifagocitária (Farbierz et al, 1992; Schnitzler et al, 1999; Da Silva et al, 2006). Partículas de melanina de *F. pedrosoi*, quando ingeridas por macrófagos, influenciam na proteção à destruição do fungo (Farbierz et al, 1990; Farbierz et al, 1992).

## **1.11 Tolerância infecciosa**

A discussão sobre tolerância imunológica a抗ígenos próprios e não-próprios precede 1950, sendo o Dr Frank MacFarlane Burnet agraciado com Prêmio Nobel, em 1960, pelos seus estudos no assunto. Reação de imunossupressão a抗ígenos microbianos por indução de tolerância imunológica tem sido sugerida desde o final do século passado (Schwab, 1975). Trabalhos pioneiros sobre coestimulação imunológica mostraram que camundongos infectados com *Mycobacterium lepraeumurium* e simultaneamente imunizados com cepas mortas apresentavam agravamento da doença (Lefford e Mackaness, 1977). Curiosamente, também vem sendo descrita a coestimulação imune interespecífica - isto é, indução de resposta imunológica por抗ígenos de espécies/microrganismos diferentes - a qual tem sido associada com imunossupressão e aumento de susceptibilidade, em particular, após coinfeções helmínticas e virais ou devido à relação entre doenças parasitárias e vacinação convencional (Cooper et al, 1999; Stewart et al, 1999; Ferreira et al, 2002; Borkow e Bentwich, 2004; Elias et al, 2005). Provavelmente, as células supressoras, uma vez ativadas, efetuariam suas funções de modo não-específico (Cools et al, 2007b).

O papel dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> na tolerância aos抗ígenos próprios era bem conhecido na autoimunidade quando foi relatada, pela primeira vez, a possibilidade de tais células supressoras estarem envolvidas com persistência da infecção murina por *Leishmania major* após inoculação do parasita em dois sítios (Belkaid et al, 2002). Durante os últimos anos, muitas evidências têm sugerido a importância das células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tregs) na tolerância periférica e hiporreatividade imune em várias doenças infecciosas (Piccirillo e Shevach, 2004; Pan et al, 2008). Células promotoras de tolerância podem ser benéficas ao

hospedeiro e ao parasita (Belkaid e Rouse, 2005; Cools et al, 2007a). A imunossupressão, provocada por tais células, bloqueia inflamações excessivas, impedindo acentuado dano tecidual em um ou mais órgãos do hospedeiro. No entanto, a maior permanência dos microrganismos devido à imunossupressão causa maior duração da infecção, podendo levar à adaptações para vida parasitária (O'garra et al, 2004). O controle ou regulação da resposta imune para prevenir ou minimizar os danos teciduais, gerados através da intensa reatividade aos antígenos dos patógenos, são modulados por contato celular e/ou citocinas (O'garra et al, 2004; Cools et al, 2007b). Efeito anti-inflamatório, promovido pelas células supressoras, tem sido associado, em especial, com elevada produção de interleucina-10 (IL-10) e TGF-β (O'garra et al, 2004; Trinchieri, 2007). Ensaio de linfoproliferação de sangue periférico, de pacientes com formas severas da CBM, revelou alto índice de IL-10, enquanto uma baixa produção foi correlacionada às manifestações leves/moderadas (Sousa et al, 2008).

Em geral, animais inoculados em único sítio de infecção, com altas concentrações fúngicas, apresentam eficiente eliminação dos agentes de CBM e desenvolvimento de lesões com intensa migração neutrofílica (Kurup, 1971; Al-Doory, 1972; Kurita, 1979; Nishimura e Miyaji, 1981). No entanto, a inoculação fúngica em mais de um sítio foi associada à infecção prolongada (Cardona-Castro et al, 1996; Cardona-Castro e Agudelo-Florez, 1999; Xie et al, 2009).

## **1.12 Interação microbiana**

Naturalmente, as células sobrevivem através da utilização de macro e micronutrientes, obtidos de fontes orgânicas e inorgânicas. A maior parte das espécies microbianas atua de forma benéfica nos nichos ambientais bióticos e

abióticos, desempenhando função biorregulatória (Gall, 1970; Whipps, 2001; Elad, 2003; Rintala et al, 2008). Bacilos Gram-positivos e fungos estão entre os agentes mais encontrados no solo e envolvidos com biodegradação e biorremediação. A coexistência microbiana nos ambientes, evolutivamente, promove diversas interações, tais como predação, simbiose, mutualismo, competição e antibiose (Gall, 1970; Melin, 2004; Boer et al, 2005). O estudo das interações tem sido muito benéfico ao homem, por exemplo, na descoberta dos antimicrobianos, dos microrganismos biocontroladores de pragas, pro e pré-bióticos (Shirokov et al, 2002; Boer et al, 2005; Broggiini et al, 2005; Guo et al, 2006; Sharma e Sharma, 2008).

Antibiose, geralmente, ocorre pela produção de substâncias tóxicas, algumas vezes, com amplo espectro de ação (Handelsman e Stabb, 1996; Keel e Défago, 1997; Whipps, 1997). Bactérias com propriedades inibitórias do crescimento fúngico têm sido frequentemente descritas, inclusive espécies do gênero *Bacillus* (Handelsman e Stabb, 1996; Keel e Défago, 1997; Whipps, 1997). A capacidade de *Bacillus subtilis* em inibir fitopatógenos, como *Helminthosporium sativum*, *Alternaria brassicae*, *Sphaerotilus fuliginea*, *Coriolus* spp, *Poria* sp, *Stereum* sp, *Hexagonia discopoda*, *Schizophyllum commune*, *Candida* sp, *Fusarium* sp, *Curvularia geniculata*, *Penicillium digitatum*, *Trichoderma viride* e *Rhizoctonia solani*, tem sido descrita (Shirokov et al, 2002; Boer et al, 2005). Alterações morfológicas, como formação de clamidoconídios terminais e intercalares em *A. brassicae* e *H. sativum*, foram observadas após interação com *B. subtilis* e seus metabólitos (Shirokov et al, 2002; Sharma e Sharma, 2008).

### **1.13 *Bacillus* spp e alguns aspectos inerentes desse gênero**

O gênero *Bacillus* apresenta distribuição universal, sendo extremamente diversificado e isolado de várias fontes, como ar, solos, águas e trato gastrointestinal de animais e humanos (Stabb et al, 1994; Cornea et al, 2003; Guo et al, 2006; Cazorla et al, 2007). Essas bactérias possuem forma bacilar, são Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas. Muitas espécies são extremófilas e/ou tolerantes a condições mais estringentes, como elevada alcalinidade, acidez, salinidade e/ou temperatura (Niehaus et al, 1999). Produzem endósporos altamente resistentes, em geral, à dessecção, calor, raios ultravioletas e solventes orgânicos (Sadoff, 1972; Rhodes, 1990). Tais microrganismos são sapróbios, em sua maioria, benéficos ao meio ambiente e aos seres vivos, com exceção de algumas espécies que podem ser patogênicas, como *B. anthracis*, por exemplo.

*Bacillus* spp têm potencialidade de aplicação biotecnológica, como biocontroladores naturais de pragas na agricultura, probióticos para regulação da microbiota humana e animal, na produção de inseticidas, antibióticos e enzimas, como proteases, amilases, lipases, pullanases, xilanases, levansucrases, DNAses e RNAses (Rao et al, 1998; Kulkarni et al, 1999; Niehaus et al, 1999; Pandey et al, 1999). Bactérias antagônicas como *Bacillus*, em geral, atuam significativamente nos nichos por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo (Arras e Arru, 1997). Antibiose contra microrganismos fitopatogênicos e do solo tem sido, frequentemente, associada com produção de metabólitos secundários (Silo-Suh et al, 1994; Stabb et al, 1994; Asaka e Shoda, 1996). A síntese dessas substâncias inibitórias tem sido descrita em diferentes espécies, como *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. polymixa*, *B. brevis*, *B. licheniformis* e *B. circulans* (Holland, 1961; Katz e Demain, 1977; Naclerio et al,

1993; Abee et al, 1995; Batista Junior, 2002; Riley e Wertz, 2002; Lisboa et al, 2006). Peptídeos antibióticos, uma abundante classe de metabólitos secundários, denominados de bacteriocinas, são produzidos por muitos microrganismos, especialmente por bactérias Gram-positivas (Abee et al, 1995). Essas moléculas normalmente são sintetizadas sob condições de estresse nutricional, e sua acumulação é observada, principalmente, na fase estacionária das culturas (Van Der Wal et al, 1995; Bizani e Brandelli, 2002; Riley e Wertz, 2002). Os antibióticos produzidos por *Bacillus* spp têm sido caracterizados, em sua maioria, como oligopeptídeos cíclicos, com baixo peso molecular (Nakano e Zuber, 1990). Essas pequenas moléculas inibitórias podem apresentar ácidos graxos de cadeia longa, sendo definidos como lipopeptídios (Cornea et al, 2003; Romero et al, 2007). O cocultivo de *Bacillus* spp com fungos filamentosos acentua a produção de bacteriocinas (Abee et al, 1995; Cornea et al, 2003).

Diferentes marcadores filogenéticos podem ser utilizados na filogenia e classificação de procariotos. Genes ribossomais (5S, 16S e 23S RNAr) e de proteínas conservadas, envolvidas nos processos de replicação e transcrição (em exemplo, rpoB, gyrA), são descritos como alvos espécie-específicos por possibilitarem maior identidade com sequências disponibilizadas em bancos gênicos (Chun e Bae, 2000; Bavykin et al, 2004; Earl et al, 2007). Usualmente, o sequenciamento dos genes 16S e 23S RNAr tem sido ferramenta adicional na identificação de microrganismos, especialmente de isolados ambientais (Earl et al, 2007; Janda e Abbott, 2007). Entretanto, em alguns casos, sequências de DNA ribossomal podem ser pouco discriminatórias para espécie ou subespécie microbiana (Chun e Bae, 2000; Bavykin et al, 2004). Alto índice de misclassificação tem sido detectado no filo Firmicutes (Wang et al, 2007). Clerck et al (2004)

relataram a análise da sequência 16S rRNA como procedimento insuficiente para identificação em nível de espécie e/ou subespécie do gênero *Bacillus*, em particular do grupo cereus e subtilis. Devido à acentuada homologia nas sequências 16S RNAr, outros genes, como *gyrA* e *rpoB*, podem auxiliar na identificação do grupo subtilis (Chun e Bae, 2000; Bavykin et al, 2004; De Clerck et al, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

Com o intuito de produzir infecção experimental crônica por *F. pedrosoi*, os seguintes estudos foram realizados:

- 2.1 Investigar a cromoblastomicose experimental em camundongos por inoculação, subcutânea e intraperitoneal, com diferentes formas de *F. pedrosoi* provenientes de cultivos jovens;
- 2.2 Analisar os aspectos elementares da resposta imune e histopatológicos em animais hígidos e *knockouts* coestimulados antigenicamente em dois sítios;
- 2.3 Caracterizar os isolado bacteriano ambiental por métodos clássicos e moleculares e de suas propriedades antagônicas a fungos filamentosos;
- 2.4 Estudar a interação *in vitro* entre cepa bacteriana e *F. pedrosoi* e sua importância *in vivo*;
- 2.5 Averiguar a morfologia das células fúngicas contidas em cultivos de *F. pedrosoi*, mantidos por longos períodos de tempo, e o seu potencial infectivo em animais de experimentação.
- 2.6 Estudo da cinética e avaliação anatomo-patológica da infecção murina.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A CBM é doença humana de curso crônico, endêmica em certas regiões brasileiras, de natureza fúngica multietiológica, sendo *F. pedrosoi* o principal agente. Em tecido, os agentes infecciosos apresentam formas parasitárias arredondadas, melanizadas, com parede celular espessa e, muitas vezes, divisão planária, as quais têm recebido várias denominações, em especial, corpos escleróticos ou muriformes. Os tratamentos disponíveis nem sempre são eficazes. Os relatos sobre CBM e *F. pedrosoi*, em sua maioria, têm contemplado assuntos relacionados à clínica médica, biologia e bioquímica do fungo. Investigações envolvendo infecções experimentais podem fornecer subsídios para compreensão dos mecanismos envolvidos na interação parasito/hospedeiro e informações relevantes para o conhecimento da imunopatologia, padronização de diagnósticos e testes de novos esquemas terapêuticos. Um ponto relevante para o estabelecimento de um modelo animal adequado diz respeito à produção de células mais virulentas e resistentes à ação dos fagócitos, uma vez que, as investigações com formas fúngicas convencionais não mostraram êxito na obtenção de infecção crônica. A integridade das defesas imunológicas do hospedeiro é outro fator importante a ser considerado. A imunossupressão, por exemplo, pode servir como mecanismo adicional para ampliar as chances de estabelecimento do processo infeccioso e maior sobrevida do parasita nos animais.

Nesse sentido, inicialmente, procuramos estudar diferentes células de *F. pedrosoi*, produzidas *in vitro*, quanto a sua capacidade de transformação em células escleróticas *in vivo*. Posteriormente, analisamos aspectos da resposta tecidual e imune referente à coestimulação antigênica, baseados, em particular, na possibilidade de que a inoculação de microrganismos em mais de um sítio podia causar infecções prolongadas, conforme Cardona-Castro e Agudelo-Florez (1999), Belkaid et al (2002).

Ambientes hostis, como presença de substâncias inibitórias e condições estringentes ao crescimento fúngico, induzem adaptações celulares, ocasionando maior resistência microbiana e consequente aumento da sobrevida frente aos fatores

adversos do meio. O antagonismo entre microrganismos é amplamente difundido na natureza. Alterações da morfologia fúngica *in vitro* após interação com bactérias podem ocorrer, em especial, devido a reações de antibiose. Ao estudar a microflora edáfica na Cidade de Cuiabá, selecionamos um bacilo Gram-positivo, potencialmente inibitório do crescimento fúngico. A partir dessa pesquisa, realizamos cocultivo de *F. pedrosoi* com a bactéria antagônica, tendo por finalidade verificar se tal interação poderia causar transformação fúngica e aumento de virulência do fungo *in vivo*. Dentro desse contexto de condições inóspitas para o crescimento fúngico, também notamos que cultivos axênicos, mantidos por longos períodos de tempo, continham várias formas fúngicas, algumas similares a corpos escleróticos. Desse modo, tais células foram estudadas quanto à sua morfologia e potencial infectivo em modelos murinos.

Por fim, os estudos foram inter-dependentes com o objetivo principal de buscar um modelo experimental de infecção crônica por *F. pedrosoi*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## 4.1 Microrganismo

### 4.1.1 *Fonsecaea pedrosoi*

#### 4.1.1.1 Cepa

Cultivo de *F. pedrosoi* (EPM - 380/03), proveniente de paciente com CBM, atendido no Ambulatório de Dermatologia/UNIFESP em 2003, foi mantido em Sabouraud dextrose ágar (SDA, DIFCO Laboratories, Detroit, MI) com gentamicina 80mg/L à temperatura de 30°C, por repiques periódicos em intervalos de 15 dias em SDA com antibiótico. O isolado também foi mantido, conforme método de *Castellanii*, em H<sub>2</sub>O destilada esterilizada em tubos de penicilina lacrados.

#### 4.1.1.2 Inóculo fúngico

##### 4.1.1.2.1 Conídios

Conídios foram obtidos a partir de cultivos de 30 dias, mantidos sob agitação constante de 100 rpm em *shaker* (TE-420, TECNAL), à temperatura de 30°C, em caldo batata dextrose (PDB, DIFCO laboratories). As células foram filtradas em membrana de 3µm (Grade nº. 43, Whatman), recuperadas em tubos Falcon esterilizados, e concentradas a 3000g e 4°C, por 10 min (Figura 1, A).

##### 4.1.1.2.2 Células conidiogênicas e conídios (CCC)

Cultivos de *F. pedrosoi* foram incubados em *Shaker* (TE-420, TECNAL), sob agitação de 100 rpm por 30 dias, à temperatura de 30°C, em frascos cilíndricos de 1 L (KIMAX®, DAIGGER Lab Equipments and Supplies), contendo 300 mL de caldo batata dextrose (PDB, DIFCO laboratories), pH 5.7, e filtrados em papel de filtro com porosidade de 16 µm (Grade nº. 43, Whatman). Em seguida, os filtrados foram

centrifugados a 3000 g e 4°C, por 10 min. As células conidiogênicas (*yeast-like*) foram reconhecidas em observações microscópicas pela conidiogênese blástica (Figura 1, B).

#### 4.1.1.2.3 Hifas

Cultivos fúngicos foram mantidos em *Shaker* (TE-420, TECNAL), sob agitação de 100 rpm por 30 dias, à temperatura de 30°C, em frascos cilíndricos de 1 L, contendo 300 mL de Sabouraud dextrose caldo (SDB, DIFCO Laboratories, Detroit, MI), pH 5.7, com gentamicina. Estruturas micelianas foram centrifugadas de 500 a 1000g e 4°C, por 10 min, em tubos Falcon de 50 mL, agitadas em vortex, por três vezes, e filtradas em gaze esterilizada para retenção de agregados fúngicos macroscópicos. Os filtrados foram, então, aspirados com seringa de 20 mL esterilizada e injetados em Beaker de 50 mL, por várias vezes, para quebra de *clusters* micelianos e obtenção de hifas solitárias. Tal solução foi filtrada em papel de filtro esterilizado com porosidade de 16 µm (Grade nº. 43, Whatman), sendo as células retidas, banhadas com 150 mL de água destilada esterilizada. A região contendo as hifas foi recortada e inserida em tubo Falcon de 15 mL, contendo água esterilizada. O papel filtro foi retirado dos tubos e as células centrifugadas à 1500g e 4°C, por 5 min. A metodologia teve por finalidade a obtenção de fragmentos de hifa, geralmente, sem presença de conídios e células conidiogênicas solitárias (Figura 1, C).



Figura 1 – Microscopia óptica de formas micelianas de *F. pedrosoi*. A - Conídios piriformes; 400x. B - Células conidiogênicas e conídios (CCC); 1000x. C – hifas, 400x.

#### 4.1.1.2.4 Células mortas por calor úmido

Células fúngicas (CCC) foram autoclavadas em tubos Falcon de 50 mL, durante 20 min, à 121 °C e 1 atm de pressão para obtenção de inóculo inviável.

#### 4.1.1.2.5 Viabilidade celular

As estruturas celulares obtidas foram reconcentradas e ressuspendidas, em tampão salino, por três vezes. A viabilidade do inóculo foi avaliada com LIVE/DEAD Cell Vitality Assay Kit (L3.495, Invitrogen) em microscópio de fluorescência, pela contagem de cinco campos microscópicos. O total de formas fúngicas emissoras de fluorescência verde foi multiplicado por 100 e dividido pelo total de células presentes no campo claro.

## 4.2 Análises microscópicas

As imagens teciduais e das células microbianas foram obtidas através de câmera digital Q-Color5, acoplada ao microscópico óptico Olympus BX50 (Laboratório de Micologia/UNIFESP), sendo processadas e analisadas em programa Image-Pro Express (version 6.3, [www.mediacy.com](http://www.mediacy.com)).

#### 4.3 Animais

Três linhagens de camundongos machos de 6 a 8 semanas com cerca de 23 g, sendo BALB/c, C57BL6 e Swiss, foram utilizadas no estudo, conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética/UNIFESP/EPM n° 0808/05. Animais SPF (specific-pathogen-free) e *knockouts* (KO) foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (CEDEME/UNIFESP, São Paulo, BR) e do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia (ICB/USP, São Paulo, BR). Camundongos Xid foram obtidos com o Prof. Dr Mario Mariano, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (UNIFESP, São Paulo, BR). Dose letal de 300 rad, em dois ciclos, foi administrada individualmente em um grupo de camundongos BALB/c (n = 30), tendo em vista a radiosensibilidade das células B1 peritoneais. Todos os experimentos foram realizados de acordo com procedimentos padrão de uso e cuidados com animais de laboratório (Ccac, 1993; Cguanbr, 2003; Naclar, 2004).

##### 4.3.1 Infecções

Com a finalidade de aumentar a virulência fúngica e adaptar o isolado humano às condições de sobrevida em animal, cultivo de *F. pedrosoi* em PDB (item 4.1.1.2.2), foi reinoculado, intraperitonealmente, em animais, por três vezes, sob concentração de  $1 \times 10^8$  células/mL, sendo recuperado em Mycosel<sup>TM</sup> ágar (BD BBL, Franklin Lakes, NJ, USA), 20 dias depois da infecção (Cardona-Castro e Agudelo-Florez, 1999).

Soluções contendo cultivo fúngico foram ajustadas em câmara de Neubauer para concentração final de  $1 \times 10^6$  células. Os fragmentos micelianos continham, em

média, de 6 a 10 septos. A separação de um septo ao outro foi utilizada como critério para contagem do número células das hifas.

Dez minutos antes da infecção, os animais foram anestesiados i.p. com 0,4 $\mu$ L de Anasedan e Dopalen 0,35 mL/kg (Vetbrands, Jacareí - S.P., Brasil). Cerca de 50  $\mu$ L de PBS foram administrados no coxim plantar em camundongos BALB/c, Swiss e C57BL6 (controles negativos), sendo cada grupo constituído de 5 animais.

As lesões das patas foram acompanhadas semanalmente. Um paquímetro digital (<http://www.mitutoyo.com>) foi empregado para medir altura e largura das patas. O volume aproximado das patas foi calculado através de fórmulas aritméticas do cilindro ( $V=\pi r^2 h$ ) ou esfera ( $V=4\pi r^3/3$ ), dependendo do formato da pata pós-infecção.

#### 4.3.1.1 Infecção em único sítio com diferentes formas micelianas de *F. pedrosoi* provenientes de cultivos jovens

Grupos de 30 camundongos BALB/c foram infectados com 50  $\mu$ L de inóculo de *F. pedrosoi*, em concentração final de  $1\times 10^6$  células, na cavidade peritoneal (i.p.), com conídios e CCC. Devido à observação de transformações celulares *in vivo* para corpos escleróticos pós-infecção com CCC, um grupo contendo 50 animais foi inoculado no coxim plantar, por via subcutânea (s.c.), com inóculo na mesma concentração. Cerca de 100  $\mu$ L de solução contendo hifas foram inoculados somente no peritônio, em concentração final de  $1\times 10^6$  células, com agulha 25x8/21G1. A cinética da infecção foi acompanhada, semanalmente, durante dois meses, sendo três animais sacrificados a cada semana, exceto o grupo inoculado na pata, o qual foi observado por período de 165 dias e os animais foram sacrificados até a décima semana.

#### 4.3.1.2 Coestimulação antigênica

##### 4.3.1.2.1 Infecção em dois sítios

Um grupo de camundongos BALB/c, contendo 30 animais, foi infectado s.c. no coxim plantar e i.p., com cerca de 50 $\mu$ L de inóculo fúngico viável (CCC), na concentração final de 1x10<sup>6</sup> células. Após verificação de discrepância entre animais infectados em um e dois sítios (através de análise da cinética da infecção e estudo anatomo-patológico), três grupos de camundongos de linhagens diferentes, BALB/c, Swiss e C57BL/6, contendo 50 animais cada, foram estimulados i.p. com 100 $\mu$ L de antígeno (item 4.1.1.2.4) e s.c. no coxim plantar com 50 $\mu$ L do mesmo inóculo viável descrito anteriormente. Posteriormente, com finalidade de estudar aspectos da resposta imune, relacionadas ao estímulo de dois sítios (imunização i.p. e infecção s.c. da pata), foram utilizados grupos de animais (n = 30): *knockouts* para CD4, CD8, TNF- $\alpha$ , IL-10, MHC-II, deficientes em B1 e camundongos irradiados. Três animais de cada grupo foram sacrificados mensalmente. A cinética da infecção foi acompanhada durante até 165 dias. Após 6 meses de infecção, dois grupos, CD8 KO e Xid, contendo 12 animais cada, ainda apresentavam lesões ativas, sendo os animais CD8 KO sacrificados, devido ao agravamento da infecção, e os camundongos Xid mantidos sob observação para acompanhamento por período de até 8 meses.

##### 4.3.1.2.2 Estímulo antigênico das mucosas

Cerca de 50 $\mu$ L de antígeno fúngico sob concentração final de 1x10<sup>6</sup> células mortas foram administrados v.o., semanalmente, por três vezes, em um grupo de camundongos BALB/c (n = 30), sendo o coxim plantar infectado s.c. no mesmo dia

da última dose. Traqueostomia foi realizada em outro grupo de camundongos BALB/c ( $n = 30$ ) para inoculação de  $50\mu\text{L}$  do mesmo antígeno na mucosa pulmonar.

Em todos os grupos coestimulados, a imunização e a infecção s.c. do coxim plantar, ocorreram simultaneamente, no mesmo dia, com exceção do grupo em que os抗ígenos foram administrados por via oral.

#### 4.4 Ensaio de interação microbiana

##### 4.4.1 Microrganismos testados

Amostras provenientes de solos foram coletadas aleatoriamente no campus da Universidade Federal de Mato Grosso, Cidade de Cuiabá/MT. Em seguida, foram adicionados 100 mL de tampão salino (PBS) em cada 10 gramas de terra. As soluções foram filtradas em papel de filtro comum e decantadas, por duas horas. Os sobrenadantes foram diluídos em concentrações de 1/10 e 1/100. Os espécimes ambientais foram então plaqueados em Trypticase™ Soy ágar (TSA, Difco/BBL), pH 7,3, e incubados à temperatura de 30°C, por 48 horas. Um isolado bacteriano com acentuada atividade antifúngica *in vitro* foi detectado, sendo o seu cultivo selecionado para estudos posteriores, com os seguintes fungos de origem ambiental: *Penicillium* sp, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, e fitopatogênicos: *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum f.sp vasinfectum*, *Colletotrichum* sp.

##### 4.4.2 Cocultivos

Espécies fúngicas e o isolado bacteriano foram inoculados em discos esterilizados de papel filtro, sob concentração final de  $1 \times 10^6$  células. Para teste de antagonismo microbiano, os discos inoculados foram semeados, em triplicata, em

placas de Petri contendo meio de TSA ou SDA (Difco/BBL), separados de 3 a 5 cm um do outro. Os cocultivos foram mantidos à temperatura ambiente e à 37°C por uma semana. O efeito antagônico do bacilo foi observado pelas zonas de inibição do crescimento fúngico (Foldes et al, 2000; Cornea et al, 2003). Devido o bacilo produzir enzimas hidrolíticas de DNA em ágar DNAse, foi realizado cocultivo desse microrganismo e fungos em ágar DNase com azul de toluidina 0,1% (Difco/BBL), pH 7.3, sendo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 usado como controle positivo e *S. epidermidis* ATCC 12228, como controle negativo. Placas em triplicata foram incubadas à 37°C e mantidas em estufa por 5 dias, pelo menos. Foram realizados cultivos em placas de Petri, contendo SDA e azul de toluidina, tendo por finalidade verificar se as substâncias produzidas pelo bacilo tinham influência sob o corante utilizado no meio DNase. Aos cultivos de *F. pedrosoi* em 300 mL de SDB sem antibiótico, mantidos por 30 dias, conforme condições de crescimento para obtenção de hifas (item 4.1.1.2.3), foi adicionado 1mL de inóculo bacteriano, em concentração conforme escala 0,5 de MacFarland. Após 24, 48 e 72 horas as células fúngicas foram obtidas para estudos da morfologia em microscópio óptico. A partir do cocultivo de 72 horas, foi obtido inóculo fúngico para experimento de infecção animal (item 4.5), de acordo com metodologia descrita anteriormente para isolamento de hifas (item 4.1.1.2.3) e análise de viabilidade celular (item 4.1.1.2.5).

#### 4.4.3 Identificação clássica de isolado bacteriano com propriedades antagônicas

A caracterização preliminar compreendeu análise macroscópica das colônias e microscópica da morfologia, posição dos endósporos, coloração ao método de Gram e presença de cápsula pelo método de GINS (Foldes et al, 2000; Aslim et al, 2002). Foram realizados testes bioquímicos de utilização de citrato, redução de

nitrato a nitrito, manitol, crescimento em 6,5 e 10% NaCl, produção de H<sub>2</sub>S, formação de indol, vermelho de metila, Voges Proskauer (VP), descarboxilação de ornitina e esculina. Testes enzimáticos de hidrólise do amido, oxidase, produção de catalase, urease, lecitinase, lipase, caseinase e β-hemolisinas também foram realizados (Reva et al, 1995; Winn et al, 2005). O crescimento foi analisado em ágar e caldo trípico de soja (TSA e TSB, Difco) e em SDA à temperatura de 4°, 20°, 25°, 37°, 42° e 55°C, considerando os intervalos de tempo entre 24 e 48 horas.

#### 4.4.4 Identificação molecular da bactéria antagônica

##### 4.4.4.1 Extração e purificação do DNA genômico

Células de colônias com crescimento de 24 horas à 30°C em TSA foram ressuspensas em 400 µL de tampão de lise, sendo adicionados 50 µL de lisozima e 25 µL de RNase para concentração final respectiva de, aproximadamente, 1 mg/eppendorf e 10 µg/mL. Os eppendorfs foram incubados à 37°C por 15 min, sendo cuidadosamente agitados durante o período. Ao lisado, foram adicionados 50 µL lauroylsarcosine 20% (Sigma-Aldrich), deixando-se em gelo por 5 min até que o material ficasse translúcido. Posteriormente, 500 µL de reagente fenol : clorofórmio (Sigma-Aldrich) foram adicionados aos tubos. O material genético foi precipitado em 1mL de álcool etílico, com NaOAc 0,3M, por 5 min, à temperatura ambiente. O pellet foi centrifugado e brevemente lavado com álcool etílico 70%, sendo ressuspensido em 100 µL de tampão TE. Preparações genômicas foram quantificadas em espectrofotômetro por absorbância à 260nm e estocadas à -20°C até o momento do uso.

#### 4.4.4.2 Amplificação dos genes 16S RNAr, rpoB e gyrA

A reação de PCR foi realizada com os seguintes primers, 16S RNAr (8bF, 5'-ACTGGGATCCACAGGAGTGCAAACGACGA-3', 518f, 5'- CCAGCAGGCCGCGGTAA T-3', 1406r, 5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3' e 1512r, 5'- CTGAAGCTTACGGYTAGCT TGTTACGACTT-3'), gyrA (*gyrA-f*, 5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCCTT-3', *gyrA-r*, 5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3'), rpoB (*rpoB-f*, 5'-AGGTCAACTAGTTCA GTATGGAC-3', e *rpoB-r*, 5'-AAGAACCGTAACCGGCAACTT-3') (Sanchez-Porro et al, 2003; Winn et al, 2005). Para cada 50 µL de mistura de reação de PCR foram usados 5 µL tampão Taq 10x, 3 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.4 µL dNTPs 25 mM, 0.5 µL Taq-polimerase 5 U/mL (Fermentas, origem de todos reagentes anteriormente mencionados), 1.25 µL primer 20 mM, 50 ng DNA genômico e 36.1 µL H<sub>2</sub>O milli-Q. Reações foram realizadas diretamente de células bacterianas, como controle-positivo e mistura de PCR, sendo controle-negativo. A reação ocorreu em termociclador BioRad (PTC 1148 MJ mini thermal cycler), sob 35 ciclos de denaturação, por 1 min, à 94°C, anelamento por 1 min à 48°C, e extensão, sendo um ciclo de 2 min e outro de 9 min à 72°C. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose ultrapura 1% (Invitrogen), utilizando-se como padrão molecular GeneRuler 1kb DNA ladder (Life Sciences).

#### 4.4.4.3 Sequenciamento e alinhamento dos genes 16S RNAr, rpoB e gyrA

Cinco produtos de PCR de cada gene foram extraídos do gel de agarose com QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN). Para cada 15 µL de reação de PCR foram utilizados, aproximadamente, 100 ng de DNA purificado, 3 µL de tampão de sequenciamento 5X, 2 µL Big Dye, 10 pmols de primers *forward* e *reverse* e H<sub>2</sub>O. O sequenciamento foi realizado em ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems). Sequências obtidas foram agrupadas no programa Bioedit, alinhadas através de ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)) e blastadas em quatro bancos de dados, GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), EMBL ([www-db.embl.de](http://www-db.embl.de)), RDP II ([rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)), DDBJ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>).

#### 4.5 Infecção com células fúngicas cocultivadas com *B. subtilis*

Aproximadamente 100 µL de suspensão, contendo  $1 \times 10^6$  células/mL (cerca de  $1 \times 10^5$  pequenos fragmentos de hifas), foram inoculados i.p., com agulha 25x8/21G1, em um grupo de 30 camundongos BALB/c. Hifas cultivadas em meio com antibiótico (item 4.1.1.2.3), sob mesma concentração descrita anteriormente, foram inoculadas em outro grupo de 30 animais. A cinética da infecção foi observada durante um mês. Três animais por grupo foram sacrificados de 3 em 3 dias, e os abscessos removidos para cultivo em SDA e análise histopatológica.

#### 4.6 Estudo das células de *F. pedrosoi* cultivadas por longos períodos de tempo

##### 4.6.1 Cultivo fúngico

Culturas de *F. pedrosoi* foram mantidas em frascos de cultura de 1 L (DAIGGER Lab Equipment and Supplies), contendo 300 mL de SDB, pH 5.7, acrescidos de gentamicina, à temperatura de 30 °C, sob agitação constante de 100 rpm em Shaker, durante 6 meses.

##### 4.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Células de *F. pedrosoi* cultivadas durante seis meses foram fixadas em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo glutaraldeído 3% e formaldeído 4%, por 2 horas, à temperatura ambiente. As células fixadas foram lavadas, três

vezes, com tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, em dois tempos de 30 min e incubadas *overnight*, sendo, posteriormente, pós-fixadas em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, contendo tetróxido de ósmio 2%, por 2 horas. As células foram, então, lavadas com tampão cacodilato de sódio 0.1 M, por três vezes, e gradualmente desidratadas em soluções etanólicas. Subsequentemente, foram embebidas em resina Epon. Secções ultrafinas foram montadas em grades Formvar e coradas por solução contendo acetato de urânio e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). O material foi observado em microscópio eletrônico JEOL 1200 EX II à 80 kV (Electron Microscopy Sciences Company, origem dos materiais utilizados). Os procedimentos foram realizados sob supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edna Freymuller no Laboratório de Microscopia Eletrônica (DMIP/UNIFESP, São Paulo, BR).

#### 4.6.3 Infecção com células de *F. pedrosoi* cultivadas por longos períodos

Formas fúngicas cultivadas por 6 meses em SDB foram filtradas em papel de filtro com porosidade de 16 µm (Grade nº. 43, Whatman). Subsequentemente, os filtrados foram centrifugados por três vezes, com adição de PBS, à 3000 g e 4°C, por 10 min. As células foram analisadas quanto à viabilidade e ajustadas em câmara de Neubauer para concentração final de  $1 \times 10^3$  células. Dois grupos, contendo 20 animais cada, foram utilizados no estudo. Um grupo foi infectado s.c. no coxim plantar em único sítio e outro, nas duas patas. As lesões das patas foram acompanhadas mensalmente por observações periódicas durante 210 dias.

#### 4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos pelo mensuramento das patas foram transformados em médias e SE para cada grupo. O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do

software Graphpad Prism (<http://www.prism-software.com>). Testes paramétricos ou não-paramétricos, como Student's *t*, Friedman e Anova, foram utilizados para variáveis intervalares de acordo com a normalidade da distribuição dos dados pelo teste *D'Agostino & Pearson omnibus normality* e relação entre as amostras para nível de significância de P < 0.05.

#### 4.8 Exame micológico

Partes teciduais das biópsias de abscessos peritoneais ou das patas infectadas, obtidas após sacrifício dos animais, foram submetidas a exame direto por microscopia óptica com KOH 20% e cultivo em SDA, à 37°C, por até 30 dias.

#### 4.9 Histopatologia

Amostras de tecidos contendo fistulas, abscessos ou pontos negros macroscópicos foram colocados em formol 10%, por 12 horas. Tecidos ósseos das patas foram descalcificados previamente com sal dissódico tetracético etilenodiamino 5% (EDTA, Sigma-Aldrich) (Bourque et al, 1993). Os espécimes foram embebidos em parafina, sendo os blocos seccionados, seriadamente (Cardona-Castro e Agudelo-Florez, 1999). Cortes de 3 a 5 µm foram fixados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (H&E, Sigma-Aldrich), através do método Brown-Brenn (B&B, coloração de Gram modificada para tecido) e ácido periódico de Schiff (PAS, MERCK Chemicals).

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 Infecção com diferentes formas de *F. pedrosoi* em único sítio

### 5.1.1 Infecção com conídios

Pequenas lesões nodulares, pouco palpáveis, foram observadas quatro dias pós-inoculação i.p. de conídios. Nas amostras teciduais foi verificada a presença de conídios e tubos germinativos (Figura 2 A). Tais estruturas eram facilmente destruídas no interior de macrófagos esponjosos e células gigantes após a primeira semana de infecção (Figura 2, B e D). Elevado número de macrófagos esponjosos foram observados na lesão e a infiltração de neutrófilos era pouco expressiva. A infecção com conídios produziu resposta inflamatória pouco acentuada em relação aos outros grupos de animais inoculados com hifas ou CCC. Três semanas pós-infecção, não houve recuperação de células fúngicas em culturas a partir de amostras teciduais dos camundongos infectados com conídios. Nesse período, os animais demonstravam sinais de cura clínica e micológica.

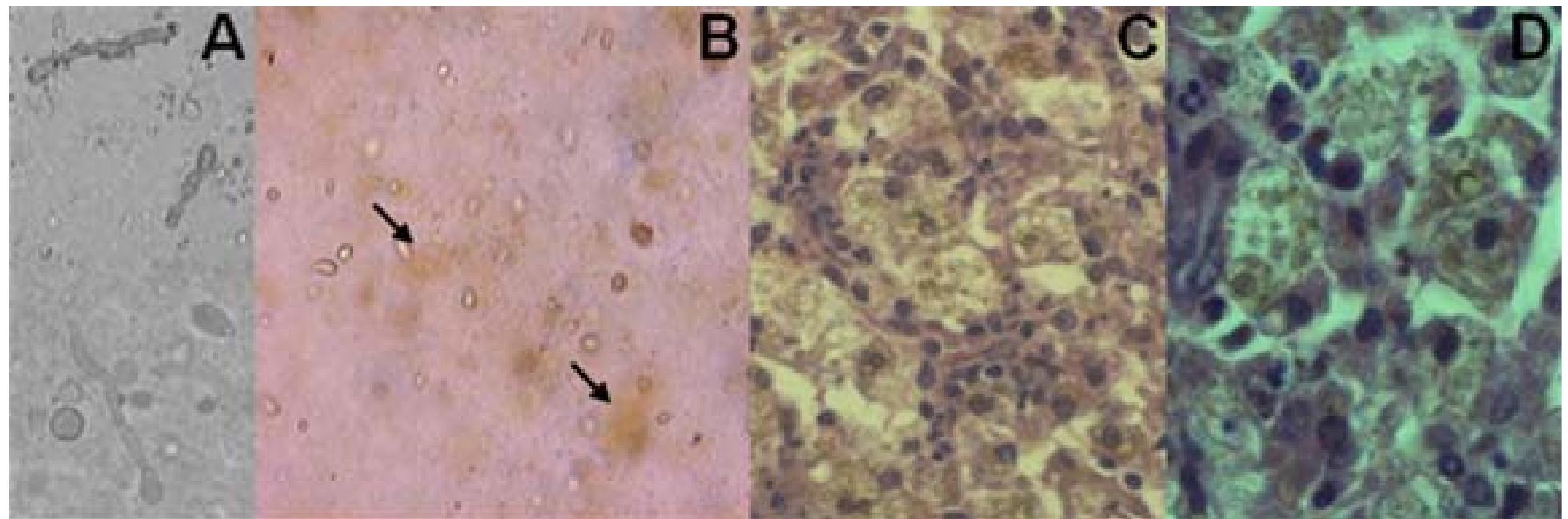


Figura 2 – Formas fúngicas visualizadas em tecido animal após inoculação i.p. com conídios de *F. pedrosoi*. A – Conídios e tubos germinativos, observados em tecido, após 4 dias de infecção; exame direto, 1000x. B – Zonas teciduais pigmentadas, produzidas por intensa destruição dos conídios, 12 dias depois da inoculação; exame direto, 200x. C e D - Conídios e debrís fúngicos internalizados em macrófagos, H&E; C, 400x; D, 1000x.

### 5.1.2 Infecção com CCC

Muitas células conidiogênicas e conídios permaneciam ligados, não sendo possível separar tais formas fúngicas (Figura 1, C). Após o quarto dia de inoculação, nódulos firmes de 6 a 8 mm, palpáveis e inflamados foram observados nos grupos infectados i.p. com CCC.

A partir da segunda semana, foi verificada a presença de formas arredondadas, com acentuada produção de pigmento escuro, enrijecimento e espessamento da parede celular, e conídios inalterados ou germinados formando tubos germinativos (Figura 3).

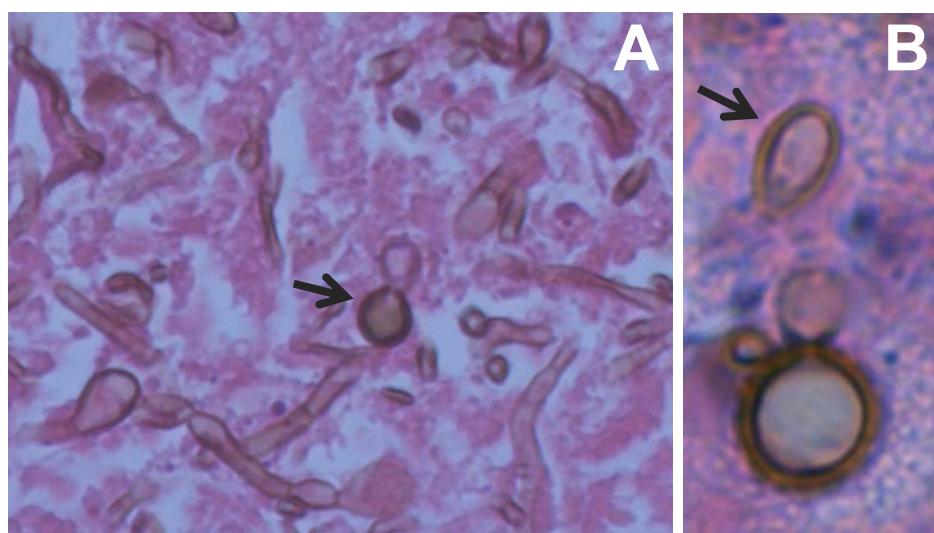


Figure 3 – Corte histopatológico de pata infectada com células fúngicas de *F. pedrosoi*, 15 dias pós-inoculação. A – Conídios, tubos germinativos e célula conidiogênica (seta) com espessamento da parede; H&E, 400x. B - Conídio (seta) e célula condidiogênica (*yeast-like*) com parede celular espessa; H&E, 1000x.

Pico da resposta inflamatória, observado em patas de animais infectados por via s.c. com CCC, entre 30 e 35 dias após a infecção (Figura 4).

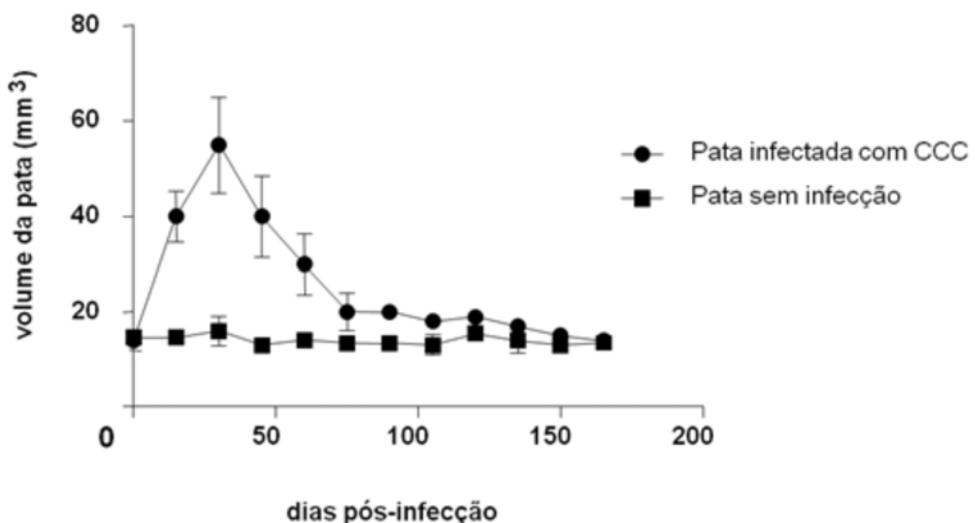


Figura 4 – Cinética da lesão nas patas de camundongos BALB/c, observada durante 165 dias pós-inoculação s.c. do coxim plantar com CCC. Pico inflamatório verificado, em média, após 1 mês de infecção, ocorrendo, posteriormente, regressão da lesão e evolução para cura. Patas do grupo controle foram tratadas com 50  $\mu$ L de PBS. Dados experimentais são representados por médias e SE, teste *t* Student's,  $P < 0.05$ .

Características clínicas e micológicas da lesão plantar após infecção com CCC estão apresentadas na Figura 5. Fissuração e formação de úlceras (Figura 5; linha A, fotos 2, 3 e 4), com produção de exsudato no coxim plantar, muitas vezes, relacionadas aos processos de eliminação tecidual das células fúngicas, se intensificavam após a segunda semana de infecção. Nos abscessos, os conídios eram eliminados mais precocemente do que as células conidiogênicas, em geral, na terceira semana. Os conídios germinavam formando tubos germinativos, semelhantes a hifas curtas e delgadas, ou não apresentavam modificações estruturais em cortes sequenciais (Figura 5, linha B).

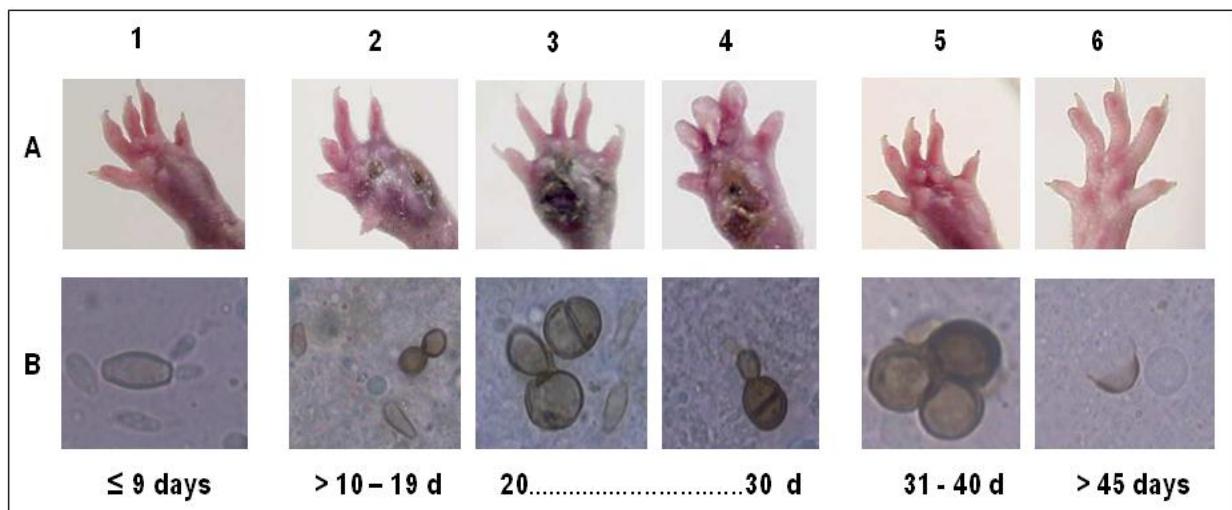


Figura 5 – Correlação da evolução clínica (**A**) e micológica (**B**) dos camundongos infectados com CCC, durante 45 dias. Fases clínicas da infecção - A1: inflamação; A2: ulceração; A3 e A4: fissuração e hiperceratose plantar; A5 e A6: fibrose, cicatrização e cura. Transformação das células fúngicas - B1: conídios e células conidiogênicas; B2: fase de transição das células conidiogênicas para formas mais arredondadas, com espessamento e melanização da parede celular; B3, B4: formação das células escleróticas e eliminação dos conídios; B5: presença somente de células escleróticas, e B6: destruição das células fúngicas; B2, 400x; B1,B3, B4, B5, B6, 1000x.

A principal característica tecidual dos grupos animais inoculados (i.p. ou s.c.) em único sítio com CCC foi a formação de abscessos que continham macrófagos esponjosos periféricos, circundados por fibroblastos (Figura 6, A e B). Intensa migração de neutrófilos para o centro necrótico dos abscessos foi verificada. Corpos escleróticos, aparentemente inalterados, eram encontrados na periferia do abscesso (Figura 6, C), local onde havia grande quantidade de macrófagos esponjosos, enquanto na região central, rica em PMNs, células fúngicas com morfologia alterada eram observadas, estando também, muitas vezes, ausentes (Figura 6, D). Cura clínica e micológica dos animais infectados com CCC ocorria, em geral, depois de 35 dias. Em animais inoculados i.p., células com aspecto de corpos escleróticos, se disseminavam, embora com baixa frequência, principalmente para as vísceras, fígado, baço e pâncreas.

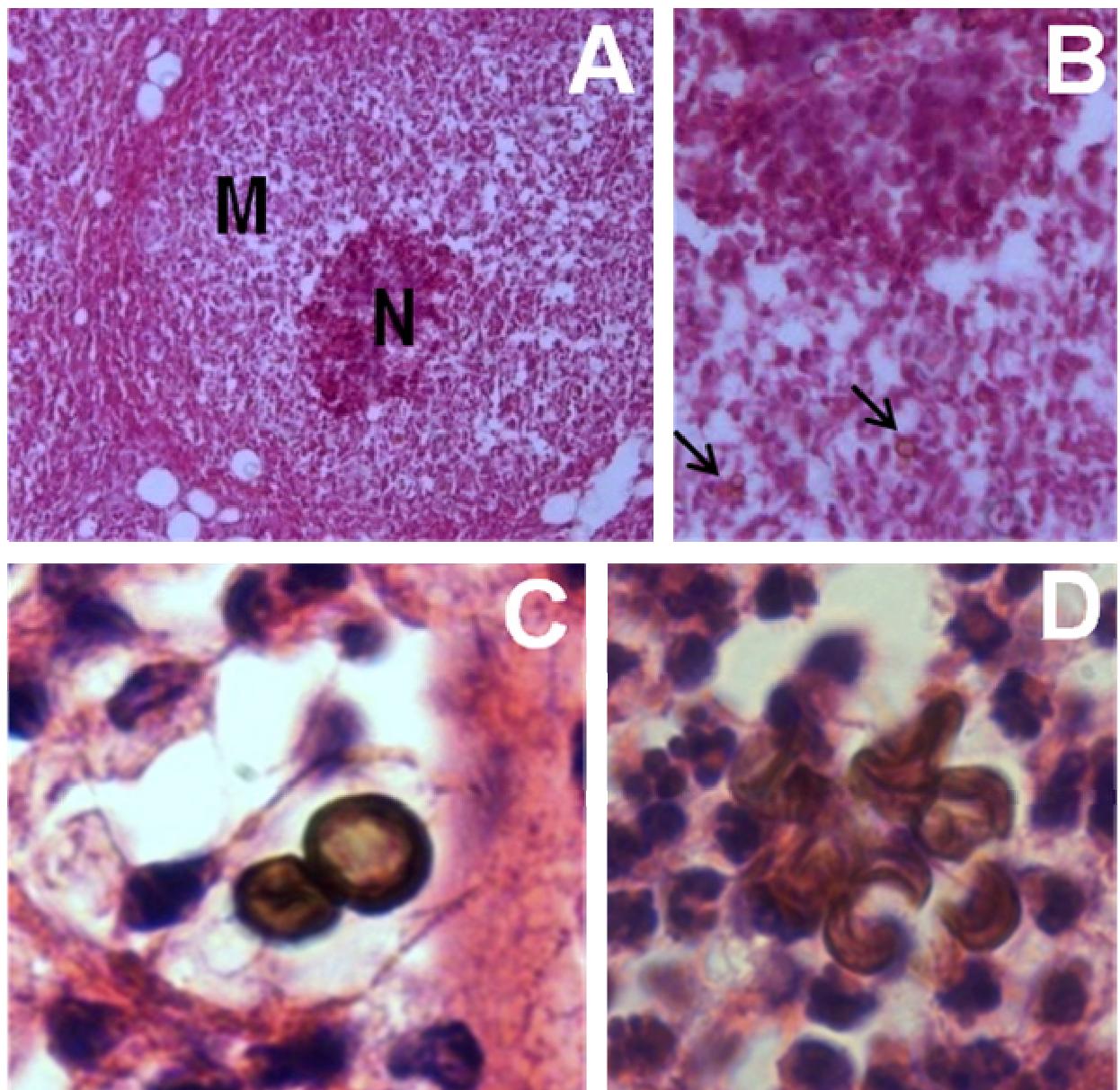


Figura 6 – A – Abscesso formado pela inoculação i.p. de CCC; 30 dias após a infecção. Região periférica rica em macrófagos esponjosos (**M**) e centro neutrofílico (**N**); H&E, 100x. B e C – Corpos escleróticos (*yeast-like*) com morfologia normal observados na dentro de aglomerado de macrófagos esponjosos; B, 200x; C, 1000x. D – Células fúngicas alteradas em região rica em neutrófilos, 1000x.

Trinta e cinco (35) dias pós-infecção, somente se verificava a presença de corpos escleróticos (Figura 7, A) ou células com morfologia leveduriforme (*yeast-like*) (Figura 7, B e C). As formas fúngicas com aspecto leveduriforme apresentavam espessamento da parede celular, exceto da região blástica, onde, geralmente, ocorria lise celular (Figura 7, D).



Figura 7 – A - Corpos escleróticos obtidos 35 dias após infecção com CCC; H&E, 400x; B e C- Célula de *F. pedrosoi* com aspecto leveduriforme e parede celular espessa; B - KOH 20%; C - H&E; 1000x. D – Ruptura celular na região blástica; H&E, 1000x.

### 5.1.3 Infecção com hifas

Animais inoculados i.p. com hifas apresentaram desenvolvimento de reação inflamatória aguda de grande intensidade, tendo enduração palpável e diâmetro superior a 4 mm, 4 dias pós-infecção (Figura 8, A e B). Abscesso neutrofílico encapsulado e marginalizado por macrófagos esponjosos, com raros linfócitos e circundado, principalmente, por fibroblastos, foi observado (Figura 8, C, D e E). Quinze dias pós-infecção, os abscessos apresentavam regiões definidas, ocorrendo pouco contato das hifas com fagócitos (Figura 8, G). A degeneração dos neutrófilos ocorria adjacente ao centro necrótico onde havia presença de hifas (Figura 8, F).

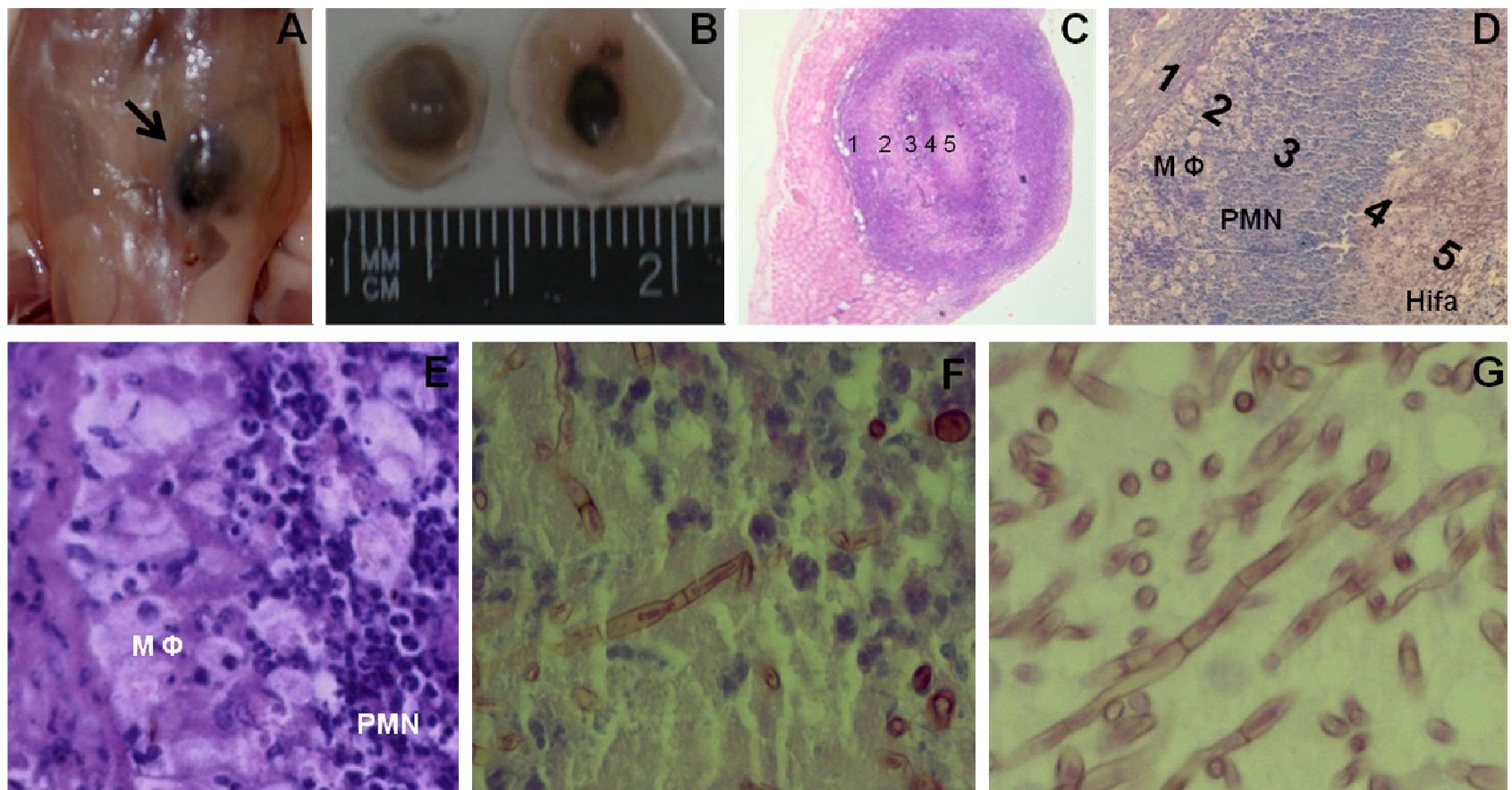


Figura 8 – A e B - Abscessos peritoneais com 4 a 7 mm, formados 4 dias após inoculação com hifas de *F. pedrosoi*. Características histopatológicas do abscesso peritoneal observado em animais, 15 dias pós-infecção (C, D, E, F e G). C – Corte histológico de abscesso neutrofílico, após 15 dias de infecção; H&E, 40x. D – Camadas celulares do abscesso, H&E, 200x; 1 – Tecido conjuntivo composto por neutrófilos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células adiposas; 2 – Zona com macrófagos esponjosos (D e E, 1000x); 3 – Região rica em neutrófilos (PMN); 4 – Zona de degeneração dos neutrófilos (F, 1000x); 5- Região central do abscesso com predomínio de hifas (G, 1000x). MΦ = macrófagos, PMN = leucócitos polimorfonucleares.

Durante os primeiros períodos da pesquisa, secções histopatológicas de tecidos infectados com hifas pareciam conter artefatos ou precipitações de corante. No entanto, depois de várias análises microscópicas, foi vislumbrada a possibilidade de que tais partículas poderiam ser de material nuclear condensado corado com hematoxilina, o qual se agregava após degranulação dos neutrófilos, embora células com cromatina descondensada também fossem observadas (Figura 9).

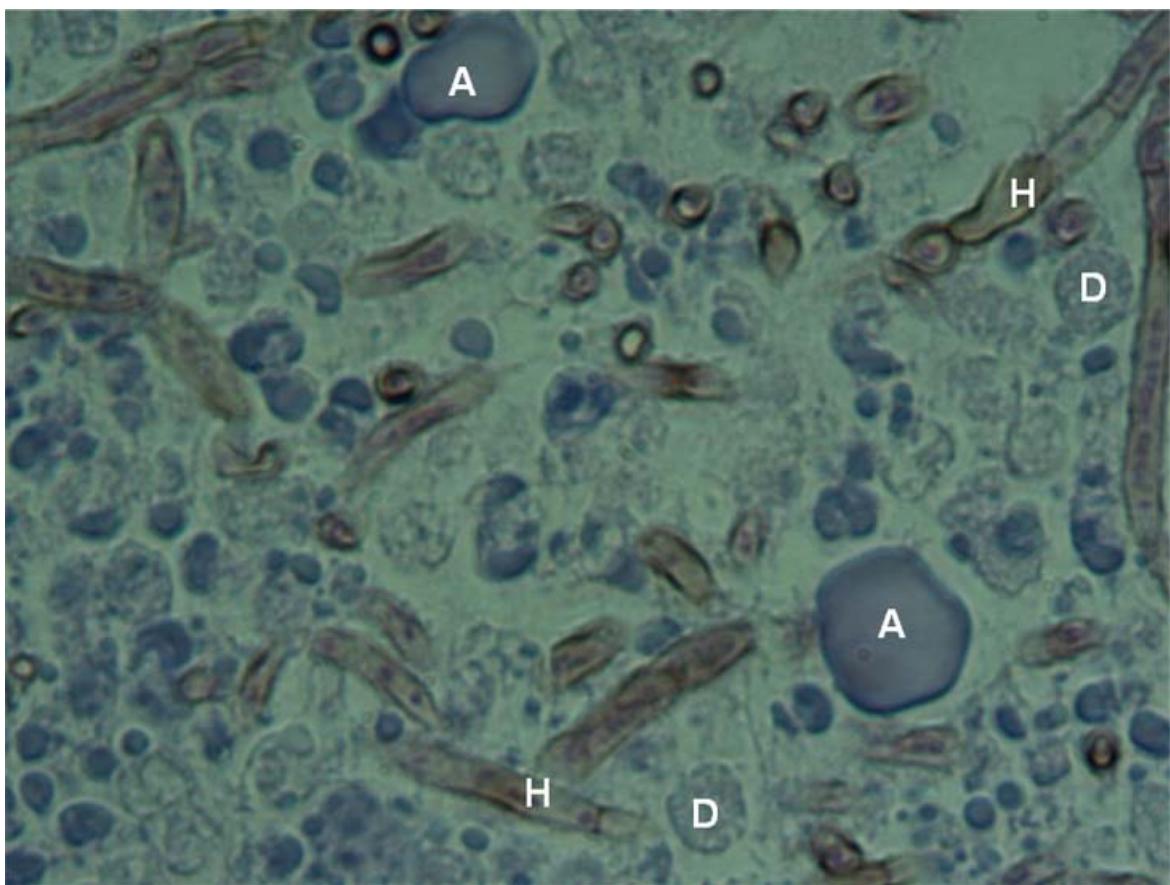


Figura 9 – Zona de degeneração dos neutrófilos; PAS, 1000x. A = agregados de material nuclear condensado de origem neutrofílica, corados com hematoxilina, D = degranulação celular de neutrófilos com cromatina descondensada, H = hifa.

Debris celulares das hifas foram frequentemente verificados no interior de macrófagos. Após 20 a 25 dias pós-infecção, não houve recuperação de culturas fúngicas de amostras teciduais dos camundongos infectados com hifas ou conídios.

A infecção de único sítio estimulou em todos os grupos geração de resposta inflamatória com eficiente eliminação de *F. pedrosoi*. O processo de cura foi mais eficiente nos camundongos inoculados com hifas ou conídios do que naqueles infectados com CCC.

## 5.2 Coestimulação antigênica de dois sítios

### 5.2.1 Inoculação de células fúngicas em mais de um sítio

Maior intumescimento da pata e persistência do quadro infeccioso foram observados em animais infectados com células fúngicas viáveis (CCC) em dois sítios (abdômen i.p. e pata s.c.) do que naqueles infectados em único sítio. Posteriormente, foi analisada a possibilidade dessa resposta ocorrer mediante inoculação de células viáveis no coxim plantar (s.c.) e mortas (antígeno) no abdômen (i.p.). As manifestações clínicas e anatomo-patológicas deste último grupo foram similares àquelas verificadas no experimento de infecção em dois sítios com células viáveis, demonstrando que a presença de antígenos em diferentes locais produz resposta inflamatória no hospedeiro distinta daquela gerada após estímulo de único sítio (Figura 10).

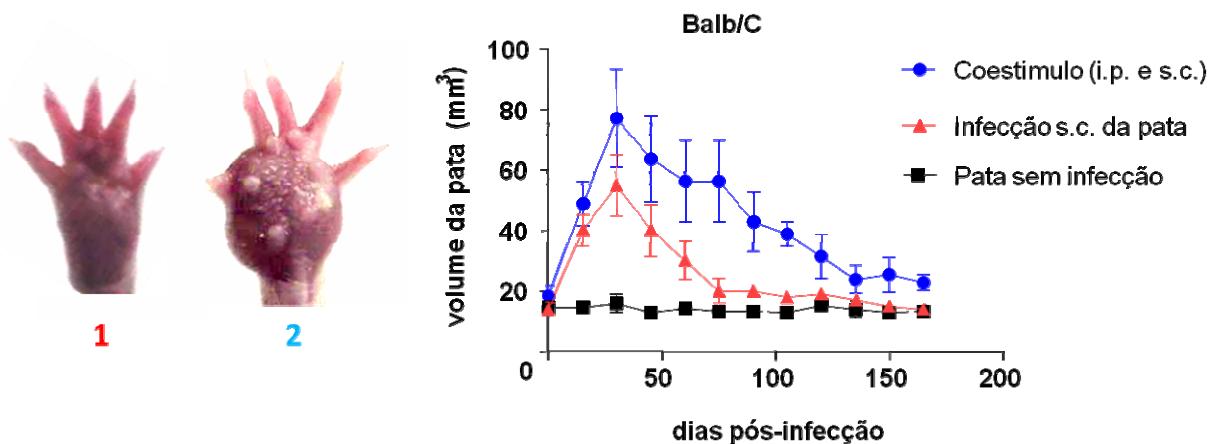


Figura 10 – Coestímulo antigênico em dois sítios causa maior intumescimento da pata e infecção prolongada. Imunização i.p. e infecção s.c. da pata de camundongos BALB/c, respectivamente, com antígeno de *F. pedrosoi* e CCC. Intumescimento da pata de animal estimulado em um sítio (1) e coestimulado em dois sítios (2), 30 dias pós-infecção. Gráfico mostrando infecção prolongada em animais coestimulados, quando comparada ao grupo inoculado em único sítio. Os valores representam média e SE, teste *t* Student's, P< 0.05.

Após coestimulação, as linhagens Swiss e C57BL6 (Figura 11) desenvolviam infecção prolongada, com cinética similar ao grupo de camundongos BALB/c.

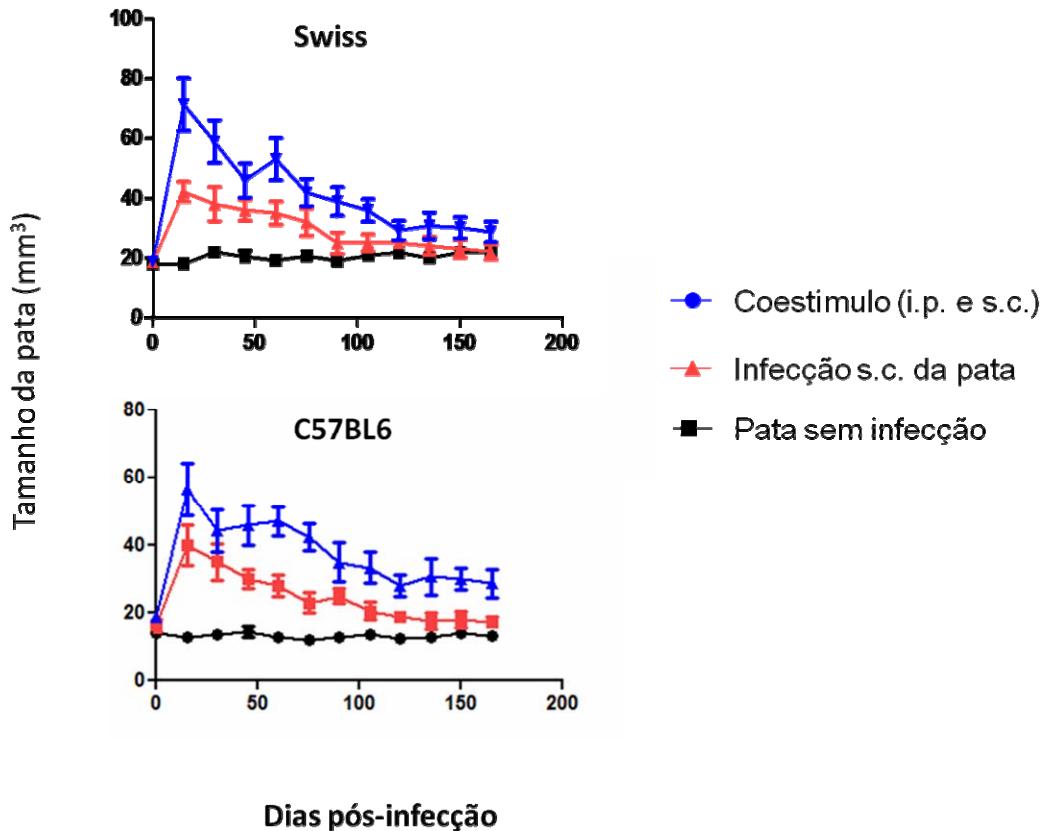


Figura 11 – Aumento da susceptibilidade de camundongos machos Swiss e C57BL6 à infecção por *F. pedrosoi* após coestímulação antigênica, comparado aos animais inoculados em único sítio. Os dados são apresentados por médias e SE, teste ANOVA e *t* Students,  $P < 0.05$ .

O perfil anatomo-patológico foi similar em todos os grupos de animais que receberam coestímulo antigênico simultâneo em dois sítios. Lesões focais múltiplas (Figura 12), ricas em histiócitos (*granuloma-like*), foram observadas, particularmente, na pata, enquanto no peritônio foi verificada a presença de abscesso com infiltrado neutrófilico. A migração de neutrófilos para as lesões multifocais da pata acentuou-se no estágio de regressão da doença. Esse fenômeno tinha correlação com o desaparecimento do abscesso no peritônio.

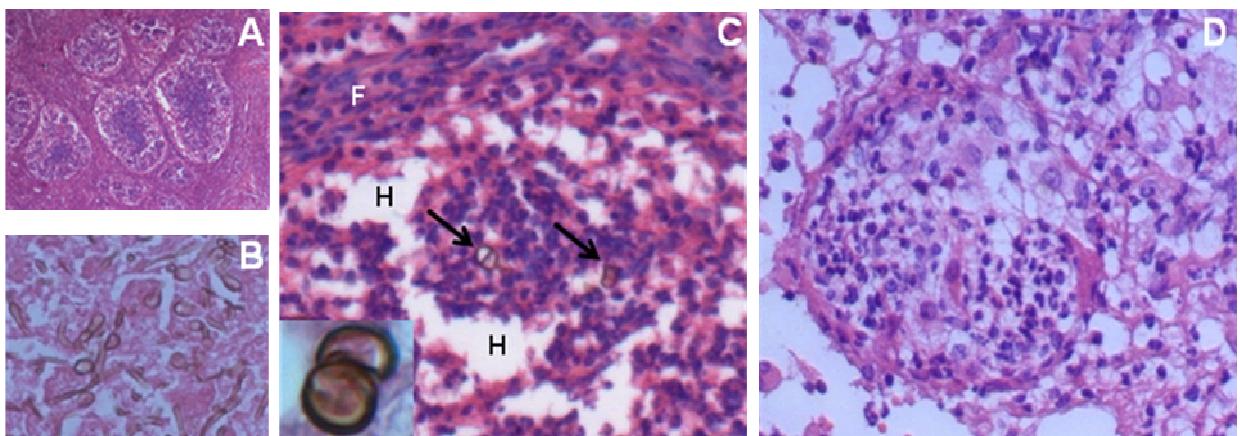


Figura 12- Característica histopatológica de tecido subcutâneo de patas provenientes de camundongos coestimulados; H&E. A - Lesões focais (*granuloma-like*), 30 dias pós-infecção; 40x. B - Diferentes formas fúngicas observadas nas regiões centrais das lesões multifocais; 400x. C – Lesões ricas em histiócitos<sup>(H)</sup>, circundadas por fibroblastos<sup>(F)</sup>, com poucas células escleróticas, 60 dias pós-infecção (200x; 1000x). D – Elevado número de neutrófilos em lesão focal sem presença de células fúngicas, 90 dias pós-infecção.

Disseminação de células escleróticas para outros órgãos, como saco escrotal, cauda, vísceras, fígado, baço e pâncreas, foi observada de 20 a 40 dias em vários animais coestimulados, sendo esse evento raro quando a inoculação fúngica era unifocal (Figura 13).

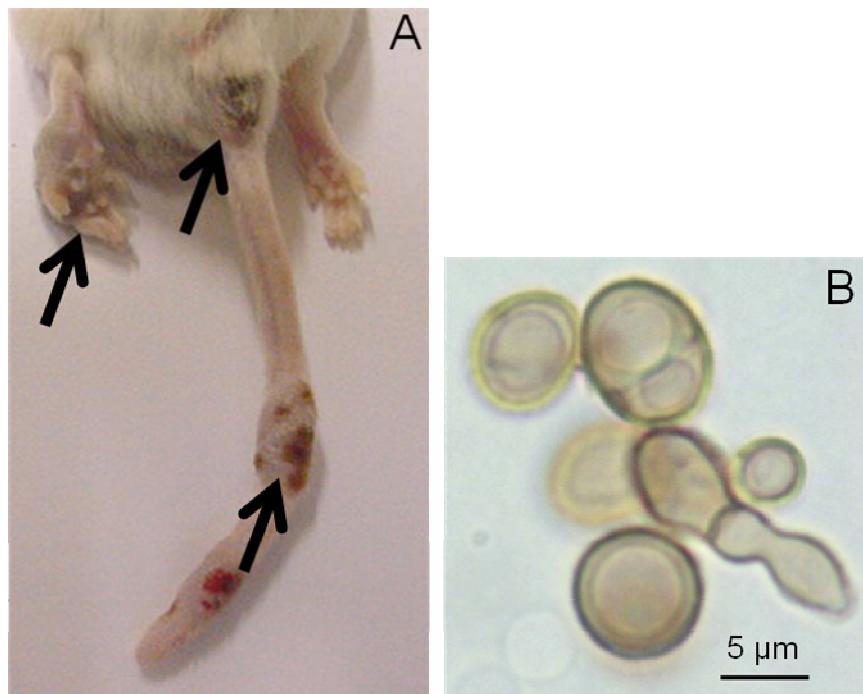


Figura 13 – A- Metástase da infecção por *F. pedrosoi* em camundongo BALB/c coestimulado, 30 dias pós-imunização i.p. e infecção da pata s.c. B – Morfologia das células escleróticas encontradas em sítios distantes do foco inicial de infecção; exame direto, 1000x.

### 5.2.2 Estímulo antigênico das mucosas e infecção plantar

A intenção desse estudo foi verificar se o estímulo antigênico de sítios, naturalmente envolvidos com tolerância periférica a antígenos não-próprios, e subsequente infecção plantar, poderiam induzir resposta imunossupressora.

Camundongos BALB/c imunizados v.t. e, simultaneamente infectados s.c. no coxim plantar, tiveram resposta inflamatória inicial da pata, similar ao grupo inoculado em único sítio, enquanto que os animais imunizados v.o. mostraram entumeceimento pouco intenso no início e progressão tardia das lesões (Figura 14). Infecção prolongada foi verificada em ambos os grupos de animais coestimulados (mucosa e pata). Análises histopatológicas revelaram semelhança no perfil de reação tecidual das patas em animais coestimulados v.o. e i.t. Desmonstraram também similaridade anatomopatológica das lesões teciduais com aquelas verificadas em outros grupos de animais coestimulados (imun. i.p. e infec. s.c.). A regressão das lesões teve início após 3 meses de infecção, sendo associada à intensificação da migração de neutrófilos para pata.

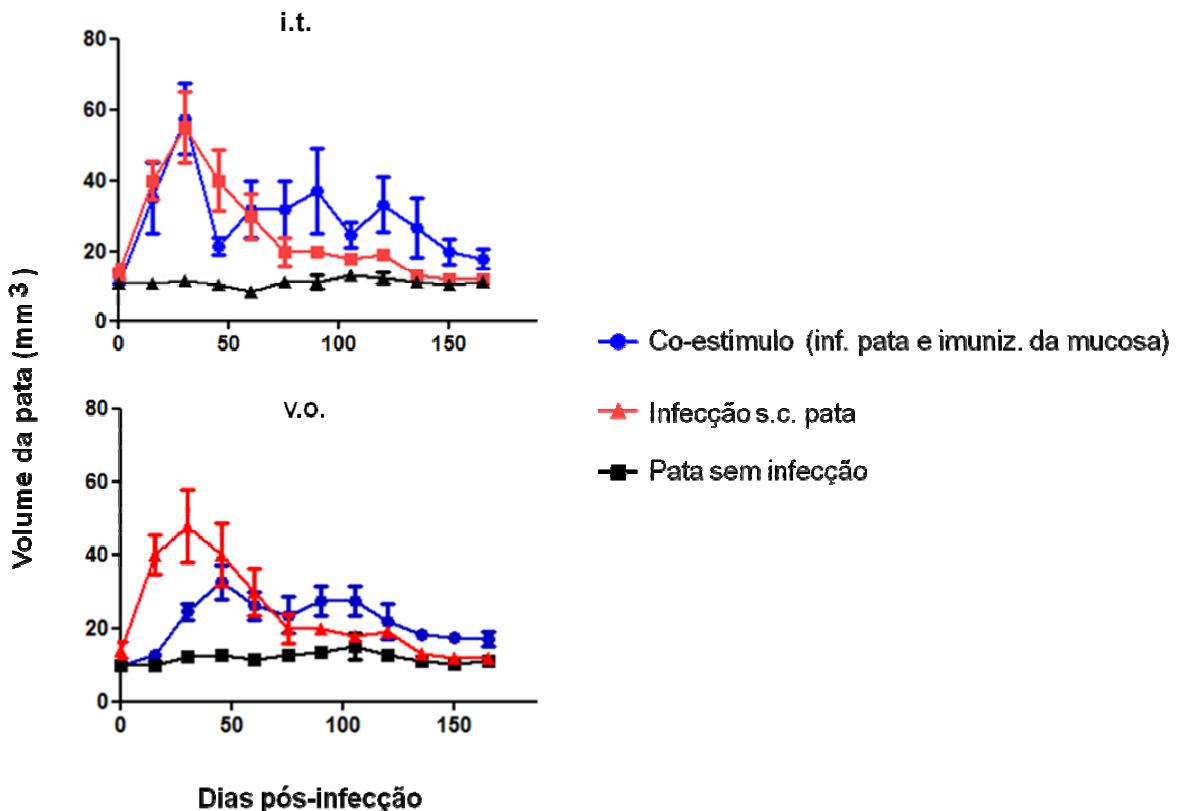


Figura 14 – Cinética da infecção por *F. pedrosoi* em patas de grupos de camundongos BALB/c, imunizados com células mortas através da via intratraqueal (i.t.) ou oral (v.o.). Três doses, com aproximadamente 50 µL de solução, contendo formas fúngicas mortas, na concentração final de  $1 \times 10^6$  células, foram administradas v.o., semanalmente. Dose antigenica única de 50 µL foi injetada na mucosa pulmonar após traqueostomia. Ambos os grupos foram infectados no coxim plantar com  $1 \times 10^6$  CCC viáveis. Os dados representam valores das médias e SE, sendo P > 0.05 de acordo com teste t Student's, ao analisar somente os grupos com estímulo de um e dois sítios.

### 5.2.3 Coestímulo em camundongos KO para CD4, CD8, IL-10, MHC-II e TNF

Com intuito de verificar aspectos elementares da imunidade murina, relacionados com os mecanismos de imunossupressão induzidos pela coestimulação, foram utilizados animais *knockouts* em receptores celulares e citocinas. Em geral, os animais *knockouts* infectados em único sítio demonstraram ser mais susceptíveis à infecção fúngica por *F. pedrosoi* do que os selvagens. Nos cortes histológicos dos animais inoculados em único sítio foi observado abscesso neutrofílico, enquanto nos coestimulados (imunização i.p e infecção s.c. da pata) foram visualizadas lesões focais ricas em histiocitos. Durante o curso da infecção dos camundongos KO CD4 e CD8 coestimulados, foi verificada diferença entre esses dois grupos. Animais KO CD4 tiveram intumescimento das patas significativo, no período inicial da infecção, e tendência à regressão do processo inflamatório depois de 60 dias (Figura 15, gráfico CD4 KO). Nos animais KO CD8, as lesões apresentaram intumescimento progressivo, formando extensas lesões, sem sinais de evolução para cura (Figura 15, gráfico CD8 KO).

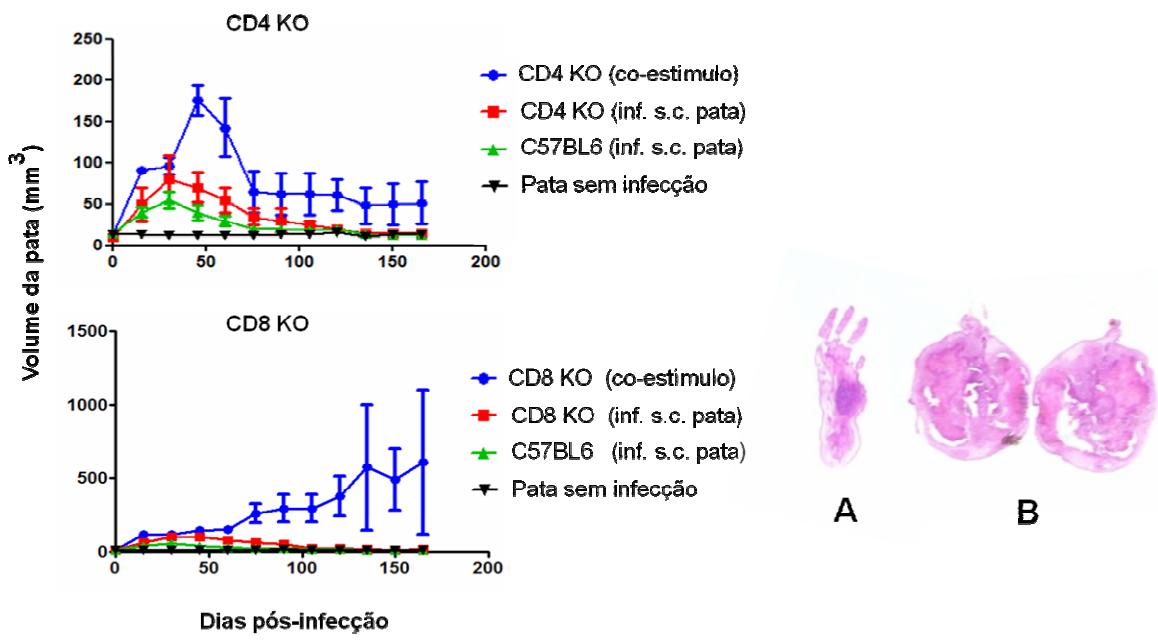


Figura 15 – Cinética da infecção por *F. pedrosoi* em camundongos KO CD4 e CD8. Animais CD4 KO coestimulados demonstraram intumescimento crescente e acentuado da pata nos primeiros dois meses de infecção, com estabilização após 60 dias e cura depois de 165 dias. Intumescimento progressivo das patas dos camundongos CD8 KO coestimulados sem tendência à cura (notar divergência progressiva do valor de volume médio das patas entre grupos CD4 KO e CD8 KO). À direita, fotografias de secções histopatológicas das patas de camundongos C57BL6 CD8 KO, infectadas em um único sítio (A) e coestimulados (B). Os dados de ambos os grupos CD4 KO e CD8 KO são representados por médias e SE, teste ANOVA,  $P < 0.05$ .

Em nossa investigação, os animais KO para MHC-II desenvolveram infecção prolongada, indicando uma possível via MHC-II-independente (Figura 16, gráfico MHC-II). Infecção prolongada foi verificada em animais TNF- $\alpha$  KO coestimulados em dois sítios (Figura 16, gráfico TNF KO).

Animais IL-10 KO coestimulados não produziram infecção prolongada (Figura 16, gráfico IL-10 KO). As características teciduais foram semelhantes àquelas verificadas em outros grupos de animais coestimulados, inclusive *knockouts*.

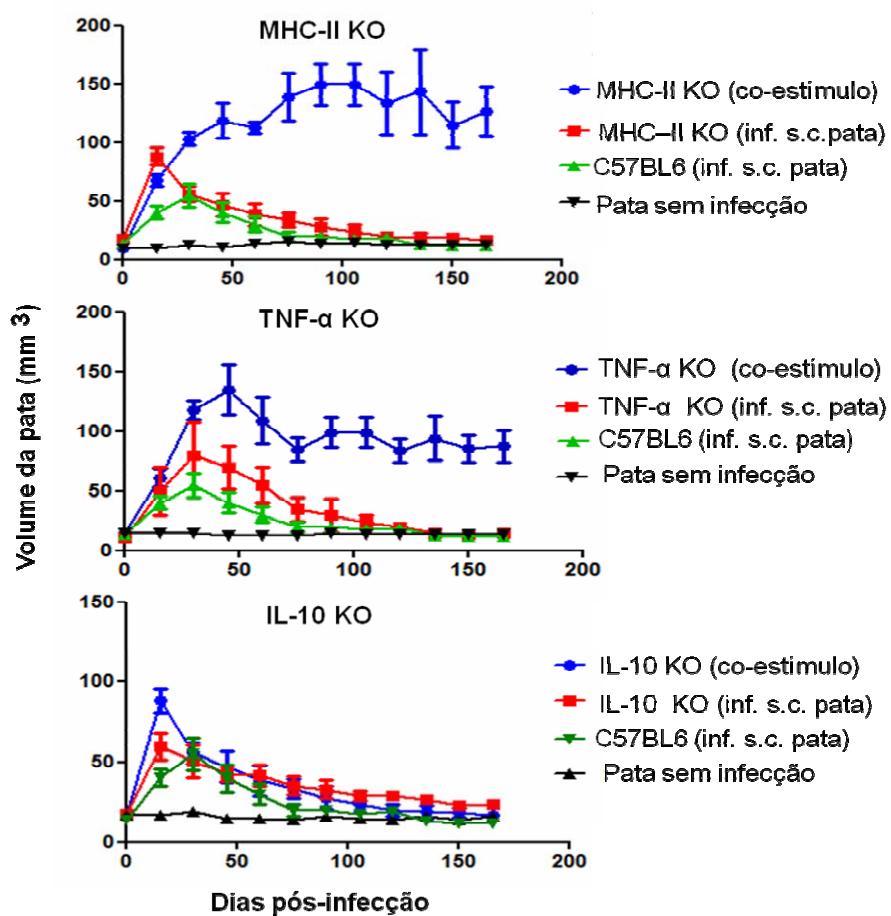


Figura 16 – Cinética das lesões em patas de animais KO MHC-II, TNF- $\alpha$  e IL-10. Todos os animais infectados apresentaram inflamação progressiva durante o primeiro mês de infecção. Infecção prolongada foi desenvolvida somente pelos grupos KO MHC-II e TNF- $\alpha$  coestimulados, com exceção dos animais IL-10 KO. Valores representam médias e SE. O teste de Friedman foi empregado para dados dos grupos MHC-II e TNF- $\alpha$  KO ( $P < 0.05$ ) e ANOVA one-way para o grupo IL-10 ( $P > 0.05$ ).

A cura clínica e micológica dos grupos KO coestimulados ocorria tardiamente, em relação àqueles infectados em único sítio, em geral, após 165 dias (dados não demonstrados nos gráficos), com exceção do grupo CD8 KO (progressão contínua das lesões) e IL-10 KO (cura precoce).

#### 5.2.4 Coestímulo antigênico de camundongos Xid e irradiados

Infecção de único sítio em animais deficientes em linfócito B1 regredia de modo similar ao grupo de camundongos BALB/c irradiados e não-irradiados.

Camundongos Xid coestimulados apresentaram infecção estável e crônica (Figura 17, gráfico BALB/c Xid).

Animais irradiados que receberam duplo estímulo antigênico, embora tenham produzido infecção prolongada, eliminaram o fungo tardiamente (Figura 17, gráfico BALB/c irradiados).

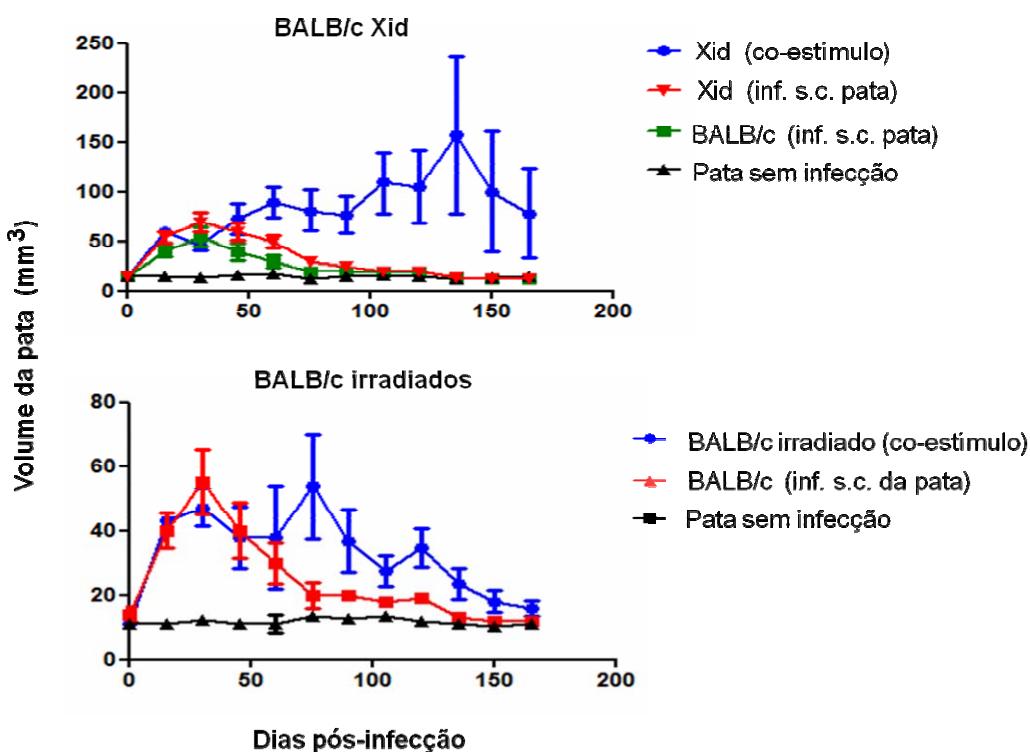


Figura 17 - Infecção crônica, em camundongos deficientes em linfócitos B1, causada pela coestimulação imune de dois sítios. Animais irradiados desenvolviam infecção prolongada após duplo estímulo, com evolução para cura após 90 dias. Dados são representados pelas médias e SE. O teste ANOVA foi usado para valores do grupo Xid ( $P < 0.05$ ) e teste  $t$  Student's, para dados dos camundongos BALB/c irradiados e infecção em único sítio ( $P < 0.05$ ).

Nos camundongos Xid coestimulados s.c. e i.p., as lesões focais eram inicialmente desorganizadas e extensas, tendo grande número de células fúngicas com morfologia diversificada, em especial, células conidiogênicas e conídios germinados (Figura 18, A e B).

Em períodos mais tardios, após 8 meses de infecção, as lesões eram menores e bem circundadas, sem presença de hifas finas, contendo somente células escleróticas em pequena quantidade (Figura 18, C e D).

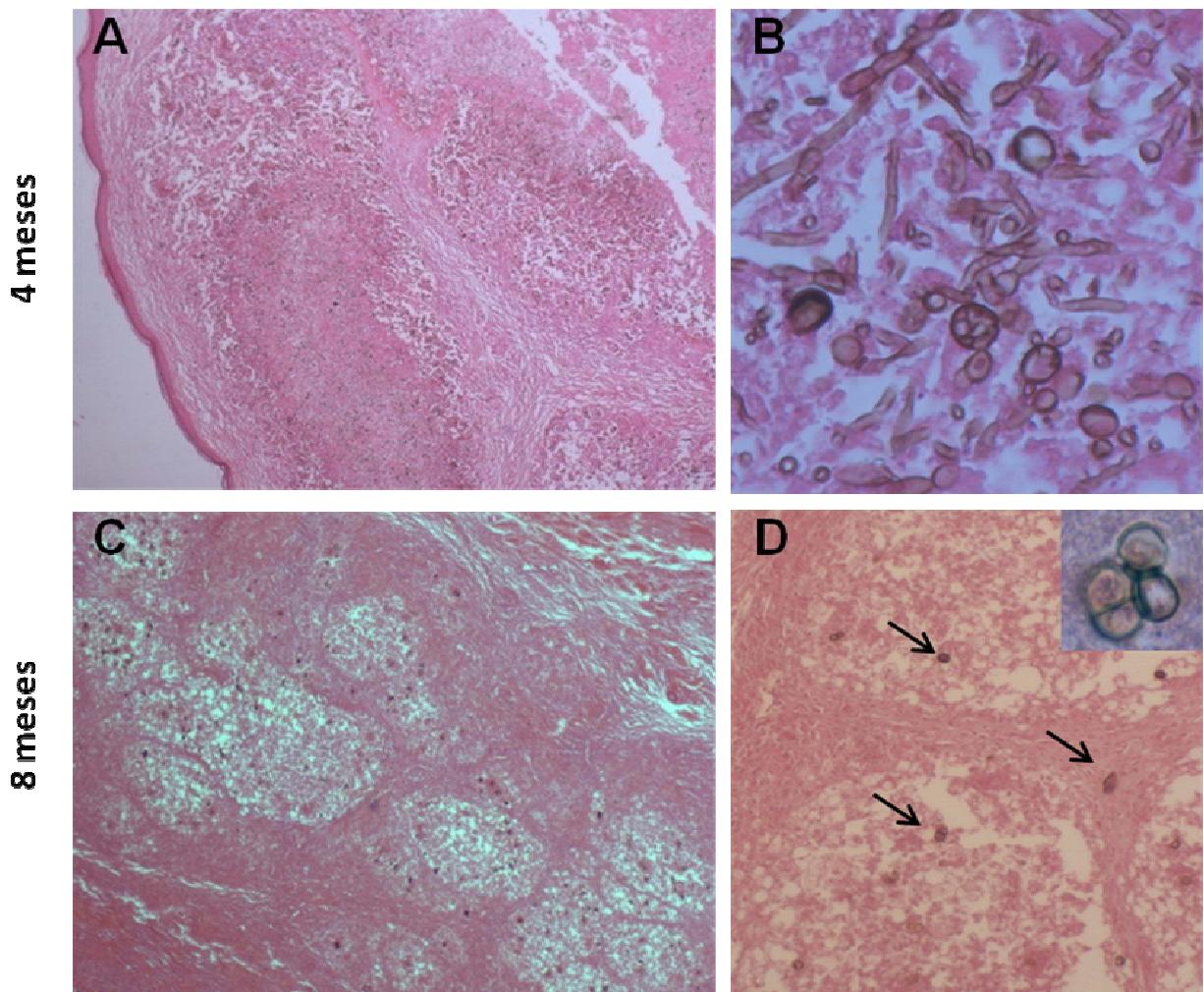


Figura 18 – Características histopatológicas das lesões focais em camundongos Xid coestimulados após 4 e 8 meses de infecção s.c. da pata por *F. pedrosoi*; H&E. Lesões multifocais grandes e irregulares (A, 100x), com elevado número de hifas finas e curtas, conídios e células conidiogênicas (B, 400x), 4 meses pós-infecção. Lesões focais pequenas e organizadas (C, 100x), com poucos corpos escleróticos (D, 200x e 1000x), observadas após 8 meses.

## 5.3 Ensaio de interação microbiana

### 5.3.1 Identificação por métodos clássicos e moleculares do isolado bacteriano

A bactéria estudada demonstrou ser bacilo Gram-positivo (Figura 19, A), com presença de endósporos centrais e subterminais, cápsula e crescimento mesofílico sob diferentes temperaturas, variando de 10 a 40°C. Apresentou boa proliferação em meios ácidos, como SDA (Figura 19, B). Os testes clássicos foram positivos para vermelho de metila, Voges Proskauer (VP), motilidade, produção de catalase, oxidase, caseinase, utilização de nitrato, manitol, glicose, ornitina, e negativos para citrato, amilase, urease, indol, esculina, lecitinase, lipase, hemolisinas (Figura 19, C) e gás. Um fragmento de, aproximadamente, 1500 pb do gene 16S rRNA foi amplificado em reação da polimerase em cadeia (PCR), através dos primers 8bf e 1512r. Produtos de PCR, obtidos pela amplificação do gene 16S RNAr, foram sequenciados. As sequências parciais, constituídas de 400 a 700 bases, foram utilizadas para identificação molecular inicial. Houve identidade de 100% para o gênero *Bacillus*, em todos os bancos de dados pesquisados. Todavia, espécies de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* tiveram identidade similar acima de 99%. Por isso, os genes rpoB e gyrA foram amplificados e sequenciados com finalidade de confirmar a espécie *B. subtilis*. Através do primer 518f, a região central do gene 16S RNAr foi amplificada, possibilitando o alinhamento completo das regiões amplificadas por meio dos primers 8bf e 1512r e a construção de sequência única com mais de 1400 bases. As sequências produzidas pela amplificação dos genes estudados foram depositadas no GenBank e estão disponíveis sob os números FJ025759 (rpoB), FJ025758 (gyrA), FJ025757 (16S RNAr).



Figura 19 – A – Bacilos Gram-positivos, 1000x. B - Cultivo de isolado bacteriano em SDA. C – Ausência de produção de hemolisinas.

### 5.3.2 Antagonismo *in vitro*

Em relação aos cocultivos realizados durante a investigação, os testes de interação microbiana revelaram atividade de antibiose entre o bacilo Gram-positivo e fungos testados, tais como *Penicillium* sp, *Aspergillus flavus*, *A. niger* (de origem ambiental), *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f.sp *vasinfectum* e *Colletotrichum* sp, sendo mais evidente em SDA do que em meios com pH neutro, como ágar nutritivo e tríptico de soja (Figura 20, A). Linha de precipitação próxima à colônia do bacilo foi visualizada em vários cultivos (Figura 20, B). Fluorescência verde também foi observada após exposição das colônias à luz ultravioleta (UV), em particular relacionada com a zona de inibição (Figura 20, C).

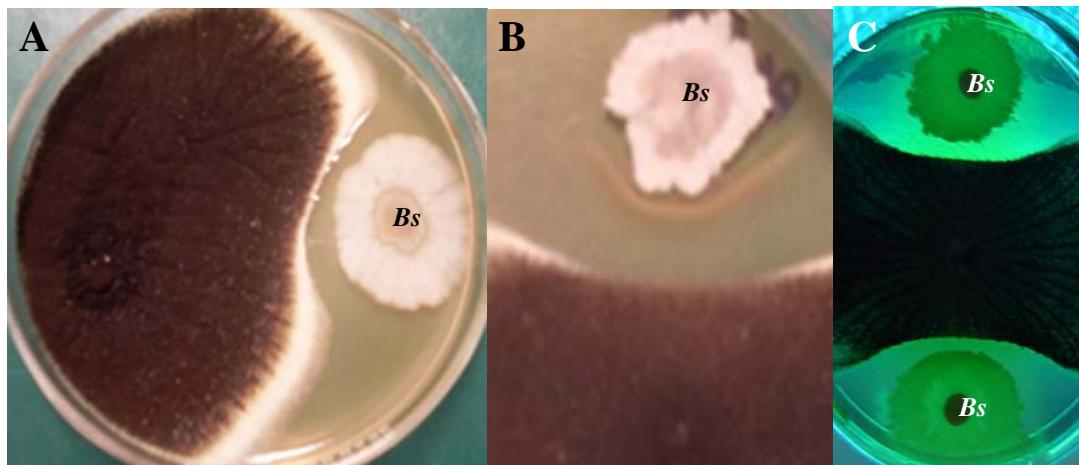


Figura 20 – Cocultivo entre cepas ambientais de *A. niger* e *Bacillus subtilis* (*Bs*). A - Inibição do micélio fúngico em SDA. B - Linha de precipitação formada próxima à colônia bacteriana. C - Antibiose à *A. niger*, relacionada com produção de substância fluorescente pelo bacilo.

Em meio de DNase, contendo azul de toluidina, as zonas de inibição mostraram-se coradas em amarelo ou rosa-claro (Figura 21), o que não foi verificado em SDA mais corante citado.

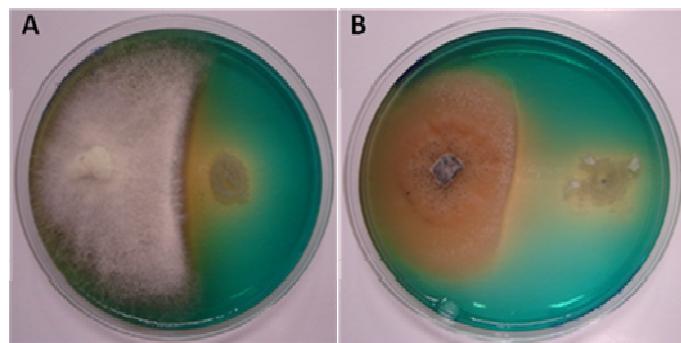


Figura 21 – Inibição do crescimento de fitopatógenos em meio de DNase e zona amarelada ligada à atividade antifúngica por *Bacillus subtilis* após uma semana de cocultivo.

A - *Fusarium oxysporum*. B - *Colletotrichum* sp.

Difusão de pigmento avermelhado ou vermelho-acastanhado, provavelmente feomelaninas, foi verificada em SDA, ao redor de colônias de *Asp. niger* (Figura 22, A) ou *A. alternata* (Figura 22, B), após uma semana de cocultivo com *B. subtilis*.



Figura 22 – Pigmento de cor vermelho-acastanhada, secretado por *A. niger* (A) e vermelho por *A. alternata* (B).

### 5.3.3 – Cocultivo entre *B. subtilis* e *F. pedrosoi*

#### 5.3.3.1 Secreção de pigmento escuro em meio de cultura.

Devido aos resultados anteriores indicarem possibilidade de indução da secreção de melanina por fungos melanogênicos, após cocultivo com *B. subtilis*, a interação *in vitro* dessa bactéria com *F. pedrosoi* foi analisada.

Células de *F. pedrosoi* cocultivadas em caldo com *B. subtilis* foram observadas, diariamente, durante uma semana, sendo verificada a acentuação da secreção de pigmento escuro em SDA (Figura 23, A) e SDB (Figura 23, B), após uma semana de interação. As células fúngicas permaneciam viáveis em cocultivo em caldo com *B. subtilis*, mesmo depois de 15 dias de cultivo.

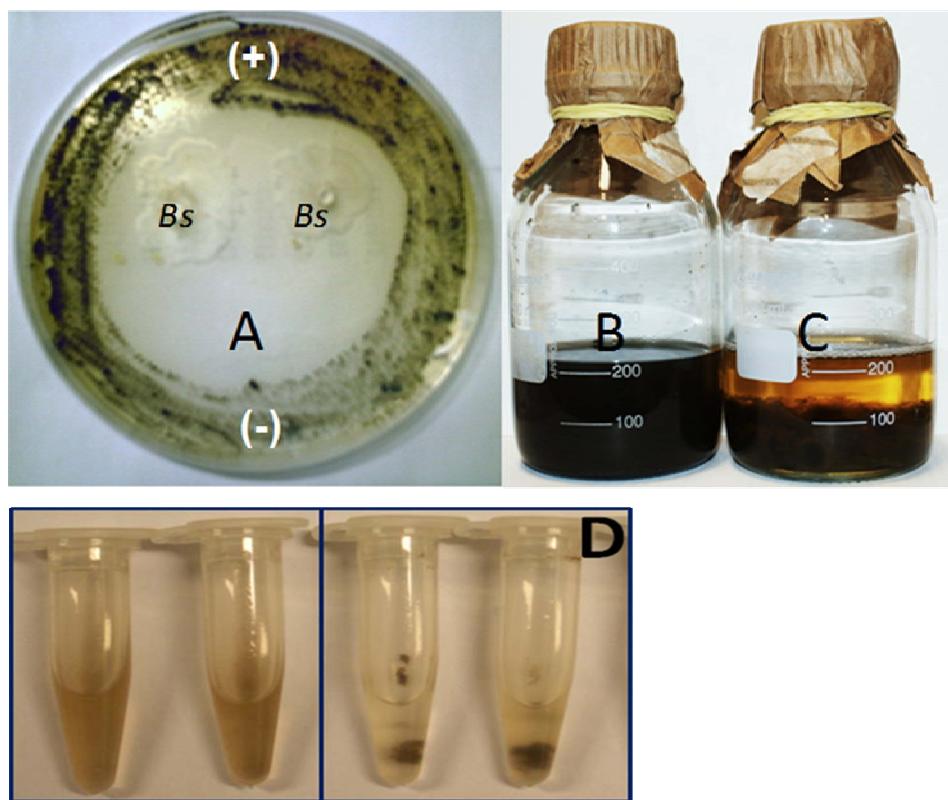


Figura 23- Secreção de pigmento após uma semana de cocultivo entre *F. pedrosoi* e *B. subtilis* (*Bs*). A – Placa contendo meio SDA, reação positiva (+) nas proximidades das colônias bacterianas. B – Frasco com cocultivo contendo meio SDB sem antibiótico. C- Cultura pura de *F. pedrosoi* cultivada por 15 dias, em meio SDB, com antibiótico. *Bs*, colônia de *B. subtilis*. D- Melanina precipitada do sobrenadante.

#### 5.3.3.2 Modificações da morfologia fúngica.

Em SDB, hifas de *F. pedrosoi* apresentavam aspecto filamentoso (Figura 24, A) e baixa produção de conídios. Após 48 horas de cocultivo com *B. subtilis*, foram observadas hifas arredondadas (Figura 24, B). Muitas hifas intercalares passaram a

apresentar conidiação lateral que, posteriormente, se destacavam ou originavam conidióforos (Figura 24, C).



Figura 24 - A – Hifas de *F. pedrosoi*, cultivadas por 15 dias em SDB com antibiótico, 200x. B - Arredondamento das hifas após 48 horas de interação com *B. subtilis*, 200x. C – Indução da produção lateral de conídios (Co) e conidióforos (Cd) em cocultivos, 1000x.

Após 72 horas, foi verificada a presença de clamidoconídios globosos, com 5 a 10 µm de diâmetro e parede celular espessa, particularmente, em terminações conidiogênicas (Figura 25).

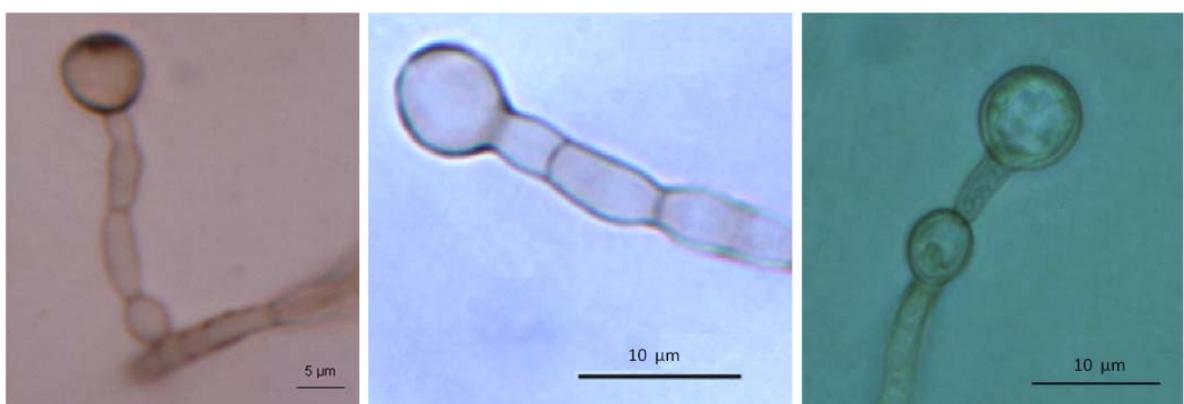


Figura 25 - Clamidoconídios terminais de *F. pedrosoi*, formados após 72 horas de cocultivo com *B. subtilis*, 1000x.

### 5.3.4 Infecção por células de *F. pedrosoi* cocultivadas com *B. subtilis*

Após o terceiro dia de infecção, foi verificada fagocitose de bacilos Gram-positivos, por macrófagos, em secções histológicas (Figura 26).

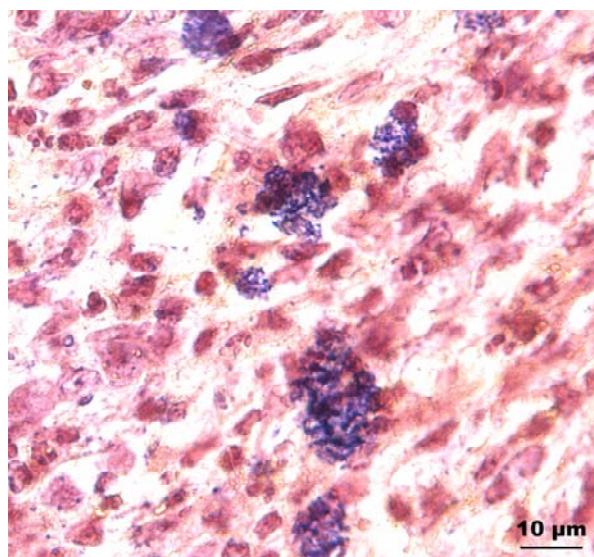


Figura 26 - Fagocitose de *B. subtilis* após três dias de infecção; B&B, 1000x.

Depois de 7 dias, somente células de *F. pedrosoi* foram observadas e recuperadas do tecido infectado. Em relação aos animais infectados, foi verificada intensa migração de neutrófilos para o sítio de infecção, semelhante ao grupo de animais inoculados com hifas. No entanto, a cura clínica e micológica do processo infeccioso ocorreu, em média, depois de 25 a 35 dias (de 5 a 10 mais tarde que nos animais infectados com hifas). Células fúngicas, similares a corpos escleróticos, em especial, originárias de clamidoconídios, eram observadas na periferia dos abscessos em cortes histopatológicos, onde se localizavam os macrófagos esponjosos (Figura 27). Em tecido, depois de 25 dias de infecção, somente tais formas fúngicas foram detectadas, demonstrando serem mais resistentes *in vivo* à ação microbicida dos fagócitos do que as hifas.

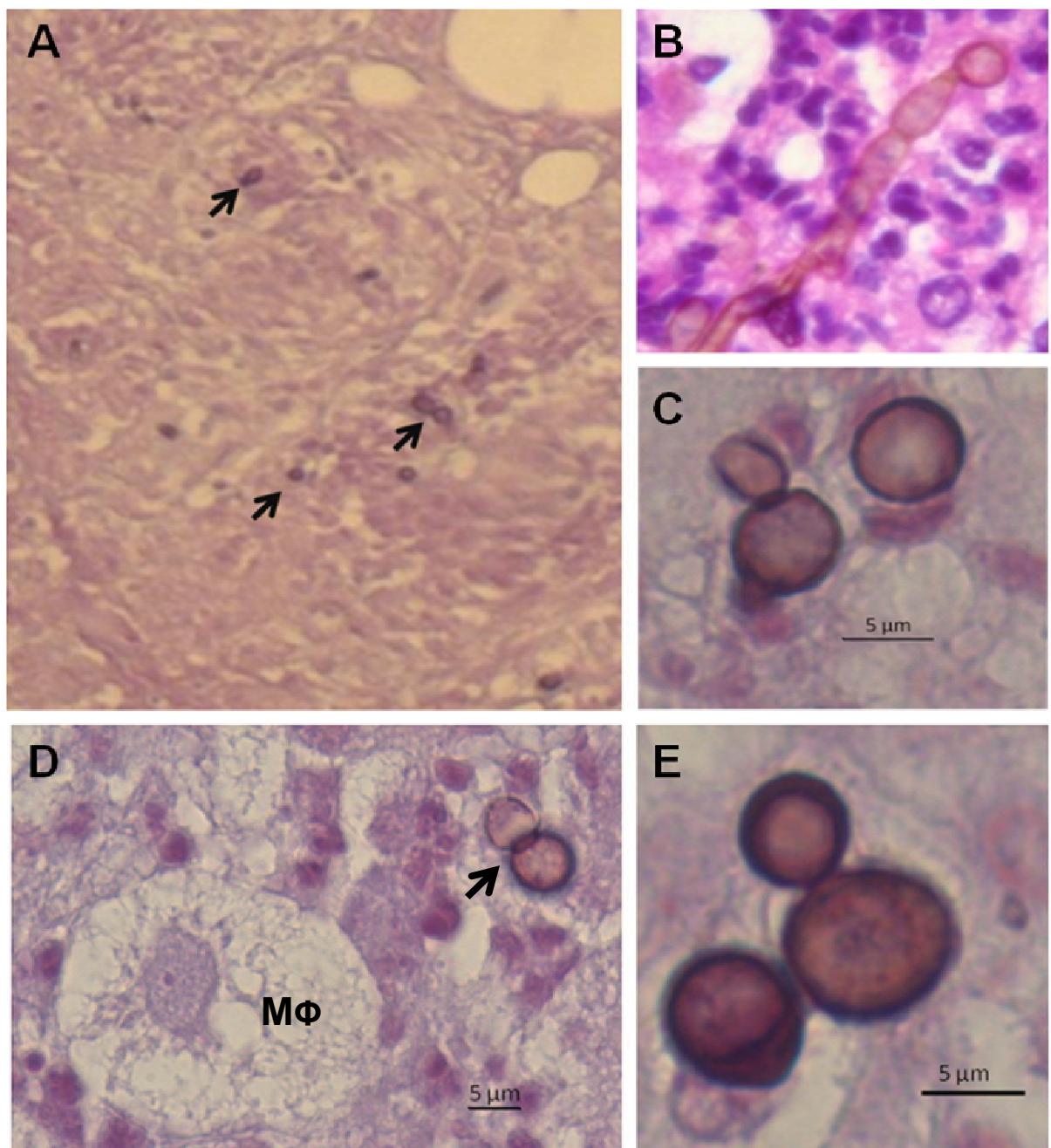


Figura 27 - A - Células fúngicas arredondadas, observadas 25 dias após infecção com cocultivo de *F. pedrosoi* e *B. subtilis*; B&B, 100x. B – Hifa com clamidoconídio terminal, presente em tecido depois de 15 dias; H&E, 400x. C – Células arredondadas similares a corpos escleróticos com fragmento de hifa, 20 dias pós-infecção; B&B, 1000x. D – Corpo esclerótico observado na região de macrófagos (MΦ) esponjosos; B&B, 400x. E – Corpos escleróticos em proliferação; B&B, 1000x.

## 5.4 Células fúngicas cultivadas por longos períodos

### 5.4.1 Microscopia óptica e MET

Em cultivos de 6 meses de *F. pedrosoi*, células esféricas, ovóides, clamidoconídios intercalares e terminais foram observados, com diâmetro entre 5 a 20 µm, algumas vezes, com septações internas e núcleos grandes (Figura 28). Tais formas fúngicas eram mais pigmentadas do que outras células (Figura 29). Através de microscopia eletrônica, foi demonstrado que a parede celular de tais formas fúngicas continham, no mínimo, três camadas (Figura 30), enquanto por microscopia óptica, apenas uma dupla-parede era visualizada. A camada mais externa continha depósito de moléculas eletrodensas, provavelmente, melanina (Figura 30, D). Em amostras de tais cultivos não foi detectada contaminação bacteriana.

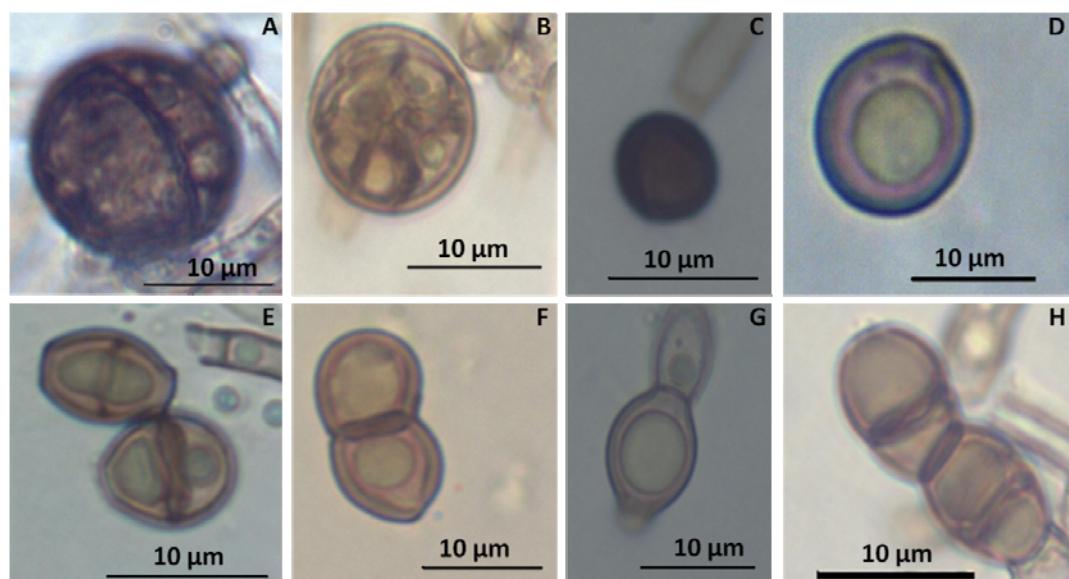


Figura 28 – Células fúngicas de *F. pedrosoi* cultivadas por 6 meses com diâmetro de 5 a 20 µm, bem melanizadas, dupla-parede e núcleos grandes (verde claro); 1000x. Clamidoconídios multinucleados (A, B) e uninucleados (C, D). Formas fúngicas arredondadas (E-H).



Figura 29 – Células fúngicas mais melanizadas do que as demais presentes em cultivos de *F. pedrosoi* mantidos por 6 meses; 400x.

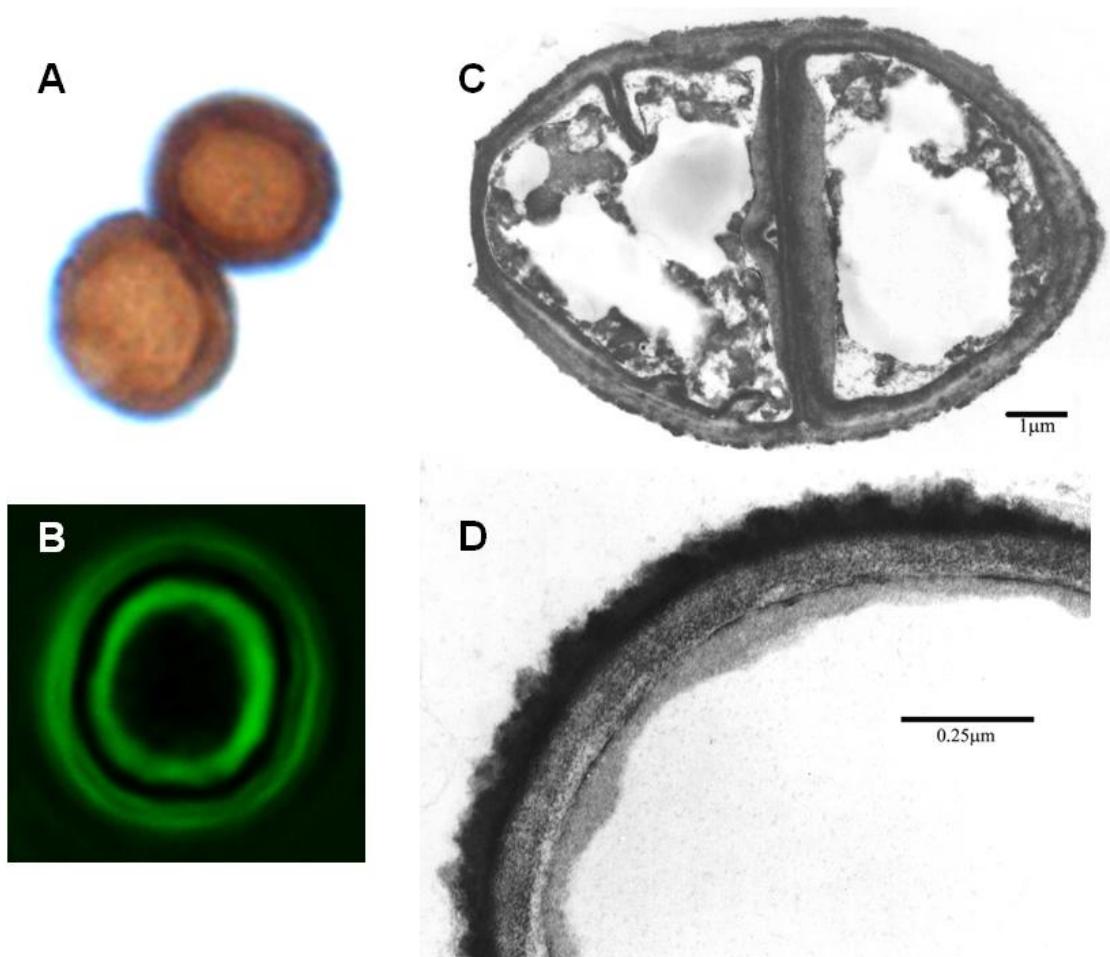


Figura 30 – A – Imagem de clamidoconídio, obtida por microscopia óptica, 1000x. B – Autofluorescência de clamidoconídio, indicando uma parede celular composta por mais de uma camada, 1000x. C – Ultraestrutura de célula fúngica arredondada com parede celular, formada por três camadas, septos longitudinal e transversal. D – Parede celular de clamidoconídio terminal com 4 camadas, incluindo uma externa eletrodensa.

#### 5.4.2 Infecção em um e dois sítios com células fúngicas cultivadas por longo período

Camundongos foram infectados em uma ou duas patas com células fúngicas cultivadas por 6 meses, sendo monitorados, mensalmente, durante 7 meses. Os animais desenvolveram infecção estável e crônica (Figura 31), exceto oito camundongos inoculados em único sítio que apresentaram cura após 5 meses. A partir do primeiro mês, foi verificado intumescimento tecidual, particularmente nos animais inoculados em duas patas. As patas adquiriram consistência firme após o segundo mês de infecção. Hiperceratose plantar era observada em animais inoculados em dois sítios depois de cinco meses. Aos 7 meses, células fúngicas viáveis foram recuperadas de 7 e 18 amostras teciduais de animais inoculados em uma ou duas patas, respectivamente. Metástase fúngica não foi clinicamente verificada. Número pequeno de corpos escleróticos foi observado em exame direto (Figura 32) e em secções histopatológicas (Figura 33). Hiperplasia tecidual, proliferação de células pseudoepiteliomatosas, granulomas com microabscessos (Figura 33, A), infiltração de PMNs, macrófagos esponjosos, e, ocasionalmente, eosinófilos e linfócitos eram verificados. Em cortes histopatológicos de animais inoculados em duas patas, PMNs eram encontrados dentro e ao redor dos microabscessos (Figura 33, B), enquanto elevada quantidade de PMNs era observada em lesões de animais infectados em único sítio (Figura 33, C).

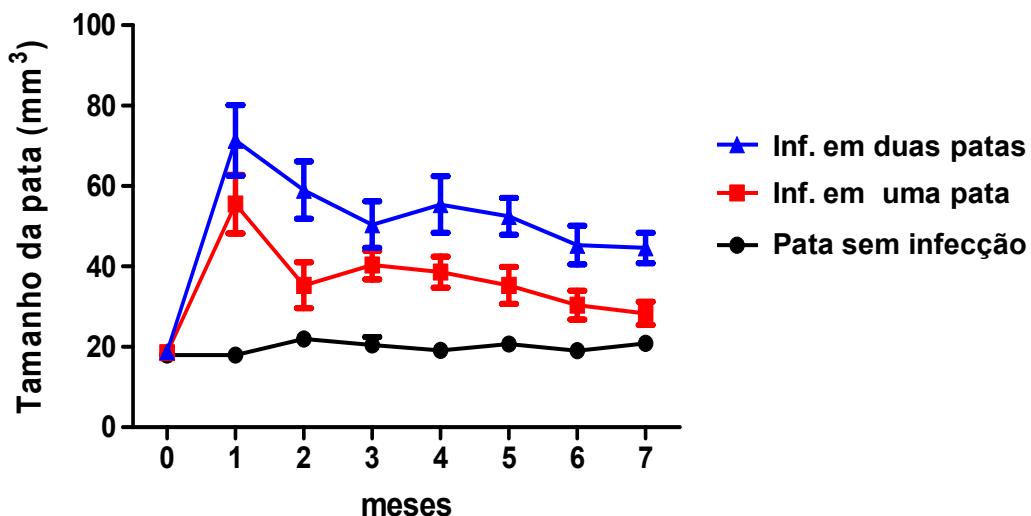


Figura 31 – Cinética das lesões em camundongos BALB/c infectados s.c. em uma e duas patas com células de *F. pedrosoi* cultivadas por longo período, durante 7 meses. Animais infectados em dois sítios manifestaram intumescimento mais acentuado das patas e maior estabilidade da infecção crônica do que aqueles inoculados em única pata. Dados são apresentados em média e SE, teste ANOVA e *t* Students,  $P < 0.05$ .

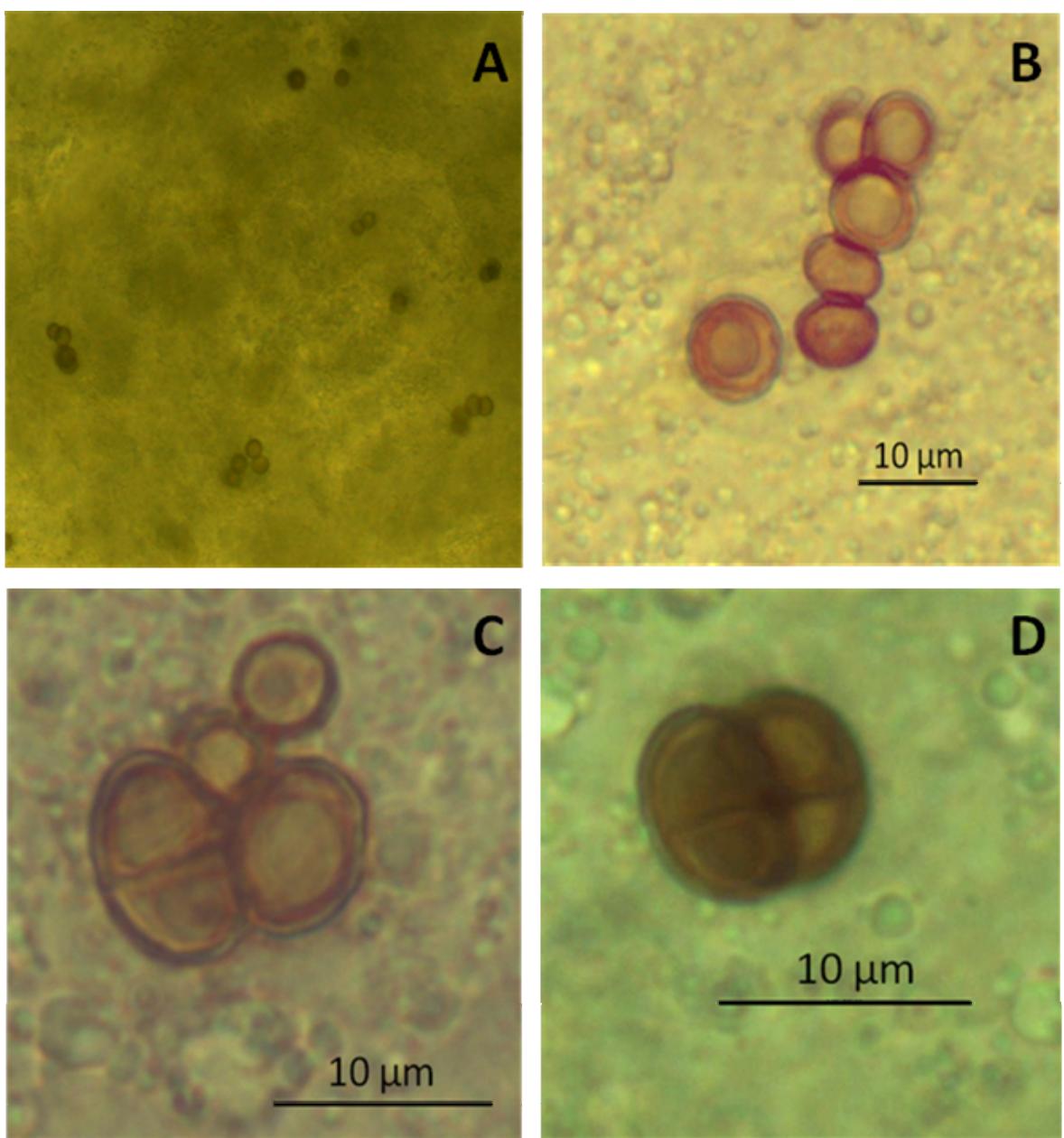


Figura 32 – Corpos escleróticos observados por exame direto em amostras teciduais de pata, provenientes de camundongos BALB/c, 7 meses após infecção com células de *F. pedrosoi* cultivadas por longo período; A - 100x, B - 400x, C e D - 1000x.

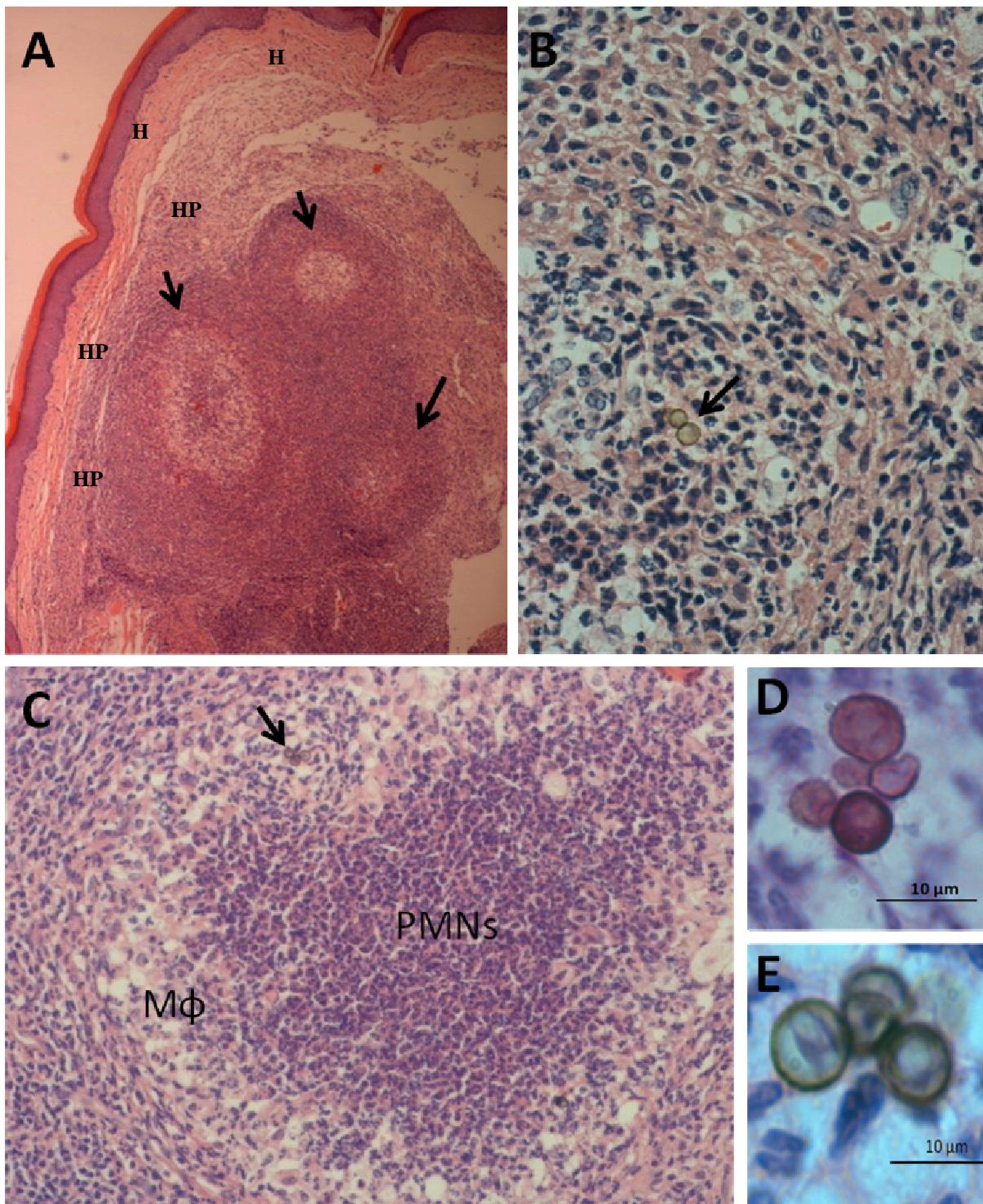


Figura 33 – Secções histopatológicas de tecido subcutâneo, provenientes de animais com infecção crônica, ao sétimo mês após inoculação s.c. da pata com células cultivadas por 6 meses; PAS. A – Reação granulomatosa com microabscessos (setas), hiperqueratose (H) e hiperplasia pseudoepiteliomatosa; 40x. B - Abscesso formado em pata de animal infectado em dois sítios, contendo infiltrado neutrófílico, corpo esclerótico (seta), macrófagos esponjosos, encapsulamento por fibroblastos, raros linfócitos e eosinófilos; 200x. C – Abscesso com grande quantidade de PMNs, corpo esclerótico (seta) na zona de macrófagos esponjosos, tecido proveniente de animal infectado s.c. em única pata; 100x. D e E - Corpos escleróticos com diâmetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$ ; 1000x.  
 MΦ = macrófagos, PMNs = leucócitos polimorfonucleares.

## **6. DISCUSSÃO**

## **6.1 Infecção experimental com diferentes formas de *F. pedrosoi* em único sítio**

Desde a descoberta da doença, várias tentativas para o estabelecimento de infecção animal crônica têm sido realizadas (De Hoog et al, 2000; Esterre e Richard-Blum, 2002). No entanto, os modelos animais descritos ainda não são considerados adequados para o estudo da CBM experimental, especialmente, porque as lesões, na maioria das vezes, não cronificam ou não apresentam similaridade histopatológica com a CBM humana (Esterre e Richard-Blum, 2002; Esterre e Queiroz-Telles, 2006). Tais aspectos talvez indiquem a possibilidade de haver resistência natural dos animais à infecção e que a susceptibilidade pode depender de mecanismos específicos do hospedeiro e parasita. Nesse sentido, elevado número de indivíduos, durante o trabalho ou em passeios campestres, são expostos a processos traumáticos com material contaminado por fungos, todavia, poucos indivíduos desenvolvem a doença (Kurup, 1971; Esterre e Richard-Blum, 2002).

Quanto à inoculação de *F. pedrosoi* em único sítio, verificamos o papel das diferentes formas fúngicas durante o curso da infecção e a resposta tecidual dos animais, sem reprodução da doença crônica. A infecção com células conidiogênicas e conídios resultou observações de formas parasitárias similares a corpos escleróticos. As células transformadas *in vivo* eram mais resistentes a resposta do hospedeiro do que hifas e conídios, sendo observadas em tecido até 40 dias após inoculação. A morfologia fúngica pode ser um fator importante na sobrevida dos agentes de CBM frente às condições de estresse dentro do hospedeiro (De Hoog et al, 2000). A partir desses estudos preliminares, foi hipotetizado que a sobrevivência do fungo em parasitismo e o estabelecimento de infecção crônica poderiam ser devido à inoculação de formas infectantes específicas, uma vez que, mesmo havendo transformação *in vivo* das células fúngicas para formas parasitárias (semelhante a corpos escleróticos), os agentes eram eliminados. As lesões por *F.*

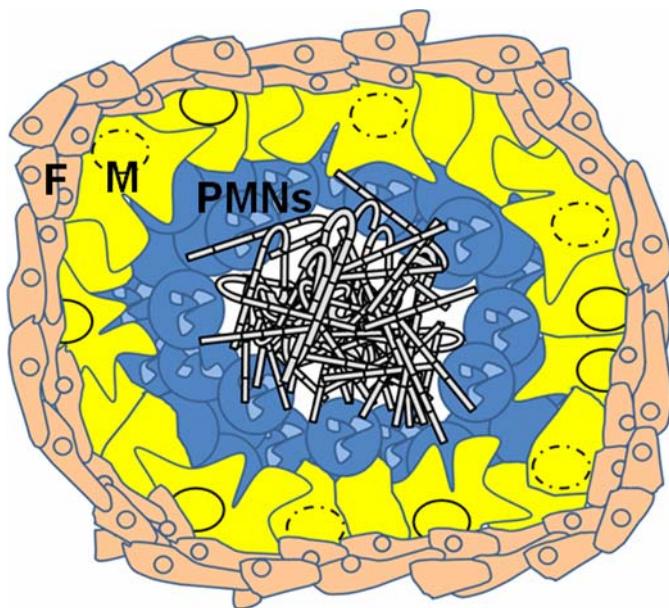
*pedrosoi*, normalmente, apresentam regressão em 4 a 6 semanas pós-inoculação (Kurup, 1971; Al-Doory, 1972; Kurita, 1979; Gugnani et al, 1986; Martinez et al, 2005). De acordo com nossos experimentos, células viáveis de *F. pedrosoi* eram recuperadas dos órgãos infectados, em média, até 20 dias pós-infecção com conídios ou hifas, concordando com dados observados em outros estudos (Kurita, 1979; Ahrens et al, 1989; Martinez et al, 2005). Kurup (1971) infectou de 30 coelhos com *F. pedrosoi*. Um grupo de 15 coelhos recebeu doses de 100mg de acetato de cortisona, 2 dias antes de serem inoculados i.v. com o fungo, e uma dose a cada 2 dias depois da infecção, completando 8 semanas. Ao fim do experimento, nenhum animal morreu, e do grupo tratado com cortisona, somente nove animais apresentaram lesões nos órgãos com duração de 2 meses aproximadamente. Polak (1984) inoculou i.v. suspensão fúngica de  $8 \times 10^2$  UFC/0,2 ml em camundongos Swiss machos. Cortisona foi administrada 90 minutos antes e 24 horas depois da inoculação do fungo. A maioria dos camundongos sobreviveu até a sétima semana, não sendo observado sinal da doença nas primeiras semanas. Após 3 e 4 semanas, os camundongos apresentaram inchaço e pontos enegrecidos principalmente no sítio de infecção. Corpos escleróticos foram encontrados em exames de tecidos subcutâneos. Em concordância com outras observações experimentais (Kurup, 1971; Kurita, 1979; Polak, 1984; Gugnani et al, 1986), nossos resultados mostraram que infecções em único sítio por células fúngicas, produzidas *in vitro* em intervalos de 15 a 30 dias, apresentam evolução benigna, independente do tecido alvo.

A produção de corpos escleróticos *in vitro* tem sido obtida em meios ácidos (Alviano et al, 1992; Mendoza et al, 1993). A acidez gerada em processos granulomatosos pós-traumatismo foi indicada como possível fator responsável pela transformação das células de *F. pedrosoi* (Mendoza et al, 1993). O fator agregador

plaquetário, um constituinte fisiológico, também foi relacionado à transformação *in vitro* das células fúngicas (Alviano et al, 2003). Corpos escleróticos produzidos *in vitro* têm sido descritos como originários dos conídios (Alviano et al, 1992; Alviano et al, 2003) e hifas (Mendoza et al, 1993). Nessa investigação, corpos escleróticos foram obtidos *in vivo* somente através de inóculos contendo células conidiogênicas, as quais se modificaram estruturalmente, aumentando a espessura da parede celular, pigmentação e secreção de melanina. Possivelmente, células conidiogênicas, ou formas diferenciadas, ou corpos escleróticos encontrados na natureza, como em tecidos vegetais (mas não o micélio vegetativo e nem conídios), são passíveis de serem estruturas fúngicas ligadas à CBM, porque hifas e conídios não produzem formas parasitárias *in vivo*. Formas fúngicas similares a corpos escleróticos talvez sejam mais virulentas do que outras formas, uma vez que, essas estruturas já estariam pré-adaptadas ao parasitismo. Ao contrário das hifas e conídios, corpos escleróticos, formados após inoculação i.p. com CCC, foram capazes de se propagar, principalmente, para os tecidos adiposos e conjuntivo. Provavelmente, por secretarem algum fator de virulência que facilite a invasão tecidual e/ou fuga da resposta imune. Altos níveis de ectofosfatases foram detectados em corpos escleróticos produzidos *in vitro*, comparado a outras formas fúngicas (Alviano et al, 2003). Exoenzimas de *F. pedrosoi* podem clivar constituintes da matriz extracelular (Palmeira et al, 2006). Metástases também foram descritas em animais com resposta celular deficiente (Nishimura e Miyaji, 1981; Ahrens et al, 1989). Assim, embora a doença seja considerada, em geral, mórbida, localizada e de baixa contiguidade, disseminações podem ocorrer durante o curso da doença, podendo estar associadas com fatores produzidos pelo fungo e condições de imunidade do hospedeiro.

A resposta celular é a mais importante linha de defesa contra os fungos. O seu comprometimento ou supressão aumenta a propensão às infecções fúngicas. Em concordância com outras investigações (Kurita, 1979; Nishimura e Miyaji, 1981; Gugnani et al, 1986; Martinez et al, 2005), animais inoculados em único sítio desenvolveram lesões inflamatórias de curso agudo, com produção de abscessos e exsudatos, que regrediam e se resolviam em períodos menores de 2 meses. Camundongos (bg/bg), que possuem função deficiente de macrófagos, foram resistentes à infecção por *F. pedrosoi*, indicando que outras células seriam prioritárias no controle desse fungo (Ahrens et al, 1989). Os neutrófilos têm sido relacionados com resistência inata aos fungos. Animais com deficiência neutrofílica têm sido mais suscetíveis às micoses, o que demonstra a importância de tais células na defesa imune do hospedeiro (Clemons et al, 2000; Zelante et al, 2006). Bonnett et al (2006) utilizaram camundongos BALB/c, C57BL/6, CXCR2<sup>-/-</sup> e gp91<sup>phax-/-</sup> para verificar o papel dos neutrófilos em infecções pulmonares causadas por *A. fumigatus*. Observaram que em animais com recrutamento tardio de neutrófilos para os sítios de infecção, ocorria germinação dos conídios de *A. fumigatus*, enquanto nas linhagens selvagens, como camundongos BALB/c, tais células fúngicas não alteravam sua morfologia e eram mais facilmente destruídas. Rodriguez et al (2007), ao tratarem camundongos C57BL/6 com anticorpos anti-Gr-1 para indução de neutropenia, avaliaram o papel dos neutrófilos em infecção da cavidade nasal causada por *A. fumigatus*, demonstrando que a germinação dos conídios desse fungo ocorria somente em tal grupo animal e que a suspensão do tratamento estava relacionada com eliminação das hifas. Ativação diferenciada dos neutrófilos frente a distintas espécies de parasitos e fungos tem sido demonstrada (Clemons et al, 2000; Peltroche-Llacsahuanga et al, 2003). A migração de PMNs para o sítio de

inoculação fúngica tem sido relacionada com resistência à infecção por *F. pedrosoi* (Nishimura e Miyaji, 1981; Ahrens et al, 1989; Martinez et al, 2005). A região onde as hifas eram inoculadas coincidia com o centro do abscesso, circundado por neutrófilos, conforme figura 8 e esquema 1 abaixo.



Esquema 1- Camadas do abscesso, formadas após infecção com células de *F. pedrosoi*. Fibroblastos (F, rosa), macrófagos (MΦ, amarelo), neutrófilos (PMNs, azul) e hifas no centro do abscesso.

Frequentemente, na região com predomínio de neutrófilos (região central da lesão), as células fúngicas estavam destruídas, com morfologia alterada, ou ausentes, enquanto na periferia dos abscessos (região rica em macrófagos esponjosos), os corpos escleróticos tinham morfologia preservada (Fig. 6). Desse modo, a eliminação de *F. pedrosoi* em tecido pode ter relação com a liberação de substâncias extremamente potentes contra fungos, após degeneração dos neutrófilos. Porções das estruturas fúngicas mortas eram visualizadas, principalmente, dentro do citoplasma de macrófagos espumosos. Macrófagos

ativados são pouco ativos contra *F. pedrosoi* *in vitro* (Nishimura, 1981; Gugnani et al, 1986; Ahrens et al, 1989; Martinez et al, 2005). Rozental et al (1996) relataram atividade fungicida dos neutrófilos *in vitro* e baixa ação fagocitária de tais células, ao contrário de Nishimura e Miyaji (1981) que sugerem fagocitose dos fungos por neutrófilos. A infiltração de PMNs no tecido infectado e subsequente morte celular de tais células, com liberação de substâncias tóxicas, talvez seja uma explicação plausível relacionada à inativação de *F. pedrosoi*. Essas conclusões são baseadas, em particular, nos experimentos de infecção por hifas, pois os PMNs se degeneravam próximo a região central dos abscessos, local onde havia grande quantidade de células fúngicas. Células de defesa do hospedeiro eram infrequentes ou completamente ausentes no centro dos abscessos. As hifas tinham, muitas vezes, morfologia alterada ou aspecto atrofiado na região central, mas, na periferia, suas características estavam aparentemente preservadas. Macrófagos podem induzir neutrófilos à apoptose após contato celular (Allenbach et al, 2006). No entanto, também é possível que a morte de PMNs seja causada pelo contato com células fúngicas, durante a inflamação. A degeneração dos neutrófilos leva a liberação de proteínas do complemento, enzimas oxidativas, polipeptídios tóxicos e ativação dos fagócitos para posterior *clearance* (Ribeiro-Gomes et al, 2006; Nuutila e Lilius, 2007). A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou anions superóxidos por neutrófilos, apesar de ser diferenciada, não necessariamente leva à morte do microrganismo. Primeiro, *F. pedrosoi* cresce em condições oxidantes, como em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10% (dados não publicados). Segundo, enzimas, como a catalase, peroxidases e superóxido desmutase, expressas por muitos fungos, atuam como antioxidantes e quebram o peróxido de hidrogênio (Aguirre et al, 2006). Lactoferrinas, calgranulinas, annexin XI, gp-39, chitotriosidase, por exemplo, são proteínas inibitórias de microrganismos,

inclusive de fungos, produzidas pelos neutrófilos (Wang et al, 2004). Complexos antimicrobianos com eficiente capacidade de ligação e controle dos microrganismos foram descritos como “neutrophil extracellular traps” (NETs), os quais são liberados após degranulação dos neutrófilos (Fuchs et al, 2007). Em nosso estudo, uma explicação para a morte dos fungos *in vivo* pode ser devido à descarga dessas moléculas nos sítios de infecção, conforme observado na figura 9. No momento inicial da doença, os neutrófilos possuem baixa atividade fungicida e somente depois de alguns dias demonstram ter capacidade de lisar células fúngicas (Ribeiro-Gomes et al, 2006). Essa capacidade tardia de causar danos às células fúngicas, pode ser independente da presença de linfócitos no local, uma vez que, raríssimas células foram detectadas no sítio de infecção dos camundongos inoculados com hifas. No entanto, é provável que os linfócitos, sistematicamente, tenham uma importante ação no controle da infecção. Camundongos atípicos, por exemplo, eram altamente susceptíveis à infecção por *F. pedrosoi* (Nishimura e Miyaji, 1981). Nestes animais, a doença regrediu após transferência adotiva de linfócitos (Ahrens et al, 1989).

Em relação à doença crônica em humanos, nos cortes histopatológicos, frequentemente, é observada hiperplasia hiperceratósica pseudoepiteliomatosa com predomínio de microabscessos ricos em neutrófilos polimorfonucleares (Esterre e Richard-Blum, 2002). Assim, embora os neutrófilos estejam presentes no sítio de infecção, é possível que tais células tenham sua atividade suprimida por fatores humorais e/ou celulares.

## 6.2 Coestimulação antigênica

Inicialmente, foi realizada inoculação com células vivas em dois sítios, peritônio e pata, sendo verificado curso das infecções com maior duração em relação aos animais inoculados somente em um sítio. A hipótese de “superinfecção” foi sugerida como explicação de que hospedeiro teria maior dificuldade em controlar excessiva carga parasitária. No entanto, essa proposição era contrária aos nossos estudos anteriormente desenvolvidos, uma vez que, conídios ou CCC inoculados sob altas concentrações (aprox.  $1 \times 10^8$ ) em único sítio provocavam respostas inflamatórias de maior intensidade, eliminando o microrganismo mais eficientemente, do que aqueles com menor concentração fúngica. Posteriormente, foi realizada inoculação de células mortas e vivas em sítios diferentes. Os resultados demonstraram que a coestimulação antigênica induzia a persistência da infecção, de modo semelhante aos animais inoculados com inóculo viável em dois sítios. Desse modo, a hipótese inicial foi rejeitada. E embora o termo “superinfecção” seja citado em alguns trabalhos, em particular, naqueles referentes a inoculações múltiplas, o mesmo deve ser repensado quando for o caso de infecção ou estímulos múltiplos da resposta imune; e talvez, seja mais prudente usar designações como “infecção multifocal ou coestimulação antigênica”.

Cura clínica e micológica da infecção por *F. pedrosoi*, normalmente, ocorria em até 2 meses, quando a inoculação era feita em único sítio, sendo abundante a migração de PMNs para o abscesso. No entanto, quando se realizava a infecção em mais de um sítio, ocorria maior duração da infecção e formação de várias lesões focais (granulomas-like) no tecido, ocorrendo cura após 3 a 4 meses. Caradona-Castro e Agudelo-Flores (1999) descreveram fato semelhante, após inoculação de 0.2 mL de inóculo, sob concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, em cinco sítios peritoneais.

Os autores concluíram ser o primeiro relato de infecção crônica por *F. pedrosoi*. Todavia, os animais foram avaliados somente por período de 4 meses, não havendo relato evidente de cronicidade por mais tempo. Em nossos experimentos, os animais coestimulados, em geral, evoluíam para cura, 4 meses depois da inoculação, indicando apenas maior duração da infecção quando comparado ao grupo inoculado em único sítio.

Outro aspecto da pesquisa foi a observação de que após o desaparecimento do abscesso no peritônio, iniciava-se um processo de regressão das lesões na pata até desaparecerem. Isto é, o processo de eliminação do fungo no sítio secundário tinha início após desaparecimento do foco antigênico primário. Analisando secções histopatológicas de antes e após esse evento, verificamos incremento da migração de neutrófilos para lesões focais nas patas, o que foi correlacionado a fase de declínio da infecção. É possível que a resposta do hospedeiro, ao combater um patógeno específico presente em múltiplos sítios, crie condições para resolver um foco infeccioso por vez. O fato verificado demonstrou que o hospedeiro pode eliminar os focos de infecção de forma isolada, porém de maneira, sistematicamente, integrada, sendo os neutrófilos importantes mediadores desse evento.

A supressão da resposta imune, atuante contra os agentes de CBM, pode estar relacionada com indução de determinada população de células T (Esterre e Richard-Blum, 2002). A inoculação de *Leishmania major* em dois sítios de camundongos BALB/c estimula, por exemplo, a migração de células supressoras T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> para um dos sítios de infecção, o que leva a maior persistência do parasita, quando comparado com animais inoculados em único sítio (Belkaid et al, 2002; Mendez et al, 2004). Os resultados, aliados a dados da literatura (Belkaid et al, 2002; Mendez et al, 2004), indicavam a possibilidade de envolvimento de mecanismos de tolerância

periférica à infecção por *F. pedrosoi*, gerados por coestimulação antigênica. A indução de tolerância sistêmica após exposição a altas doses de抗ígenos por via oral é bem estabelecida (Kraus et al, 2005; Illoh et al, 2006; Wakabayashi et al, 2006). Com intuito de verificar se a coestimulação antigênica poderia causar supressão das lesões, através da imunização de rotas de tolerância bem conhecidas, células fúngicas inviáveis foram inoculadas na mucosa pulmonar ou oral, previamente, a infecção da pata. No caso dos animais induzidos por via oral, a imunização ocorreu semanas antes e no dia da infecção da pata. Ao início do processo infeccioso em animais imunizados v.o., a resposta inflamatória era bem menos acentuada do que em todos os outros grupos de animais hígidos coestimulados. Provavelmente, o fato ocorreu devido às pré-estimulações sucessivas, o que gerou um quadro de maior tolerabilidade aos抗ígenos fúngicos por indução, por exemplo, de mecanismos imunossupressores. Estímulos imunológicos sequenciais causam redução substancial das respostas residuais mediadas por linfócitos T (Melamed e Friedman, 1993). Ambos os grupos animais estimulados pelas vias v.o. e i.t. desenvolveram infecção prolongada na pata, semelhantemente aos camundongos imunizados i.p. e infectados s.c., mostrando, mais uma vez, que a coestimulação aumentava a susceptibilidade do hospedeiro à infecção fúngica. Por isso, a partir desse estudo, a possibilidade da supressão das lesões, gerada pós-coestimulação, ser causada por mecanismos de tolerância periférica ficou mais evidente.

Aspectos elementares da resposta imune, relacionados ao estímulo imunológico de dois sítios, foram acessados por meio do estudo com animais KO. Camundongos KO infectados em único sítio, geralmente, eram mais suscetíveis do que linhagens selvagens, porém as reações teciduais e rota de cura eram similares.

Infecção prolongada, em geral, foi verificada nos animais KO coestimulados (inf. s.c. pata e imuniz. i.p.), exceto em animais KO CD8 e IL-10. Nas secções histológicas, abscesso neutrofílico foi observado em tecido de animais KO com infecção unifocal. Enquanto que lesões multifocais ricas em histiócitos foram observadas somente nos camundongos coestimulados de modo semelhante às linhagens selvagens.

Animais KOs têm sido utilizados para demonstrar o papel de células T CD8+ e T CD4+ em infecções fúngicas. Células T CD4+ são importantes no controle das micoses sistêmicas, mas em sua ausência ou baixo número, células TCD 8+ estimuladas geram resposta protetora (Deepe et al, 2000; Wuthrich et al, 2003). Patas de animais CD4 KO coestimulados apresentaram significante intumescimento e cura tardia das lesões, demonstrando que uma resposta protetora tardia podia ser produzida na ausência de células T CD4. Camundongos KO CD8 coestimulados, no entanto, desenvolveram lesões de curso crônico, com agravamento progressivo da infecção na pata. Esse achado indicava possibilidade de uma população de células supressoras não-CD8 antígeno-específicas para *F. pedrosoi* ter sido induzida, ou ausência de mecanismos antagônicos à imunossupressão promovidos pelas células CD8.

A indução de resposta imune por células T supressoras tem sido mostrada como dependente de MHC II (Ostman et al, 2005; Suffia et al, 2006). *Fonsecaea pedrosoi* é parasita extracelular, sendo a maior parte de seus抗ígenos, provavelmente, apresentados através da via MHC de classe II. Em nossa investigação, camundongos MHC-II KO coestimulados apresentaram infecção prolongada, demonstrando a possibilidade do processo de supressão das lesões ser independente da via MHC-II, embora抗ígenos de *F. pedrosoi* possam ser processados em vesículas endocíticas.

Apoptose de neutrófilos em processos inflamatórios tem sido relacionados à presença de TNF- $\alpha$  na parede de macrófagos (Allenbach et al, 2006). Como anteriormente descrito, é possível que a degranulação de neutrófilos tenha papel relevante no controle de infecções por *F. pedrosoi*. Animais TNF KO coestimulados desenvolveram infecções prolongadas com tendência à cura de 4 a 5 meses pós-inoculação.

Altos níveis de IL-10 têm sido detectados após coestimulações por antígenos de *L. major* (Mendez et al, 2004). Nessa pesquisa, independente do número de sítios imunestimulados e perfil histopatológico, os grupos IL-10 KO eliminaram a infecção por *F. pedrosoi* de modo similar. Este ensaio revelou que, na ausência de IL-10, a infecção experimental por *F. pedrosoi* em animais coestimulados não persistia, indicando que essa citocina pode ser importante na modulação de uma resposta imunossupressora local.

Os linfócitos B1 são a maior fonte de anticorpos naturais, inclusive de autoanticorpos, podem reconhecer抗ígenos de patógenos e intensificar a apresentação antigênica devido à expressão acentuada de moléculas coestimulatórias, como B7-1 e B7-2 (Martin et al, 2001). No entanto, o papel das células B1 na resposta imune ainda é muito discutível. Animais Xid produziram infecção crônica após coestimulação, sugerindo que células B1 podem ter função antagônica à resposta imunossupressora. Se tal hipótese for confirmada, esses achados sobre tais células podem vir a ser interessantes no campo das doenças autoimunes e transplantes. Nos animais XID, a permanência estável de *F. pedrosoi* esteve relacionada, temporalmente, com adaptação das células fúngicas para formas parasitárias.

Embora o sistema imunológico possa montar respostas com finalidade de evitar a resposta inflamatória em múltiplos sítios e necroses generalizadas, a maior permanência do parasita no hospedeiro pode causar adaptação do patógeno à vida parasitária, aumentando sua sobrevida frente às condições de estresse dentro do hospedeiro. Entretanto, mesmo ocorrendo uma maior resiliência fúngica *in vivo*, as infecções se debelavam nos animais coestimulados, indicando que a estimulação antigênica de mais de um sítio serve apenas como “ferramenta auxiliar” para produzir supressão local das lesões.

### **6.3 Ensaios de interação microbiana**

#### **6.3.1 Caracterização clássica e molecular de *Bacillus subtilis***

As potencialidades biotecnológicas dos bacilos Gram-positivos são vastas, no entanto, a identificação desses microrganismos ainda é muito difícil, em parte devido à elevada biodiversidade, alto índice de variabilidade fenotípica e ausência de métodos qualitativos mais eficazes. As análises clássicas envolvem, especialmente, estudos da morfologia, fisiologia e bioquímica microbiana (Cornea et al, 2003; De Clerck et al, 2004). A utilização dos métodos convencionais, em conjunto com testes moleculares, tem sido interessante durante a caracterização das espécies (Chun e Bae, 2000; Bavykin et al, 2004). Um grande problema no filo Firmicutes é a alta homologia em genes considerados alvo para caracterização filogenética, como 16S e 23S RNAr (Wang et al, 2007). Assim, o sequenciamento de genes de proteínas conservadas, como aquelas envolvidas na replicação, em exemplo, RNA polimerase e girase, podem auxiliar na identificação das espécies por serem mais heterogêneas do que os genes ribossomais (Chun e Bae, 2000; De Clerck et al, 2004; Earl et al, 2007). No entanto, essa heterogeneidade gênica é variável de acordo com o grupo

de *Bacillus* e nem sempre sua utilização é vantajosa na caracterização molecular, pois, dependendo do grupo, subunidades α ou β podem apresentar alta homologia (Bavykin et al, 2004). Outro problema se deve a boa parte das sequências disponíveis em bancos de dados serem parciais (com menos de 800-bases). Sequências parciais com mais de 400 bases demonstraram maior acurácia durante estudos de caracterização filogenética do que aquelas com menos de 200 nucleotídeos (Janda e Abbott, 2007; Wang et al, 2007). Janda e Abbott (2007) relatam que sequências com mais de 1300-bases devem ser usadas para identificação molecular de espécies, baseada no gene 16S rRNA, sendo que a similaridade entre sequências alinhadas deve ser  $\geq 99\%$  e o ideal acima de 99.5%. Nessa investigação, não obtivemos êxito somente com sequenciamento do gene 16S rDNA, porém após cruzar todas as sequências estudadas (16S rDNA, gyrA, rpoB) com aquelas disponíveis nos bancos de dados, verificamos identidade de 100% com as sequências de *Bacillus subtilis*.

### **6.3.2 Antagonismo fúngico por *B. subtilis***

Estratégias antagônicas, geradas pela competição por recursos naturais, como espaço físico e fontes nutricionais, desencadeiam, progressivamente, influências seletivas aos seres (Gall, 1970; Elad, 2003; Boer et al, 2005). Nessa esfera, o antagonismo microbiano tem tido destaque pela grande quantidade de aplicações biotecnológicas, particularmente relacionadas à descrição de novas formas de controle químico e biológico dos microrganismos (Gall, 1970; Riley e Wertz, 2002; Melin, 2004).

Bacilos Gram-positivos são encontrados no solo, atuando como biorreguladores, biodegradadores e biocontroladores naturais de microrganismos

(Shirokov et al, 2002; Boer et al, 2005; Sharma e Sharma, 2008). Uma variedade de interações, como competição por nutrientes ou espaço físico, contribui para a antibiose (Walker et al, 1998; Araujo et al, 2005). Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* causam inibição de outros microrganismos devido à produção de metabólitos secundários, como antibióticos de baixo peso molecular, incluindo peptídeos naturais (Kupper et al, 2003). A bactéria estudada demonstrou boa atividade antifúngica a fungos ambientais e fitopatogênicos, em particular, por antibiose. Naturalmente, *B. subtilis* e *B. cereus* possuem ação biocida contra fungos, sendo citada sua utilização como biocontroladores de fitopatógenos fúngicos (Yoshida et al, 2001; Shirokov et al, 2002). Provavelmente, compostos difundíveis em ágar, produzidos pelos fungos, estejam associados aos mecanismos de reconhecimento e produção de substâncias inibitórias por *Bacillus* sp. Nas interações entre *Bacillus* e fungos, linhas de precipitação foram observadas em nosso estudo. Cornea et al (2003) descreveram tais precipitados como resultado da interação de lecitinas e glicoproteínas.

Estudos com organismos, tais como *Bacillus*, isolados de trato intestinal, apontam o pH como crucial na indução e produção de enzimas (Guo et al, 2006). Em ensaios realizados por Guo et al (2006), cepas de *B. subtilis* MA139, quando submetidas a pH 2.0 e 0.3% sal de bile, apresentaram alta atividade antimicrobiana. Na presente investigação, a inibição dos fungos ocorria mais acentuadamente em meio de cultura ácido (SDA, pH = 5.6) do que nos básicos (TSA, pH = 7.3), mostrando que a síntese de substâncias inibitórias era influenciada pela concentração hidrogeniônica do meio.

Enzimas líticas podem estar envolvidas com atividades inibitórias do crescimento fúngico por algumas espécies de *Bacillus*. Em outras espécies porém,

lipopeptídios parecem determinar tal antagonismo (Cornea et al, 2003). Enzimas ativas contra parede celular fúngica, produzidas por *Bacillus*, têm demonstrado efeito antifúngico (Mavingui e Heulin, 1994). Quitinases e glucanases também desempenham papel antagônico importante frente aos fungos (Handelsman e Stabb, 1996; Keel e Défago, 1997; Barbosa-Corona et al, 1999). Em comparação com espécies Gram-negativas, as bactérias Gram-positivas apresentam maior atividade enzimática, principalmente quanto à produção de DNase (Sanchez-Porro et al, 2003). Nesse trabalho, observamos correlação entre a inibição fúngica com zonas de hidrólise do DNA, sugerindo a possibilidade do processo antagônico estar relacionado a fatores que estejam envolvidos na degradação de ácidos nucléicos. Todavia, estudos futuros mais aprofundados são necessários para confirmar tal hipótese.

A pigmentação nos fungos pode intensificar sua resistência a ambientes hostis (Dijksterhuis et al, 1999). As melaninas tornam as células mais resistentes por sequestrarem radicais oxidativos, absorverem luz e energia em forma de calor através de inúmeros grupos carboxílicos, intensificarem a termotolerância e ocasionarem maior impermeabilização da parede celular (De Hoog et al, 2000; Jacobson, 2000; Gomez e Nosanchuk, 2003; Langfelder et al, 2003). A habilidade de certos microrganismos em produzir melanina está diretamente ligada à sua virulência e patogenicidade (Silveira e Nucci, 2001; Revankar et al, 2002). Após cocultivo de *B. subtilis* e fungos melanogênicos, como *A. alternata* e *Asp. niger*, foi notória a secreção de melaninas em ágar, demonstrando que em situação de adversidade, pigmentos podem ser produzidos para conferir maior proteção aos metabólitos bacterianos ou que substâncias secundárias do bacilo estimulam a via biossintética das melaninas. Indução de melanização fúngica por *Cryptococcus*

*neoformans* ocorreu após interação microbiana com *Klebsiella aerogenes*, sendo relatada a presença de dopamina em extrato bacteriano (Frases et al, 2006). Posteriormente, foi verificado que uma substância produzida pelo metabolismo microbiano, o ácido homogentísico (HGA), causava melanização em *C. neoformans* (Frases et al, 2007).

### **6.3.3 Cocultivo entre células de *F. pedrosoi* e *B. subtilis* e infecção animal**

Muitas espécies de *Bacillus* têm apresentado, naturalmente, atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias, sendo, muitas vezes, investigadas quanto ao seu potencial como agentes para o biocontrole de microrganismos que causam prejuízos na agricultura (Mendez et al, 2004; Suffia et al, 2006). Romero et al (2006) descreveram inibição *in vitro* de *C. carriónii* por *B. subtilis*. A cepa *B. subtilis* BAC-UFMT/01, isolado ambiental utilizado em ensaios de interação com *F. pedrosoi*, foi selecionada devido ao seu excelente perfil inibitório contra várias espécies fúngicas. Alterações celulares foram verificadas no primeiro, segundo e sétimo dia após introdução do bacilo em cultivos de *F. pedrosoi*. As principais mudanças morfológicas observadas em células de *F. pedrosoi* foram quanto à acentuação da conidiogênese e produção de clamidoconídios terminais. Foldes et al (2000) descrevem indução de conidiogênese fúngica por *B. subtilis*. Estudos de antagonismo fúngico têm demonstrado arredondamento de hifas e formação de clamidoconídios (Walker et al, 1998; Yoshida et al, 2001; Shirokov et al, 2002; Boer et al, 2005; Stein, 2005). Após interação de fungo demácia com *B. subtilis* ou com metabólitos bacterianos, a formação de clamidoconídios era observada (Shirokov et al., 2002; Sharma & Sharma, 2008). Geralmente, as células fúngicas produzem tais formas quando são submetidas a condições adversas de crescimento, tendo função

de resistência ambiental. Possivelmente, essas alterações celulares podem ter sido provocadas devido à antibiose mediada por *B. subtilis*. Deleção de genes, por exemplo, em *Pseudomonas cepacia*, responsáveis pela produção de compostos antifúngicos, esteve relacionada à ausência de alteração morfológica de fungos fitopatogênicos (Upadhyay e Jayaswal, 1992). As células de *F. pedrosoi*, cocultivadas com *B. subtilis*, permaneceram viáveis durante o período de observação, sendo notória a secreção de melaninas em SDB devido ao enegrecimento do meio de cultura observado, em particular, após 1 semana.

Animais inoculados com cocultivos se curaram mais tarde do que aqueles infectados somente com hifas, sendo constatada, em cortes histológicos, somente a presença de clamidoconídios terminais 25 dias pós-infecção.

Embora os experimentos de interação microbiana tenham sido realizados *in vitro*, demonstrando que reações antagônicas entre microrganismos podem causar mudanças morfológicas nos fungos, tais observações são possíveis de ocorrerem *in natura*. Tal cepa de *B. subtilis* poderá, no futuro, ser utilizada como alternativa para cocultivo com agentes de CBM, visando a produção de células mais resistentes a resposta do hospedeiro.

#### **6.4 Infecção com células cultivadas por longos períodos**

Cultivos de *F. pedrosoi*, mantidos durante 6 meses, apresentavam vasta variedade de formas morfológicas, tais como células arredondadas, clamidoconídios terminais e intercalares, sendo, muitas vezes, bem melanizadas. As mudanças fúngicas observadas nos cultivos submetidos a crescimento por longo período de tempo, provavelmente, ocorreram em decorrência de carência nutricional. Formas fúngicas similares a corpos escleróticos têm sido detectados em vegetais

(Zeppenfeldt et al, 1994; De Hoog et al, 2000). Foram encontradas também no tecido medular e em espinhos após implantação experimental de células de *C. carriónii* em cactos (De Hoog et al, 2007). Sob condições de estresse *in vitro*, hifas ou conídios se transformam em células arredondadas similares às formas parasitárias (Alviano et al, 1992; Mendoza et al, 1993; Alviano et al, 2003; Badali et al, 2008). Recentemente, foi desenvolvido meio de cultura, contendo extratos dos frutos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e pupunha (*Bactris gasipaes*), para indução rápida de *F. pedrosoi* em corpos escleróticos (Da Silva et al, 2008). No entanto, o potencial infectivo das células escleróticas, produzidas *in vitro* sob condições quimicamente hostis, ainda não foi relatado.

Camundongos BALB/c desenvolveram lesões crônicas pós-infecção com tais formas, especialmente aqueles inoculados em duas patas. Infecções estáveis foram desenvolvidas com baixa concentração de inóculo ( $\leq 1 \times 10^4$  células/mL). O inóculo fúngico continha acentuado número de formas arredondadas e clamidoconídios. Possivelmente, tais formas foram precursoras das células escleróticas observadas após 7 meses de infecção, pois apresentavam morfologia similar e diâmetros, geralmente, entre 5 a 10 µm. A partir de amostras de espinhos de *Mimosa pudica* (recolhidas em local onde uma jovem paciente se infectou com *F. pedrosoi*), muitas formas fúngicas foram observadas, incluindo clamidoconídios terminais (Salgado et al, 2004).

Alguns camundongos inoculados em único sítio apresentaram cura clínica e micológica após 5 meses de infecção. As secções histopatológicas desses animais revelaram acentuada migração de neutrófilos para o sítio de infecção. Em contrapartida, os animais infectados em dois sítios, em geral, desenvolveram lesão estável até o momento do sacrifício, sendo recuperadas células viáveis da maioria

dos casos. Reações teciduais muito similares àquelas observadas na doença humana foram verificadas em tais animais, como hiperplasia pseudoepiteliomatosa, hiperceratose, reações granulomatosas, presença de microabscessos circundados por neutrófilos, corpos escleróticos dentro de células gigantes, linfócitos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos, entre outras características. Em todos os trabalhos de cromoblastomicose experimental, realizados até o momento, o tempo de observação dos animais e de suas respectivas lesões tem sido inferior a 5 meses, independente do curso da infecção (Kurup, 1971; Kurita, 1979; Nishimura e Miyaji, 1981; Polak, 1984; Walsh et al, 1987; Ahrens et al, 1989; Xie et al, 2009). Na presente investigação, apresentamos indícios de uma infecção experimental crônica por *F. pedrosoi*, produzida por células cultivadas durante longos períodos, com curso estável superior a 6 meses e similaridade anatomo-patológica às lesões da doença humana. Desse modo, nossos estudos revelaram que a obtenção de infecção experimental crônica pode depender de formas fúngicas específicas pré-adaptadas ao parasitismo, sendo os clamidoconídios e células arredondadas envelhecidas prováveis precursores das células escleróticas. Futuramente, através de equipamento adequado para realizar o isolamento específico de determinadas células, formas fúngicas como clamidoconídios terminais de *F. pedrosoi* poderão ser estudadas quanto ao seu potencial infectivo e capacidade de causar lesão crônica.

## **7. CONCLUSÕES DOS ESTUDOS**

1 – Inoculação de conídios, CCC e hifas de *F. pedrosoi*, cepa EPM 380/30, em único sítio causava infecção animal de curso agudo com formação de abscesso neutrofílico, sendo a evolução benigna.

2- Corpos escleróticos foram observados somente em tecido de animais inoculados com CCC.

3- A degeneração de neutrófilos com liberação de substâncias inibitórias à *F. pedrosoi* parece relevante para o controle da infecção.

4- Estímulos antigênicos em mais de um sítio produziu infecções prolongadas por *F. pedrosoi*, sendo essa ação mediada por mecanismos de tolerância periférica que na ausência de determinadas células, como T CD8+, ou deficiência em células B-B1, pode ser importante para o agravamento e cronicidade das lesões.

5- A ausência de IL-10 em animais coestimulados esteve ligada a resistência ao desenvolvimento de infecções prolongadas por *F. pedrosoi*.

6- Em geral, as infecções prolongadas regrediam quando o foco primário (peritônio) era eliminado, o que tinha correlação com incremento da migração de neutrófilos para o processo infeccioso secundário (pata).

7 – A interação microbiana entre *F. pedrosoi*, cepa EPM 380/03, e um bacilo ambiental com atividade antagônica a fungos, identificado como *Bacillus subtilis*, causou alterações da morfologia fúngica e indução da secreção de pigmento escuro.

8 - Cocultivos *in vitro*, entre *Bacillus subtilis* (BAC-UFMT/01) e agentes de CBM, podem ser interessantes na obtenção de formas fúngicas mais resistentes, inclusive às defesas do hospedeiro.

9 - Formas de resistência, como os clamidoconídios, podem ser precursoras dos corpos escleróticos e estarem envolvidas com o estabelecimento de infecção crônica em camundongos BALB/c similar a CBM.

10 – Três tipos de infecção (aguda, prolongada e crônica) foram verificados na cromoblastomicose experimental por *F. pedrosoi*, cepa EPM 380/03, o que teve relação com o local/quantidade dos sítios inoculados e da forma fúngica utilizada.

11- Células microbianas ou formas, potencialmente infectantes devem ser utilizadas de modo preferencial no desenvolvimento adequado de infecções crônicas por *F. pedrosoi* em modelos experimentais, enquanto o emprego da coestimulação antigênica pode servir de “ferramenta auxiliar” para gerar imunossupressão das lesões, causando aumento da sobrevida do parasita no parasita e ampliando as chances de sucesso na obtenção de processos infecciosos crônicos.

## **8. REFERÊNCIAS**

Abee T, Krockel L, Hill C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int J Food Microbiol 1995; 28: 169-185.

Aguirre J, Hansberg W, Navarro R. Fungal responses to reactive oxygen species. Med Mycol 2006; 44 Suppl: 101-107.

Ahrens J, Graybill J, Abishaw A, Tio F, Rinaldi M. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 651-658.

Ajello L, Hay RJ. Medical Mycology. London, Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 1998.

Al-Doory Y. Chromoblastomycosis. Montana, Mountain Press Publishing Company 1972.

Al-Doory Y, Pairon R. A bibliography of chromomycosis. Mycopathol Mycol Appl 1974; 54: 91-109.

Allenbach C, Zufferey C, Perez C, Launois P, Mueller C, Tacchini-Cottier F. Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by Leishmania major. J Immunol 2006; 176: 6656-6664.

Alviano C, Farbier S, Travassos L, Angluster J, de Souza W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. Mycopathologia 1992; 119: 17-23.

Alviano CS, Farbier SR, De Souza W, Angluster J, Travassos LR. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. J Gen Microbiol 1991; 137: 837-844.

Alviano D, Kneipp L, Lopes A, Travassos L, Meyer-Fernandes J, Rodrigues M, Alviano C. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. Res Microbiol 2003; 154: 689-695.

Andrade TS, Castro LG, Nunes RS, Gimenes VM, Cury AE. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. Mycoses 2004; 47: 216-221.

Araujo F, Henning A, Hungria M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. World J Microbiol Biotechnol 2005; 21: 1639-1645.

Arras G, Arru S. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. Annal Microbiol Enzimol 1997; 47: 97-120

Asaka O, Shoda M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 4081-4085.

Aslim B, Saúlam N, Beyatli Y. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. Turk J Biol 2002; 26: 41-48.

Attapattu MC. Chromoblastomycosis--a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. Mycopathologia 1997; 137: 145-151.

Badali H, Gueidan C, Najafzadeh MJ, Bonifaz A, van den Ende AH, de Hoog GS. Biodiversity of the genus Cladophialophora. Stud Mycol 2008; 61: 175-191.

Barbosa-Corona J, Contreras J, Velazquez-Robledo R, Bautista-Justo M, Gomez R, Cruz-Camarillo R, Ibarra J. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol Lett 1999; 21: 1125-1129.

Barros T, Resende M. Partial chemical characterization of antigenic preparations of chromoblastomycosis agents. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1999; 41: 343-350.

Batista Junior CB, Albino, U. B., Martines, A. M., Saridakis, D. P., Matsumoto, L. S., Avanzir, M.A., Galdino, A. Fungistatic effect of *Bacillus thuringiensis* and other bacteria on some plant pathogenic fungi. Pesq. agropec. bras. 2002; 37: 1189-1194.

Bavykin S, Lysov Y, Zakhariev V, Kelly J, Jackman J, Stahl D, Cherni A. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. J Clin Microbiol 2004; 42: 3711-3730.

Belkaid Y, Piccirillo C, Mendez S, Shevach E, Sacks D. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nature 2002; 420: 502-507.

Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353-360.

Bell A, Wheeler M. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann Rev Phytopathol* 1986; 24: 411-451.

Bizani D, Brandelli A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 512-519.

Boer W, Folman L, Summerbell R, Boddy L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29: 795-811.

Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saul A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; 44: 1-7.

Bonifaz A, Martinez-Soto E, Carrasco-Gerard E, Peniche J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int J Dermatol* 1997; 36: 542-547.

Bonifaz A, Paredes-Solis V, Saul A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 247-254.

Bonnett CR, Cornish EJ, Harmsen AG, Burritt JB. Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 2006; 74: 6528-6539.

Boop C. Cura da cromoblastomicose por novo método de tratamento. *Med Cut ILA* 1974; 4: 285-292.

Borelli D. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 1987; 9 Suppl 1: S57-63.

Borkow G, Bentwich Z. Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: role of hyporesponsiveness and anergy. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 1012-1030, table of contents.

Bourque WT, Gross M, Hall BK. A histological processing technique that preserves the integrity of calcified tissues (bone, enamel), yolk amphibian embryos, and growth factor antigens in skeletal tissue. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1429-1434.

Brandt M, Warnock D. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemother* 2003; 15 Suppl 2: 36-47.

Broggini G, Duffy B, Holliger E, Schärer H, Gessler C, Patocchi A. Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. *Eur J Plant Pathol* 2005; 111: 93-100.

Cardona-Castro N, Agudelo-Florez P. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Med Mycol* 1999; 37: 81-83.

Cardona-Castro N, Agudelo-Florez P, Restrepo-Molina R. Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 779-784.

Castro L, Pimentel E, Lacaz C. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. *Int J Dermatol* 2003; 42: 408-412.

Cazorla F, Romero D, Perez-Garcia A, Lugtenberg B, Vicente A, Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 1950-1959.

CCAC. Guide to the care and use of experimental animals. In, 1993.

CGUANBR. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research In, 2003.

Chun J, Bae K. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial gyrA gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000; 78: 123-127.

Clemons K, Calich V, Burger E, Filler S, Graziutti M, Murphy J, Roilides E, Campa A, Dias M, Edwards J, Fu Y, Fernandes-Bordignon G, Ibrahim A, Katsifa H, Lameignere C, Meloni-Bruneri L, Rex J, Savary C, Xidieh C. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. Med Mycol 2000; 38 Suppl 1: 99-111.

Conti-Dias I, Vignale R, Pena de Pereire M. Cromoblastomicosis tratada com termoterapia local. Medicina Cútanea 1964; 3: 383-386.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo V, Berneman Z. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. J Leukoc Biol 2007a; 82: 1365-1374.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo V, Berneman Z. Regulatory T cells and human disease. Clin Dev Immunol 2007b; 2007: 89195.

Cooper B, Schneidau J. A serological comparison of *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladosporium carrionii* using immunodiffusion and immunolectrophoresis. Sabouraudia 1970; 8: 217-226.

Cooper P, Espinel I, Wieseman M, Paredes W, Espinel M, Guderian R, Nutman T. Human onchocerciasis and tetanus vaccination: impact on the postvaccination antitetanus antibody response. Infect Immun 1999; 67: 5951-5957.

Corbellini VA, Scroferneker ML, Carissimi M, Santolin LD. Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grown in different culture media. Mycopathologia 2006; 162: 51-55.

Cornea C, Grebenisan I, Mateescu R, Vamanu E, Campeanu G. Isolation and Characterization of New *Bacillus* spp. Strains-Useful as Biocontrol Agents of Plant Pathogens. Rouman Biotechnol Lett 2003; 8: 1115-1122.

da Silva MB, da Silva JP, Sirleide Pereira Yamano S, Salgado UI, Diniz JA, Salgado CG. Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells in vitro. J Clin Microbiol 2008; 46: 3839-3841.

da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. Microbes Infect 2006; 8: 197-205.

de Bedout C, Gomez B, Restrepo A. In vitro susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1997; 39: 145-148.

De Clerck E, Vanhoutte T, Hebb T, Geerinck J, Devos J, De Vos P. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 3664-3672.

De Hoog G. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. Mycoses 1997; 40 Suppl 2: 5-8.

De Hoog G, Nishikaku A, Fernandez-Zeppenfeldt G, Padín-González C, Burger E, Badali H, Richard-Yegres N, Gerrits van den Ende A. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. Stud Mycol 2007; 58: 219-234.

De Hoog G, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Gerrits Van Den Ende A, Matos T, Peltroche-Llacsahuanga H, Pizzirani-Kleiner A, Rainer J, Richard-Yegres N, Vicente V, Yegres F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. Med Mycol 2000; 38 Suppl 1: 243-250.

De Hoog GS, Attili-Angelis D, Vicente VA, Van Den Ende AH, Queiroz-Telles F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. Med Mycol 2004; 42: 405-416.

Deepe G, Romani L, Calich V, Huffnagle G, Arruda C, Molinari-Madlung E, Perfect J. Knockout mice as experimental models of virulence. Med Mycol 2000; 38 Suppl 1: 87-98.

Dijksterhuis J, Sanders M, Gorris L, Smid E. Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 13-21.

Duggan JM, Wolf MD, Kauffman CA. *Phialophora verrucosa* infection in an AIDS patient. Mycoses 1995; 38: 215-218.

Earl A, Losick R, Kolter R. *Bacillus subtilis* genome diversity. J Bacteriol 2007; 189: 1163-1170.

Elad Y. Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. Comm Agricult Appl Biol Sci 2003; 68: 17-24.

Elgart G. Chromoblastomycosis. Dermatol Clin 1996; 14: 77-83.

Elias D, Akuffo H, Pawlowski A, Haile M, Schon T, Britton S. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine 2005; 23: 1326-1334.

Esterre P, Andriantsimahavandy A, Ramarcel E, Pecarrere J. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. Am J Trop Med Hyg 1996a; 55: 45-47.

Esterre P, Inzan C, Ramarcel E, Andriantsimahavandy A, Ratsioharana M, Pecarrere J, Roig P. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study Br J Dermatol 1996b; 134: 33-36.

Esterre P, Jahevitra M, Andriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 497-500.

Esterre P, Jahevitra M, Ramarcel E, Andriantsimahavandy A. Evaluation of the ELISA technique for diagnosis and the seroepidemiology of chromoblastomycosis. J Mycol Med 1997; 7: 137-141.

Esterre P, Pecarrere JL, Raharisolo C, Huerre M. [Squamous cell carcinoma arising from chromomycosis. Report of two cases]. Ann Pathol 1999; 19: 516-520.

Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. Curr Opin Infect Dis 2006; 19: 148-152.

Esterre P, Richard-Blum S. Chromoblastomycosis: new concepts in physiopathology and treatment. J Mycol Med 2002; 12: 21-24.

Farbiarz S, De Carvalho T, Alviano C, De Souza W. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. J Med Vet Mycol 1990; 28: 373-383.

Farbiarz S, de Carvalho T, Alviano C, de Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. J Med Vet Mycol 1992; 30: 265-273.

Ferreira AP, Aguiar AS, Fava MW, Correa JO, Teixeira FM, Teixeira HC. Can the efficacy of bacille calmette-guerin tuberculosis vaccine be affected by intestinal parasitic infections? J Infect Dis 2002; 186: 441-442; author reply 442-443.

Foldes T, Banhegyi I, Herpai Z, Varga L, Szigeti J. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. Appl Environ Microbiol 2000; 89: 840-846.

Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. Med Mycol 2009; 47: 41-43.

Franco L, Gomez I, Restrepo A. Saperconazole in the treatment of systemic and subcutaneous mycoses. Int J Dermatol 1992; 31: 725-729.

Frases S, Chaskes S, Dadachova E, Casadevall A. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a melanin-like pigment in *Cryptococcus neoformans*. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 1542-1550.

FRASES S, SALAZAR A, DADACHOVA E, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 615-621.

Fuchs T, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol 2007; 176: 231-241.

Gall L. Significance of microbial interactions in control of microbial ecosystems. Biotechnol Bioengineer 1970; 12: 333-340.

Gomez B, Nosanchuk J. Melanin and fungi. Curr Opin Infect Dis 2003; 16: 91-96.

Gonzalez GM. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. Med Mycol 2009; 47: 71-76.

Gugnani H, Obiefuna M, Ikerionwu S. Studies on pathogenic dematiaceous fungi, II. Pathogenicity of *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa* for laboratory mice. Mykosen 1986; 29: 505-515.

Guo X, Li D, Lu W, Piao X, Chen X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. Antonie Van Leeuwenhoek 2006; 90: 139-146.

Handelsman J, Stabb E. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. Plant Cell 1996; 8: 1855-1869.

Henson J, Butler M, Day A. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. Annu Rev Phytopathol 1999; 37: 447-471.

Holland IB. The purification and properties of megacin, a bacteriocin from *Bacillus megaterium*. Biochem J 1961; 78: 641-648.

Ilooh K, Campbell C, Ilooh O, Diehl J, Cherry J, Elkhaloun A, Chen Y, Hallenbeck J. Mucosal tolerance to E-selectin and response to systemic inflammation. J Cereb Blood Flow Metab 2006; 26: 1538-1550.

Jacobson E. Pathogenic roles for fungal melanins. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 708-717.

Janda J, Abbott S. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J Clin Microbiol 2007; 45: 2761-2764.

Katz E, Demain AL. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriol Rev 1977; 41: 449-474.

Keel C, Défago G (eds): Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact London, England, Blackwell Science, 1997.

Kraus T, Brimnes J, Muong C, Liu J, Moran T, Tappenden K, Boros P, Mayer L. Induction of mucosal tolerance in Peyer's patch-deficient, ligated small bowel loops. J Clin Invest 2005; 115: 2234-2243.

Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol Rev 1999; 23: 411-456.

Kupper K, Gimenes-Fernandes N, Goes A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. Fitopatol Bras 2003; 28: 251-257.

Kurita N. Cell-mediated immune responses in mice infected with Fonsecaea pedrosoi. Mycopathologia 1979; 68: 9-15.

Kurup P. Pathogenicity of *Phialophora pedrosoi*. Mykosen 1971; 14: 41-44.

Kwon-Chung K, Bennett J. Medical Mycology Philadelphia, Lea & Febiger, 1992.

Lacaz C, Porto E, Martins J, Heins-Vaccari E, Melo N. Tratado de Micologia Médica Lacaz. ed 9, São Paulo, Sarvier, 2002.

Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genet Biol 2003; 38: 143-158.

Lefford M, Mackaness G. Suppression of immunity to *Mycobacterium lepraeumurium* infection. Infect Immun 1977; 18: 363-369.

Lisboa MP, Bonatto D, Bizani D, Henriques JA, Brandelli A. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. Int Microbiol 2006; 9: 111-118.

Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L. Chromoblastomycosis. Clin Dermatol 2007; 25: 188-194.

Martin F, Oliver A, Kearney J. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. Immunity 2001; 14: 617-629.

Martinez E, Rey Valeiron C, Yegres F, Reyes R. The goat: approach to an animal model in human chromomycosis. Invest Clin 2005; 46: 131-138.

Mavingui P, Heulin T. In vitro chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 1994; 26: 801-803.

Melamed D, Friedman A. Modification of the immune response by oral tolerance: antigen requirements and interaction with immunogenic stimuli. *Cell Immunol* 1993; 146: 412-420.

Melin P. Proteomics as a tool to study microbial interactions. *Current Proteomics* 2004; 1: 27-34.

Mendez S, Reckling S, Piccirillo C, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 2004; 200: 201-210.

Mendoza L, Karuppayil S, Szaniszlo P. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses* 1993; 36: 157-164.

Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 313-316.

Minotto R, Bernardi C, Mallmann L, Edelweiss M, Scroferneker M. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 585-592.

Murphy J, Bistoni F, Deepe G, Blackstock R, Buchanan K, Ashman R, Romani L, Mencacci A, Cenci E, Fe d'Ostiani C, Del Sero G, Calich V, Kashino S. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. *Med Mycol* 1998; 36 Suppl 1: 109-118.

NACLAR. Guidelines on the care and use of animals for scientific purposes. In, 2004.

Naclerio G, Ricca E, Sacco M, De Felice M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 4313-4316.

Najafzadeh MJ, Gueidan C, Badali H, Van Den Ende AH, Xi L, De Hoog GS. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med Mycol* 2009; 47: 17-25.

Nakano M, Zuber P. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. Crit Rev Biotechnol 1990; 10: 223-240.

Negroni R, Tobon A, Bustamante B, Shikanai-Yasuda MA, Patino H, Restrepo A. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2005; 47: 339-346.

Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Appl Microbiol Biotechnol 1999; 51: 711-729.

Nishimura K, Miyaji M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection Mycopathologia 1981; 76: 155-166.

Nishimura KaM, M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection Mycopathologia 1981; 76: 155-166.

Nosanchuck J, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol 2003; 5: 203-223.

Nuutila J, Lilius E. Distinction between bacterial and viral infections. Curr Opin Infect Dis 2007; 20: 304-310.

O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. J Clin Invest 2004; 114: 1372-1378.

Okeke C, Gugnani H. Studies on pathogenic dematiaceous fungi. 1. Isolation from natural sources. Mycopathologia 1986; 94: 19-25.

Ostman S, Taube M, Telemo E. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. Immunology 2005; 116: 464-476.

Palmeira V, Kneipp L, Alviano C, dos Santos A. The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46: 21-29.

Pan PY, Ozao J, Zhou Z, Chen SH. Advancements in immune tolerance. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 91-105.

Pandey A, Benjamin S, Soccol C, Nigam P, Krieger N, Soccol V. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 1999; 29 ( Pt 2): 119-131.

Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Jentsch S, Platz A, De Hoog S, Schweizer KG, Haase G. Analyses of phagocytosis, evoked oxidative burst, and killing of black yeasts by human neutrophils: a tool for estimating their pathogenicity? *Med Mycol* 2003; 41: 7-14.

Piccirillo C, Shevach E. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol* 2004; 16: 81-88.

Polak A. Experimental infection of mice by Fonsecaea pedrosoi and Wangiella dermatitidis. *Sabouraudia* 1984; 22: 167-169.

Polonelli L, Casadevall A, Han Y, Bernardis F, Kirkland T, Matthews R, Adriani D, Boccanfusa M, Burnie J, Cassone A, Conti S, Cutler J, Frazzi R, Gregory C, Hodgetts S, Illidge C, Magliani W, Rigg G, Santoni G. The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. *Med Mycol* 2000; 38 Suppl 1: 281-292.

Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2009; 47: 3-15.

Queiroz-Telles F, McGinnis M, Salkin I, Graybill J. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17: 59-85, viii.

Rajendran C, Ramesh V, Misra RS, Kandhari S, Upreti HB, Datta KK. Chromoblastomycosis in India. *Int J Dermatol* 1997; 36: 29-33.

Rao M, Tanksale A, Ghatge M, Deshpande V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 597-635.

Reva O, Vyunitskaya V, Reznik S, Kozachko I, Smirnov V. Antibiotic susceptibility as a taxonomic characteristic of the genus *Bacillus*. Int J Syst Bacteriol 1995; 45: 409-411.

Revankar S. Dematiaceous fungi. Mycoses 2007; 50: 91-101.

Revankar S, Patterson J, Sutton D, Pullen R, Rinaldi M. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. Clin Infect Dis 2002; 34: 467-476.

Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963; 17: 208-212.

Rhodes D. Bacterial antagonist-fungal interactions on the plant aerial surface. Applied Biology 1990; 24: 145-153.

Ribeiro-Gomes F, Silva M, Dosreis G. Neutrophils, apoptosis and phagocytic clearance: an innate sequence of cellular responses regulating intramacrophagic parasite infections. Parasitology 2006; 132 Suppl: S61-68.

Riley M, Wertz J. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. Biochimie 2002; 84: 357-364.

Rintala H, Pitkaranta M, Toivola M, Paulin L, Nevalainen A. Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. BMC Microbiology 2008; 8: 56.

Rippon JW. Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. ed 3<sup>a</sup> ed., Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1988.

Rodriguez T, Falkowski N, Harkema J, Huffnagle G. Role of neutrophils in preventing and resolving acute fungal sinusitis. Infect Immun 2007; 75: 5663-5668.

Romero D, de Vicente A, Olmos J, Davila J, Perez-Garcia A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. J Appl Microbiol 2007; 103: 969-976.

Rozental S, Alviano C, de Souza W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. J Med Vet Mycol 1996; 34: 323-330.

Rozental S, Alviano C, de Souza W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. Mycopathologia 1994; 126: 85-91.

Sadoff H. Sporulation antibiotics of *Bacillus* species. Spores Ved 1972: 157-166.

Salgado C, da Silva J, Diniz J, da Silva M, da Costa P, Teixeira C, Salgado U. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2004; 46: 33-36.

Sanchez-Porro C, Martin S, Mellado E, Ventosa A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J Appl Microbiol 2003; 94: 295-300.

Santos AL, Palmeira VF, Rozental S, Kneipp LF, Nimrichter L, Alviano DS, Rodrigues ML, Alviano CS. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. FEMS Microbiol Rev 2007; 31: 570-591.

Schnitzler N, Peltroche-Llacsahuanga H, Bestier N, Zundorf J, Lutticken R, Haase G. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. Infect Immun 1999; 67: 94-101.

Schwab J. Suppression of the immune response by microorganisms. Bacteriol Rev 1975; 39: 121-143.

Segal A. How neutrophils kill microbes. Annu Rev Immunol 2005; 23: 197-223.

Sharma N, Sharma S. Control of foliar diseases of mustard by *Bacillus* from reclaimed soil. Microbiol Res 2008; 163: 408-413.

Shirokov A, Loginov O, Melent'ev A, Aktuganov G. Protein and peptide factors from *Bacillus* sp.739 inhibit the growth of phytopathogenic fungi. Prikl Biokhim Mikrobiol 2002; 38: 161-165.

Silo-Suh L, Lethbridge B, Raffel S, He H, Clardy J, Handelsman J. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2023-2030.

Silva C. Avaliação clínico-epidemiológica da cromoblastomicose no estado do Maranhão – Brasil. In: Maranhão, Brasil, Universidade Federal do Maranhão, 1998.

Silva C, da Rocha R, Moreno J, Branco M, Silva R, Marques S, Costa J. The coconut babacu (*Orbignya phalerata martins*) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhao, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995; 28: 49-52.

Silva J, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* 1998; 143: 171-175.

Silveira F, Nucci M. Emergence of black moulds in fungal disease: epidemiology and therapy. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14: 679-684.

Sousa M, Azevedo C, Nascimento R, Ghosn E, Santiago K, Noal V, Bomfim G, Marques S, Goncalves A, Santos D, Almeida S. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 864-870.

Sousa Mda G, Ghosn E, Almeida S. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol* 2006; 64: 595-600.

Stabb E, Jacobson L, Handelsman J. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4404-4412.

Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 2005; 56: 845-857.

Stevens DA, Walsh TJ, Bistoni F, Cenci E, Clemons KV, Del Sero G, Fe d'Ostiani C, Kullberg BJ, Mencacci A, Roilides E, Romani L. Cytokines and mycoses. *Med Mycol* 1998; 36 Suppl 1: 174-182.

Stewart GR, Boussinesq M, Coulson T, Elson L, Nutman T, Bradley JE. Onchocerciasis modulates the immune response to mycobacterial antigens. Clin Exp Immunol 1999; 117: 517-523.

Suffia I, Reckling S, Piccirillo C, Goldszmid R, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. J Exp Med 2006; 203: 777-788.

Suzuki S, Takeda N. Serologic cross-reactivity of the D-galacto-D-mannans isolated from several pathogenic fungi against anti-*Hormodendrum pedrosoi* serum. Carbohydr Res 1975; 40: 193-197.

Taborda CP, da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. Mycopathologia 2008; 165: 331-339.

Tagami H, Ohi M, Aoshima T, Moriguchi M, Suzuki N, Yamada M. Topical heat therapy for cutaneous chromomycosis. Arch Dermatol 1979; 115: 740-741.

Telles-Filho F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica, e terapêutica com itraconazol In Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 1996.

Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. J Exp Med 2007; 204: 239-243.

Tuffanelli L, Milburn P. Treatment of chromoblastomycosis. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 728-732.

Upadhyay R, Jayaswal R. *Pseudomonas cepacia* causes mycelial deformities and inhibition of conidiation in phytopathogenic fungi. Curr Microbiol 1992; 24: 181-187.

Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of chromoblastomycosis. Mycopathologia 1989; 105: 1-6.

van der Wal F, Luijink J, Oudega B. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. FEMS Microbiol Rev 1995; 17: 381-399.

Vicente V, Angelis D, Queiroz-Telles F, Pizzirani-Kleiner A. Isolation of *Herpotrichiellaceous* fungi from the environment. *Braz J Microbiol* 2001; 32: 47-51.

Vicente VA, Attili-Angelis D, Pie MR, Queiroz-Telles F, Cruz LM, Najafzadeh MJ, de Hoog GS, Zhao J, Pizzirani-Kleiner A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Stud Mycol* 2008; 61: 137-144.

Vidal M, Castro L, Cavalcante S, Lacaz C. Highly specific and sensitive, immunoblot-detected 54 kDa antigen from *Fonsecaea pedrosoi*. *Med Mycol* 2004; 42: 511-515.

Vidal M, de Castro L, Cavalecate S, Lacaz Cda S. Immunoprecipitation techniques and Elisa in the detection of anti-*Fonsecaea pedrosoi* antibodies in chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45: 315-318.

Vitale RG, de Queiroz Telles F, de Hoog S. The dark world of black fungi--a major area of concern. Preface. *Med Mycol* 2009a; 47: 1.

Vitale RG, Perez-Blanco M, De Hoog GS. In vitro activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med Mycol* 2009b; 47: 35-40.

Vollum D. Chromomycosis: a review. *Br J Dermatol* 1977; 96: 454-458.

Wakabayashi A, Kumagai Y, Watari E, Shimizu M, Utsuyama M, Hirokawa K, Takahashi H. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunology* 2006; 119: 167-177.

Walker R, Powell A, Seddon B. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J Appl Microbiol* 1998; 84: 791-801.

Walsh T, Dixon D, Polak A, Salkin I. Comparative histopathology of *Dactylaria constricta*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Wangiella dermatitidis*, and *Xylohypha bantiana* in experimental phaeohyphomycosis of the central nervous system. *Mykosen* 1987; 30: 215-225.

Wang Q, Garrity G, Tiedje J, Cole J. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 5261-5267.

Wang X, Zhao H, Andersson R. Proteomics and leukocytes: an approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses. *J Proteome Res* 2004; 3: 921-929.

Whipps J. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Adv Botan Res* 1997; 26: 1-134.

Whipps J. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 2001; 52: 487-511.

Winn W, Allen S, Janda W. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Wuthrich M, Filutowicz HI, Warner T, Deepe GS, Jr., Klein BS. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4 help in exogenous antigen presentation to CD8+ T cells: implications for vaccine development in immune-deficient hosts. *J Exp Med* 2003; 197: 1405-1416.

Xi L, Lu C, Sun J, Li X, Liu H, Zhang J, Xie Z, De Hoog GS. Chromoblastomycosis caused by a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora*. *Med Mycol* 2008; 1-4.

Xi L, Sun J, Lu C, Liu H, Xie Z, Fukushima K, Takizawa K, Najafzadeh MJ, De Hoog GS. Molecular diversity of *Fonsecaea* (*Chaetothyriales*) causing chromoblastomycosis in southern China. *Med Mycol* 2009; 47: 27-33.

Xie Z, Zhang J, Xi L, Li X, Wang L, Lu C, Sun J. A chronic chromoblastomycosis model by *Fonsecaea monophora* in *Wistar* rat. *Med Mycol* 2009; 1-6.

Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeyama K, Shirata A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 2001; 91: 181-187.

Yu S, Maiti P, Dyson M, Jain R, Braley-Mullen H. B cell-deficient NOD.H-2h4 mice have CD4+CD25+ T regulatory cells that inhibit the development of spontaneous autoimmune thyroiditis. *J Exp Med* 2006; 203: 349-358.

Zelante T, Montagnoli C, Bozza S, Bellocchio S, Bonifazi P, De Luca A, Bistoni G, Mosci P, Romani L. Manipulating immunity against *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol 2006; 44 Suppl: 237-243.

Zeppenfeldt G, Richard-Yegres N, Yegres F. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. Rev Iberoam Micol 1994; 11: 61-63.

## **ANEXOS**

## **ANEXO 1**

Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells. Submitted to Mycoses, 2008.

Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells.

Alexandre Paulo Machado

Department of Basic Sciences of Health,

Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Brazil.

Maria Regina Regis Silva

Department of Pathology,

Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Olga Fischman

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology,

Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Address:

Alexandre Paulo Machado

Laboratório de Microbiologia

Departamento de Ciências Básicas em Saúde

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade Federal de Mato Grosso

Avenida Fernando Corrêa, s/nº Coxipó

Cuiabá-MT

CEP 78060-900

Phone: +55 (65) 3615-8835

e-mail: alexandre.paulo@unifesp.br or alepaulo@hotmail.com

## ABSTRACT

*Fonsecaea pedrosoi* is an important causative agent of chromoblastomycosis (CBM) specially in humid area of the world; however, little is known about the infective forms of this agent that cause CBM. The aim of this study was to investigate the murine tissue response to inoculation with different forms of *F. pedrosoi* and the morphological changes of the fungal cells *in vivo*. BALB/c mice were inoculated intraperitoneally with hyphae, conidia or conidiogenous cells and conidia (CCC) at a single site. In addition, the abdomen and footpads were infected subcutaneously with CCC. Fungal forms were inoculated at a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells. Hyphae and ungerminated conidia inocula were unable to be transformed into parasitic forms. In tissue, a great number of conidiogenous cells underwent transformation into sclerotic bodies, which were more resistant to phagocytes *in vivo* than conidia and hyphae. Clinical and mycological cure of animals infected with CCC was observed from the fourth to the sixth week of infection, while conidia and hyphae infections were faster and generally lasted two to three weeks. High number of destructed conidia was observed intracellularly in macrophages. The migration of neutrophils to the inflammatory site seems important for microbicidal activity, particularly against hyphae. Our observations suggest that inocula with conidiogenous cells are associated with *in vivo* transformation into sclerotic bodies. And that, local immune response involved with host resistance to experimental *F. pedrosoi*-infection is primarily mediated by neutrophils as observed in histological sections.

Keywords: *Fonsecaea pedrosoi*, experimental chromoblastomycosis, fungal forms.

Abbreviations: CBM, chromoblastomycosis; CCC, conidiogenous cells and conidia; SDA, Sabouraud dextrose agar; PMNs, polymorphonuclear leucocytes; SDB, Sabouraud dextrose broth; PDB, potato dextrose broth; H&E, hematoxylin-eosin; PAS, periodic acid-Schiff.

## INTRODUCTION

Chromoblastomycosis (CBM) occurs following traumatic inoculation of dematiaceous fungi in subcutaneous tissue. *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Rhinocladiella* and *Exophiala* are the most frequently diagnosed genera, and *F. pedrosoi* and *C. carrionii* are the main agents isolated [1-3]. Globoid, thick-walled, multiseptate, dark brown cells, primarily found in dermal and epidermal tissue, are the characteristic form of these fungi in parasitism. These cells can also be observed either alone or in groups and are commonly known as sclerotic, fumagoid, muriform and Medlar bodies [3-5].

Since the disease was discovered, several studies employing experimental inoculation of CBM agents have been carried out in an attempt to develop an animal model [6-10]; however, a suitable model for experimental CBM has not yet been successfully established [3, 11]. Overall, animal infections with *F. pedrosoi* have been disappointing due to the acute course of the disease and efficient fungal elimination as a result of the host response [8, 9, 12, 13], although inoculation of CBM agents in different peritoneal sites in mice can confer persistent infection [14-16]. Nevertheless, the interactions between the host and CBM agents involved in this infection process at multiple sites are not yet understood.

There is a lack of knowledge regarding the infective forms involved in the establishment of CBM and the mechanism whereby fungal cells transition from the saprophytic to the parasitic phase. Transformation of *F. pedrosoi* cells into sclerotic cells could be considered an important factor in fungal virulence [13]. Hyphae and conidia are currently cited in literature as forms that may be introduced into subcutaneous tissue following trauma [17-19]. However, macrophages are able to ingest and kill conidia of CBM agents [20, 21]. In invasive aspergillosis, macrophages are sufficient to generate an effective host defense against conidia, while neutrophils are important for hyphal killing [22]. Neutrophils are essential for resistance to fungal infections, but their ability and the *in vivo* mechanism employed to kill extracellular organisms are not fully characterized [23].

*In vitro*, *F. pedrosoi* hyphae from conidia germination can differentiate into vegetative and reproductive mycelium that produce newly asexual conidia from reproductive cells (conidiogenous cells) through three types of conidiogenesis, including *Cladosporium*-, *Rhinocladiella*-, and *Phialophora*-type [4, 24]. These fungal

forms as hyphae, conidia and conidiogenous cells are normally prevalent in young agar and broth cultures. Experimental *in vivo* studies with different fungal forms will further our understanding of both the mechanisms employed by parasitic cells to develop chronic disease and the immune and pathological aspects of CBM.

The aims of this study were to show the importance of different fungal forms in murine infection, evaluate the morphological changes that occurred in *F. pedrosoi* cells post-infection, and identify the main host cells at the infection site that were involved in fungal control.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Five groups of 40 BALB/c male mice, each weighing about 23 g (6 to 8 weeks old), were used in this study. The animals were purchased from the Centre of Development for Experimental Models to Medicine and Biology of the Federal University of Sao Paulo (CEDEME/UNIFESP, Sao Paulo, Brazil). The animal protocol was approved by the UNIFESP Ethics Committee under project number 0808/05. All experimental procedures were conducted in accordance with standard guidelines on the use and care of laboratory animals [25-27].

### Microorganism

The *F. pedrosoi* strain (EPM – 380/03) was obtained from a patient with CBM who was examined in the Dermatology Outpatient Department, UNIFESP, in 2003. The culture was cultivated on Sabouraud dextrose agar (SDA, DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 80 mg/L gentamycin at a temperature of 28°C, with periodic transfers at 15-day intervals into SDA with antibiotics. To enhance fungal virulence and to adapt the human isolate to an animal host, the *F. pedrosoi*-strain was reinoculated three times into animals by an intraperitoneal route at concentrations of  $1 \times 10^8$  cells/mL and recovered 12 days later in Mycosel™ agar (BD BBL, Franklin Lakes, NJ, USA) [14].

## Mycelium-forms from pure cultures

### Conidia

Conidia were obtained from 15-day cultures grown at a temperature of 30°C in SDA, by the addition of phosphate-buffered saline (PBS) to the Petri dishes and scraping of the reproductive mycelia with a disposable sterilized loop. The saline solution was then immediately recovered in sterilized Falcon tubes, filtered twice through a 3 µm quantitative filter paper (Grade n°. 44, Whatman) and centrifuged at 3000 g and 4°C for 10 min. Pyriform conidia with a homogenous morphology were recovered (Fig. 1-A).

### Hyphae

Thirty-day cultures of mycelia in Sabouraud dextrose broth (SDB, DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) at 28°C, supplemented with gentamycin, pH 5.7, were shaken three times in a vortex and filtered through sterile gauze to retain hyphal mats and long filaments [28]. Filtrates were repeatedly dispensed into a 50 mL glass needle and injected into a sterile beaker to disrupt the small clusters of mycelia into solitary hyphae. The suspension was filtered through 11 µm filter paper (Grade n°. 1, Whatman) to conidiogenous cells and conidia exclusion. Hyphae that adhered to the paper were immersed in Falcon tubes with sterilized PBS and vortexed. Then, fungal filaments were centrifugated at 1500 g and 4°C for 5 min and harvested twice in PBS (Fig. 1-B).

### Conidiogenous cells and conidia (CCC)

Cultures of *F. pedrosoi* were incubated in 300 mL potato dextrose broth (PDB, DIFCO laboratories), pH 5.7, at 35°C for 30 days in cylindrical 1 L glass bottles (KIMAX® GL-45, DAIGGER Lab Equipments and Supplies) at 100 rpm on a gyrating shaker. These cultures were then filtered twice through 11 µm quantitative filter paper (Grade n°. 1, Whatman), and the CCC were recovered by centrifugation of the filtrate at 3000 g and 4°C for 10 min. The conidiogenous cells were observed by optical microscopy as yeast-like forms (Fig. 1-C). Many conidiogenous cells were naturally attached to conidia, making disruption impossible. For this, a cellular mix (CCC) obtained in broth culture was used for infection. These cells were likely disrupted from

mycelial *Cladosporium*-type structures during the growth period and propagated in a PDB broth culture.

### Inoculum

The fungal cells obtained were washed and concentrated three times in PBS by centrifugation, according to the procedures described for each fungal form. Inoculum viability was determined by LIVE/DEAD ® Cell Vitality Assay Kit (L34951, Invitrogen, [probes.invitrogen.com/media/pis/mp34951.pdf](http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp34951.pdf)) in fluorescent microscopy. The viability of inocula suspensions generally was more than 98% of total cells. The inocula volumes were adjusted to a final concentration of  $1 \times 10^6$  fungal cells in Neubauer chambers. The separation between septa was used to distinguish individual hyphal cells, which were then counted.

### Infection

Ten minutes prior to infection, animals were anesthetized intraperitoneally (i.p.) with 0.4  $\mu$ L of Anasedan i.p. and 0.35 mL of Dopalen per kg body weight (<http://www.vetbrands.com.br>). One group of mice was inoculated i.p. using a 25x8/21G1 needle with approximately 100  $\mu$ L of a suspension containing  $1 \times 10^6$  hyphal fragments. Fifty (50)  $\mu$ L of *F. pedrosoi* conidia suspensions were immediately inoculated i.p. into one group of mice. One animal group was infected with CCC using the same inoculum concentration and route. In other two groups, CCC inocula were inoculated subcutaneously (s.c.) into the footpad or abdomen. Footpad swelling was monitored weekly for up to a maximum of 165 days using a Mitutoyo digital caliper (<http://www.mitutoyo.com>). Footpad volume was calculated by height and width measurements using an arithmetic cylinder formula. The data are given as mean  $\pm$  SE, and significant differences were determined by the Student's *t*-test (Prism software, <http://www.prism-software.com>). A 50- $\mu$ L volume of PBS was administered to each of five mice, which served as negative controls. The kinetics of the disease were followed at weekly intervals for two months, and four animals from each group were sacrificed weekly. Samples of the infected tissue specimens were cultivated in SDA.

## Histopathology

Fragments of fresh tissue samples were clarified in 20% KOH and Parker ink for direct optical microscopic observation. Tissue specimens were incubated in 10% formalin for over 12 hours. Bone tissue from the foot was decalcified with 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) [24]. The specimens were embedded in paraffin, and serial 3- to 5- $\mu$ m sections from the blocks were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS) [12].

## RESULTS

### Infection with conidia

In general, all animal groups formed inflammatory nodules after the fourth day pos-infection. In group inoculated i.p. with conidia, we observed small nodular lesions in the abdomen. Germinative tubes (Short, thin hyphae originated from conidia germination) and conidia were observed in tissue samples, and these were easily destroyed inside giant cells and foamy macrophages in the first to second week of infection (Fig. 2). In histological sections, the abscess had a high number of foamy macrophages and low migration of PMNs. Mice inoculated with conidia recovered faster than the other experimental groups and lesions generally healed within two to three weeks. Clinical and mycological cures in animals inoculated with conidia occurred before or during the fourth week of infection.

### Infection with hyphae

While there was a small reaction in the animals inoculated with conidia, we observed a very intense inflammatory response in mice inoculated with hyphae. A large and spherical encapsulated abscess was formed at the infection site (Fig. 3, A and B). Internally, the abscesses contained a rich area of neutrophils surrounded by foamy macrophages (Fig. 3, C, D and E). Degeneration of the neutrophils was observed adjacent to the center of the inflammatory process where there were dematiaceous hyphae (Fig. 3-F). In this region, there was little or no contact between hyphae and neutrophils observed in the histological sections until 15 days post-inoculation (Fig. 3-G). After three weeks post-infection, hyphae, as well as conidia, were unrecovered from

the fungal culture of the tissue. Hyphal debris was frequently observed intracellularly in foamy macrophages.

During this study, we initially think that many particles stained with hematoxylin had similar characteristics to artifacts or stain precipitation; but later, after several observations we noted that these particles in histological sections might be complexes of condensed nuclear material aggregated through neutrophil degranulation (Fig. 4). However, several cells in the lysis process were also found with decondensed chromatin.

### Infection with CCC

In a pilot study, we were able to observe fungal modifications after CCC inoculation in histological sections of the peritoneal site. We later reproduced these experiments and performed subcutaneous inoculations at sites as footpad or abdomen to verify whether the same histopathological characteristics could occur similar to single-site intraperitoneal infection. The group of mice that was inoculated subcutaneously showed efficient elimination of the fungus, in particular by transepitelial liberation of the abscess. Exudates containing fungal cells were secreted at the infected s.c. site where the needle had been introduced or by disruption of epithelial tissue by the fistulization process Conidia, germinative tubes and the beginning of conidiogenous cell transformation could be observed in the tissue after 12 days (Fig. 5); however, conidia were no longer detected in the tissue after 25 days.

The clinical presentation of footpads inoculated with CCC showed sequential characteristics (Fig. 6, Pictures A). The volume of the infected footpads increases until around 30 to 35 days post-infection (Fig. 6-C). Subsequently, ulcers appeared, and the production of fissures and exudates was observed, where these were linked to fungal elimination in tissue and decreased inflammation. Over the course of post-infection, the elongated conidiogenous cells generally transformed into oval or round forms; the cell wall became more rigid and thicker (Fig. 6, Pictures B). In Figure 6 (pictures B, 2 and 3), unmodified conidia are shown around transformed cells. In the abscesses, many sclerotic cells were present after 25 days, which by sequential observations probably originated from conidiogenous cells. By the fourth week, although sclerotic cells were present in the tissue of these animals, destruction of the fungus had occurred (Fig. 6, Picture B6). Lysis of many sclerotic cells as yeast-like forms frequently occurred in the

blastic region of conidial budding (Fig. 7). From the first to the third week, 3- to 5-mm hardened nodules were observed in mice infected i.p. with CCC.

In the early period of infection, the inflammatory response was linked to intense migration of mononuclear phagocytes to the infection site. In both animal groups inoculated i.p. or s.c. with CCC, a neutrophilic reaction with a necrotic center was observed, surrounded first by neutrophils and around the edge by macrophages with foamy-looking cytoplasm (Fig. 8). In the central region of the infection, a large number of neutrophils and the absence of sclerotic cells or injured fungal bodies (Fig. 8-D) were observed. In the periphery, meanwhile, there were many foamy macrophages, and the fungal cells were unaffected (Fig. 8, B and C). Clinical and mycological cure of the footpad and peritoneal cavity were generally observed 35 days after infection. Metastasis of sclerotic cells to the viscera – in particular to the liver, spleen and pancreas – was sometimes seen in animals inoculated intraperitoneally. Macroscopic black dots or infectious cells were not observed in the lungs, brain, heart or striated skeletal muscle.

## DISCUSSION

CBM is a chronic human infection found in residents of (or frequent visitors to) rural areas and is commonly associated with occupational accidents [1, 3]. The disease occurs in tropical and subtropical regions, with *F. pedrosoi* being prevalent in humid areas, and *C. carrionii* in arid regions [11, 18]. Curiously, many individuals have been exposed to dematiaceous fungi-contaminated fomites or vehicles by traumatic process, but few infected people develop the illness [9, 11]. There are few reports describing the disease experimentally. Animals such as mice, pigeons, rats, dogs, goats, guinea pigs and monkeys have been infected experimentally in various studies, typically without successfully reproducing a condition anatomically and pathologically similar to the human mycosis [6, 8-10, 29, 30]. This may indicate that humans and animals have a natural resistance to this infection and that susceptibility may depend on specific mechanisms involved in the host/parasite interaction.

Although the chronic disease was not reproduced in our work, we were able to observe the profile of animal responses to each of the different fungal forms that were inoculated. Others reports have shown the results of experimental infections with a mixture of cells without cellular separation or with only conidia produced *in vitro* [6-8].

One aim of our research, therefore, was to verify the infection process with different forms. The recovery of viable fungus from several inoculation-sites of mice infected with *F. pedrosoi* was verified until 16 days post-inoculation in response to infection with hyphae and conidia. In the course of infection, many conidiogenous cells changed structurally, with the cell walls becoming thicker (Fig. 5 and 6) and the pigmentation and secretion of melanin being increased. The presence of melanin in fungi is considered an important virulence factor for several reasons, including the fact that melanin leads to stiffening of the cell wall and plays a role in anti-phagocytosis [31, 32]. Sclerotic cells obtained *in vivo* from primarily conidiogenous cells were more resistant to host responses, as they were observed and recovered until 30 days post-inoculation. Changes in sclerotic cells were linked to the greatest survival of the fungus in the tissue when compared to the other fungal forms studied. Thus, morphological changes probably play an important role in the survival of fungi in the host under stressful conditions, allowing for the possibility that reproductive, differentiated, or resistant fungal cells (but not vegetative mycelia or ungerminated conidia) following infection may be associated with establishment of the disease.

In this investigation, unlike hyphae and conidia, sclerotic cells were able to propagate, particularly in connective and adipose tissues. These cells likely secrete a virulence factor that allows them to invade tissues or avoid the immune response. Higher *in vitro* levels of ectophosphatases were detected in sclerotic cells compared to other cells [33]. *F. pedrosoi* exoenzymes have been implicated in the breakdown of extracellular matrix [34]; thus, greater expression of certain virulence factors may be yet another event related to parasitic propagation in adjacent tissues. With regard to the lack of host immunity, the metastasis of sclerotic cells was observed in an experimental CBM model with a deficient immune cellular response [6]. Therefore, although CBM is generally considered to be morbid and localized with limited dissemination, it can spread during the course of disease as a result of a number of factors related to fungal forms and host immunity.

In general, animals inoculated at a single site experienced initial inflammatory effects such as the production of abscesses and/or exudates, which were followed by subsequent regression and resolution of the *F. pedrosoi* infection [8, 30, 35, 36]. A persistent infection was obtained after fungal inoculation at various peritoneal sites [14, 15]. In agreement with other observations [6, 8, 36, 37], we now report the formation

neutrophilic abscesses following *F. pedrosoi*-infection at a single site. Still, animal tissue reactions were distinct for each fungal form. Particles of dead conidia could primarily be seen in the cytoplasm of foamy macrophages (Fig. 2); however, activated macrophages are not very active against *F. pedrosoi* *in vitro* [38]. Animals deficient in macrophage function (bg/bg) demonstrated resistance to infection [6], indicating that other cells were responsible for infection control. Neutrophils have been associated with innate resistance to fungi [39, 40], and the migration of PMNs to the *F. pedrosoi* inoculation site may be linked to resistance to infection [6, 35, 36]. Frequently, sclerotic cells were absent or destroyed in the neutrophilic center of the abscess but not in the foamy macrophage-rich region (Fig. 8). We also observed that the region at which the inoculated hyphae were found coincided with the necrotic center of the abscess, which was surrounded by neutrophils (Fig. 3). The neutrophils were reported to have fungicidal action *in vitro* and limited phagocytic ability against *F. pedrosoi* [38]. In contrast to the reported phagocytosis of the fungus by PMNs [35], we found that fungal elimination *in vivo* could be the result of tissue infiltration by PMNs with the release of neutrophilic molecules with anti-fungal activity following cellular breakage. It is possible that the PMN cellular contact with fungal antigens *in vivo* provoked neutrophil degranulation, and the subsequent extracellular release of complexes could have led to a hostile tissue environment with an extremely powerful impact on *F. pedrosoi* hyphae. Macrophages can cause neutrophils to die through cellular contact [41], and the death of neutrophils can lead to the release of complement proteins and oxidative enzymes, in addition to the activation of phagocytes for subsequent clearance [42, 43]. Recently, antimicrobial complexes that efficiently bind and kill microorganisms were described as neutrophil extracellular traps (NETs). These NETs are released following neutrophil degranulation [44]. In our study, one explanation for the fungal killing *in vivo* may be due to the cellular discharge of these molecules at inflammatory sites, as suggested in Figure 4. Neutrophils have limited fungicidal properties during the initial stage of the disease, but lysis of fungal cells occurred several days post-infection [43]. This delayed response may not necessarily depend on the local presence of T cells, since an extremely small number of lymphocytes were observed at the infection site in mice inoculated with hyphae. Therefore, PMN recognition of fungal antigens is plausible, in addition to the cellular apoptosis provoked following cellular contact with microbial molecules. Systemically, however, lymphocytes may have an important role in disease

control [35, 45]. Athymic mice, for example, were highly susceptible to *F. pedrosoi* infection. In these animals, disease regression occurred after adoptive transfer of lymphocytes [6]. In chronic human disease, histopathological sections show hyperkeratotic pseudoepitheliomatous hyperplasia with microabscesses rich in PMNs sometimes found near the epithelial tissue [11]. Hence, although these cells are normally present at the human infection site, neutrophilic activity may be suppressed by humoral and/or cellular factors in a manner similar to that involved during infection by *Aspergillus fumigatus* [46].

Finally, the survival of *F. pedrosoi* in tissue and the establishment of disease may be closely related to infection with specific fungal forms or cells that are pre-adapted to parasitism, especially given that cellular transformation of conidiogenous cells to the sclerotic body *in vivo* was insufficient to generate a chronic experimental infection. The effective local immune response, which provided murine protection against *F. pedrosoi* fungal cells, may be associated with delayed microbicidal activity of neutrophilic molecules released by PMNs following degranulation and macrophage clearance.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank the editors of American Journal Experts (AJE) for English language suggestions and corrections.

#### REFERENCES

- 1 Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2009; **47**: 3-15.
- 2 Lopez Martinez R, Mendez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2007; **25**: 188-94.
- 3 Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis* 2006; **19**: 148-52.
- 4 Santos AL, Palmeira VF, Rozental S, et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev* 2007; **31**: 570-91.

- 5 Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2007; **25**: 188-94.
- 6 Ahrens J, Graybill JR, Abishaw A, Tio FO, Rinaldi MG. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989; **40**: 651-8.
- 7 Polak A. Experimental infection of mice by *Fonsecaea pedrosoi* and *Wangiella dermatitidis*. *Sabouraudia* 1984; **22**: 167-9.
- 8 Kurita N. Cell-mediated immune responses in mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia* 1979; **68**: 9-15.
- 9 Kurup PV. Pathogenicity of *Phialophora pedrosoi*. *Mykosen* 1971; **14**: 41-4.
- 10 Al-Doory Y. *Crhomoblastomycosis*. Montana: Mountain Press Publishing Company 1972.
- 11 Esterre P, Richard-Blum S. Chromoblastomycosis: new concepts in physiopathology and treatment. *J Mycol Med* 2002; **12**: 21-4.
- 12 Al-Doory Y. *Chromomycosis*: Mountain Press Publishing Company, 1972.
- 13 Nishimura K, Miyaji M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection *Mycopathologia* 1981; **76**: 155-66.
- 14 Cardona-Castro N, Agudelo-Florez P. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Med Mycol* 1999; **37**: 81-3.
- 15 Cardona-Castro N, Agudelo-Florez P, Restrepo-Molina R. Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; **91**: 779-84.
- 16 Xie Z, Zhang J, Xi L, et al. A chronic chromoblastomycosis model by *Fonsecaea monophora* in Wistar rat. *Med Mycol* 2009: 1-6.
- 17 Corbellini VA, Scroferneker ML, Carissimi M, Santolin LD. Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grown in different culture media. *Mycopathologia* 2006; **162**: 51-5.
- 18 De Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol* 2000; **38 Suppl 1**: 243-50.
- 19 Mendoza L, Karuppayil SM, Szaniszlo PJ. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses* 1993; **36**: 157-64.
- 20 Hayakawa M, Ghosn EE, da Gloria Teixeria de Sousa M, Ferreira KS, Almeida SR. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by

macrophages in the presence of dematiaceous fungi that cause chromoblastomycosis. *Scand J Immunol* 2006; **64**: 382-7.

21 da Silva JP, da Silva MB, Salgado UI, Diniz JA, Rozental S, Salgado CG. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; **50**: 104-11.

22 Feldmesser M. Role of neutrophils in invasive aspergillosis. *Infect Immun* 2006; **74**: 6514-6.

23 Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 197-223.

24 Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. São Paulo: Sarvier, 2002.

25 CCAC. Guide to the care and use of experimental animals, 1993. [http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals\\_GDL.pdf](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals_GDL.pdf)

26 CGUANBR. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research 2003. [http://grants.nih.gov/grants/olaw/National\\_Academies\\_Guidelines\\_for\\_Use\\_and\\_Care.pdf](http://grants.nih.gov/grants/olaw/National_Academies_Guidelines_for_Use_and_Care.pdf)

27 NACLAR. Guidelines on the care and use of animals for scientific purposes, 2004. [http://www.ava.gov.sg/NR/rdonlyres/C64255C0-3933-4EBC-B869-84621A9BF682/8338/Attach3\\_AnimalsforScientificPurposes.PDF](http://www.ava.gov.sg/NR/rdonlyres/C64255C0-3933-4EBC-B869-84621A9BF682/8338/Attach3_AnimalsforScientificPurposes.PDF)

28 Fernandez-Torres B, Inza I, Guarro J. Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3371-2.

29 Borelli D. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 1987; **9 Suppl 1**: S57-63.

30 Martinez EC, Rey Valeiron C, Yegres F, Reyes R. The goat: approach to an animal model in human chromomycosis. *Invest Clin* 2005; **46**: 131-8.

31 Gomez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis* 2003; **16**: 91-6.

32 Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 2003; **38**: 143-58.

33 Alviano DS, Kneipp LF, Lopes AH, et al. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res Microbiol* 2003; **154**: 689-95.

34 Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS, dos Santos AL. The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases

proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; **46**: 21-9.

35 Nishimura KaM, M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection *Mycopathologia* 1981; **76**: 155-66.

36 Gugnani HC, Obiefuna MN, Ikerionwu SE. Studies on pathogenic dematiaceous fungi, II. Pathogenicity of *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa* for laboratory mice. *Mykosen* 1986; **29**: 505-15.

37 Walsh TJ, Dixon DM, Polak A, Salkin IF. Comparative histopathology of *Dactylaria constricta*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Wangiella dermatitidis*, and *Xylohypha bantiana* in experimental phaeohyphomycosis of the central nervous system. *Mykosen* 1987; **30**: 215-25.

38 Rozental S, Alviano CS, de Souza W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. *J Med Vet Mycol* 1996; **34**: 323-30.

39 Clemons KV, Calich VL, Burger E, et al. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med Mycol* 2000; **38 Suppl 1**: 99-111.

40 Zelante T, Montagnoli C, Bozza S, et al. Manipulating immunity against *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2006; **44 Suppl**: 237-43.

41 Allenbach C, Zufferey C, Perez C, Launois P, Mueller C, Tacchini-Cottier F. Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. *J Immunol* 2006; **176**: 6656-64.

42 Nuutila J, Lilius EM. Distinction between bacterial and viral infections. *Curr Opin Infect Dis* 2007; **20**: 304-10.

43 Ribeiro-Gomes FL, Silva MT, Dosreis GA. Neutrophils, apoptosis and phagocytic clearance: an innate sequence of cellular responses regulating intramacrophagic parasite infections. *Parasitology* 2006; **132 Suppl**: S61-8.

44 Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; **176**: 231-41.

45 Sousa Mda G, Ghosn E, Almeida S. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol* 2006; **64**: 595-600.

46 Aguirre J, Hansberg W, Navarro R. Fungal responses to reactive oxygen species. *Med Mycol* 2006; **44 Suppl**: 101-7.

## **ANEXO 2**

Antibiosis and dark-pigments secretion of phytopathogenic and environmental fungal species after interaction *in vitro* with an environmental isolate identified as *Bacillus subtilis*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2009.

# Antibiosis and dark-pigments secretion of phytopathogenic and environmental fungal species after interaction *in vitro* with a *Bacillus subtilis* isolate

Alexandre Paulo Machado<sup>1,3</sup>, Viviane Karolina Vivi<sup>1</sup>, José Roberto Tavares<sup>2</sup>, Frederico José Gueiros Filho<sup>2</sup> and Olga Fischman<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Básicas em Saúde; Faculdade de Ciências Médicas; Universidade Federal de Mato Grosso; Av Fernando Corrêa s/n; Cuiabá – MT - Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica; Instituto de Química; Universidade de São Paulo; Av Prof. Lineu Prestes 748; São Paulo - SP - Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia; Universidade Federal de São Paulo; Rua Botucatu 862; São Paulo - SP - Brasil.

## ABSTRACT

In this work, we related different reactions *in vitro* between an environmental bacterial isolate and fungal species. The Gram-positive bacillus has terminal and subterminal endospores, presented metabolic characteristics of mesophilic and acidophilic growth, halotolerance, positive to nitrate reduction and enzyme production, as caseinase and catalase. The analysis of partial sequences containing 400 to 700 bases of the 16S ribosomal RNA gene has shown identity with the genus *Bacillus*. However, its identity as *Bacillus subtilis* was confirmed after analyses of the *rpoB*, *gyrA*, and 16S rRNA near-full-length sequences. Strong inhibitory activity of environmental microorganisms, such as *Penicillium* sp, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, and phytopathogens, such as *Colletotrichum* sp, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* and *F. oxysporum* f.sp *vasinfectum*, was shown on co-cultures with *B. subtilis* strain, particularly on Sabouraud dextrose agar (SDA) and DNase media. Red and red-ochre color pigments, probably phaeomelanins, were respectively secreted by *A. alternata* and *A. niger* after seven days of co-culture.

**Key-words:** *Bacillus subtilis*, phytopathogenic fungi, environmental fungi, microbial interaction

## INTRODUCTION

The genus *Bacillus* is widely diversified and spread throughout the world from many sources such as air, soil, water, and gastrointestinal tracts of animals and humans (Guo et al., 2006, Earl et al., 2007, Rintala et al., 2008). Many species are extremophiles, or tolerant to more strict conditions such as high alkalinity, acidity, salinity or temperature (Niehaus et al., 1999, Horikoshi, 2008). Endospore production by such bacilli may be resistant to desiccation, heat, UV light and organic solvents (Nicholson et al., 2000). In general, these microorganisms are saprobes and rarely pathogenic.

*Bacillus* spp have powerful biotechnological applications such as natural biocontrol of pests in agriculture, probiotics for human and animal microbiota regulation, and production of insecticides, antibiotics and enzymes (Niehaus et al., 1999, Guo et al., 2006, Whipps, 2001).

Antagonistic bacteria like *Bacillus* generally act by antibiosis (Arras and Arru, 1997). Antibiosis against phytopathogenic microorganisms has been frequently associated with secondary metabolites (Romero et al., 2007, Pryor et al., 2007, Keel and Défago, 1997). Co-cultures of filamentous fungi and *Bacillus* spp can lead to increased bacteriocins production (Abee et al., 1995, Cornea et al., 2003). The synthesis of these inhibitory substances have been described in different species, such as *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. polymixa*, *B. brevis*, *B. licheniformis* and *B. circulans* (Abee et al., 1995, Whipps, 2001, Stein, 2005).

Many misclassifications have been found in the phylum Firmicutes (Wang et al., 2007). De Clerck et al. (2004) reported that analysis of only the 16S rRNA gene was unsuitable for species or sub-species identification of the genus *Bacillus*, particularly of the *cereus* and *subtilis* group. Sequencing of other genes, such as *gyrA* and *rpoB*, was suggested to aid in molecular identification of the *subtilis* group because of the great homology

\* Author for correspondence: alepaulo@hotmail.com

among 16S rRNA sequences (Chun and Bae, 2000, Earl et al., 2007).

In this investigation, we present different interactions *in vitro* of environmental and phytopathogenic fungi with a Gram-positive bacillus isolated from soil. This bacterial specie was identified through their phenotypical profiles and molecular sequencing analyses.

## MATERIAL AND METHODS

### Microorganisms

Approximately 10 g of soil were randomly collected in the University Federal of Mato Grosso Campus, Cuiabá (Mato Grosso, Brazil). The samples were homogenized separately with 100 mL phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 in 200 mL glass beakers, filtered in a common paper filter, and decanted for two hours. Supernatants were diluted to concentrations of 1/10 and 1/100, plated on trypticase™ soy agar (TSA, Difco/BBL), pH 7.3, and incubated at 30° C for 1 week. Several fungi and bacterial colonies were observed in these cultures. However, only the bacteria that exhibited antifungal activity were selected for later studies against environmental fungi (*Penicillium* sp, *Aspergillus flavus*, *A. niger*) and phytopathogens (*Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f.sp *vasinfectum*, *Colletotrichum* sp.). All fungal species used in this study were previously cultivated on Sabouraud dextrose agar (SDA, Difco/BBL) supplemented with 80 mg/L gentamycin.

### Classical characterization

The preliminary identification of the bacteria was performed by macroscopic analysis of colonies and microscopic morphology, including endospore position and Gram stain. Biochemical tests were performed for citrate utilization; nitrate reduction; growth on mannitol and growth in 6.5 and 10% NaCl; production of H<sub>2</sub>S, indole, methyl red, Voges-Proskauer (VP); and hydrolysis of esculin (Foldes et al., 2000, Reva et al., 1995, Winn et al., 2006). Enzymatic tests were performed to detect production of amylase, ornithine-decarboxylase, oxidase, catalase, urease, lecithinase, DNase, lipase, caseinase and haemolysins (Winn et al., 2006, Sanchez-Porro et al., 2003). The growth of the bacterial strain on TSA and tryptic soy broth (TSB, Difco), pH 7.3, and SDA, pH 5.6, was observed at different temperatures (4°, 20°, 25°, 37°, 42°, and 55° C) over intervals of 24 and 48 hours.

### Co-cultures

Bacterial and fungal inocula were cultivated at a distance of 3 to 5 cm from each other on Petri plates containing TSA or SDA. Co-cultures were maintained at 28°C and were observed daily for one week. Antagonistic activity was verified by inhibition halo growth of fungal species (Cornea et al., 2003, Lisboa et al., 2006). Co-cultures of the bacterium and fungi species were also performed in DNase agar with 0.1 g/L toluidine blue (Difco/BBL), pH 7.3, using *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 as the positive control and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 as the negative control. DNase agar was used specifically for co-cultives because we saw previously that the zones with enzymatic activity in this medium coincided with a green fluorescent light ring around the bacterial colonies. Green fluorescent light was correlated with zones of fungal inhibition *in vitro* in the co-cultures. Furthermore, we wanted to investigate the relationship between nucleic acid hydrolysis and microbial antagonism. To verify whether the substances produced by the bacillus reacted with dye used in the DNase medium, co-cultures were performed on SDA Petri-plates supplemented with 0.1 g/L toluidine blue.

### Extraction and purification of genomic DNA

After 24 hours growth at 30° C on TSA, bacterial colonies were suspended in 400 µL of lysis buffer containing 50 µL of lysozyme and 25 µL of RNase, yielding final concentrations of approximately 1 mg/Eppendorf tube and 10 µg/mL, respectively. Eppendorf tubes were incubated at 37° C for 15 min with careful shaking. Then, 50 µL lauroylsarcosine 20% (Sigma Aldrich) was added to the lysates, which were kept on ice for 5 min to obtain a translucent material. Approximately 500 µL of phenol:chloroform (Sigma Aldrich) was added to the tubes. Genetic material was precipitated in 1 mL ethanol with 0.3 M NaOAc for 5 min at room temperature. The pellet was centrifuged and quickly washed with 70% ethanol, and resuspended in 100 µL TE buffer. Genomic preparations were quantified using a spectrophotometer at 260nm and samples were kept at -20° C until use.

### Amplification of 16S rRNA, rpoB and gyrA genes

The PCR-reactions were performed with the following universal primers: 16S rRNA (8bF, 5'-ACTGGGATCCACAGGAGTGCAAACGACG

A-3'; 518f, 5'- CCAGCAGCCGCGGTAAT-3'; 1406r, 5'-ACGGGCAGGTGTGTRC-3'; and 1512r, 5'- CTGAAGCTTACGGYTAGCTTGTACGAC TT-3'), gyrA (gyrA-f, 5'-CAGTCAGGAAATGC GTACGTCCTT-3' and gyrA-r, 5'-CAAGGTAA TGCTCCAGGCATTGCT-3'), and rpoB (*rpoB*-f, 5'-AGGTCAACTAGTTCAGTATGGAC-3' and *rpoB*-r, 5'-AAGAACCGTAACCGGCAACTT-3') (De Clerck et al., 2004). Each 50 µL PCR reaction mix contained 5 µL Taq buffer 10x, 3 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.4 µL dNTPs 25 mM, 0.5 µL Taq-polymerase 5 U/mL (all reagents from Fermentas), 1.25 µL primer 20 mM, 50 ng genomic DNA and 36.1 µL H<sub>2</sub>O milli-Q. A positive control reaction was directly performed from bacterial cells and PCR mix. The PCR reactions were performed in a BioRad thermal cycler (PTC 1148 MJ mini thermal cycler) using 35 cycles (1 min denaturing at 94° C, 1 min annealing at 48° C, 2 min extension at 72° C, and finally a 9 min extension at 72° C. The resulting amplicons were subjected to ultrapure 1% agarose gel electrophoresis (Invitrogen) using GeneRuler 1 kb DNA ladder (Life Sciences) as a molecular weight marker.

#### Sequencing of 16S rRNA, *rpoB*, and *gyrA* genes and sequence analyses.

Five PCR products from each amplified gene were extracted from agarose gel with QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN). Each 15 µL PCR reaction contained 100 ng purified DNA, 3 µL sequencing buffer 5X, 2 µL Big Dye, 10 pmol primers and H<sub>2</sub>O. Gene sequences were determined on an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The Bioedit program and ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)) were used to sequence alignments. Partial sequences were blasted in the bank databases, such as GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), EMBL ([www-db.embl.de](http://www-db.embl.de)), RDP II ([rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)), DDBJ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>).

#### Nucleotide sequencing accession numbers

Partial sequences of environmental bacillus strain were deposited in GenBank under accession numbers FJ025759 (*rpoB*), FJ025758 (*gyrA*), FJ025757 (16S rRNA).

## RESULTS

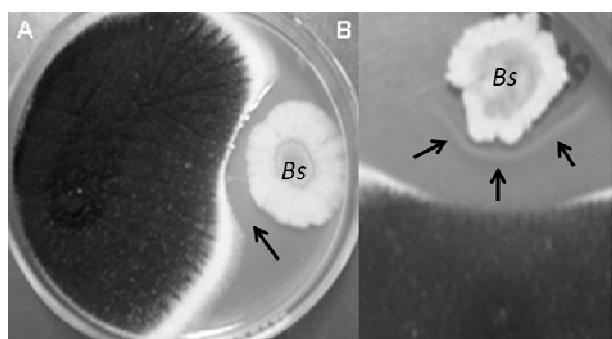
#### Classical and molecular classification

The Gram-positive bacillus presented terminal and subterminal endospores, growth at temperatures of 4 to 40° C, halotolerance and good growth on acid

media (SDA), pH 5.6. The reactions were positive for methyl red, Voges-Proskauer, motility, mannitol growth, nitrate utilization, as well as production of catalase, oxidase, caseinase, ornithine decarboxylase. The reactions were negative for citrate utilization, esculin growth, as well as production of amylase, urease, indole, lecithinase, lipase, hemolysins and gas. The 16S rRNA gene was amplified directly from bacterial cells or genomic DNA using primers 8bf and 1512r. Fragments of approximately 1.5kb were sequenced, and partial 5' and 3' sequences containing 400 to 700 bases were aligned and analyzed. These sequences demonstrated 100% identity to the *Bacillus* genus in all bank databases. However, a crossed identity of ribosomal genes over 95% was detected among species of *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* and *B. subtilis*. Subsequently, the primer 518f was used to amplify the central region of 16S gene. A near-full-length cDNA sequence of 16 S rRNA gene with approximately 1.437 nucleotides was produced after manual alignment of 3' and 5' sequences from the PCR-products generated with primers 8bf, 518f and 1512r. Other genes, such as *rpoB* and *gyrA*, were analyzed to confirm the species *B. subtilis*.

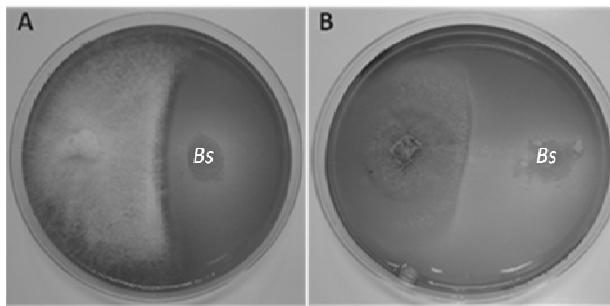
#### *In vitro* interactions

Antibioses of Gram-positive bacillus was observed in co-cultures against all fungal species, including environmental fungi such as *Penicillium* sp, *A. flavus*, *A. niger* (Figure 1A), and phytopathogens such as *A. alternata*, *F. solani*, *F. oxysporum* f.sp *vasinfectum* and *Colletotrichum* sp. Antifungal activity was more pronounced on SDA medium, suggesting increased synthesis of inhibitory substances in acid pH. In many instances, a line of precipitation was verified in co-cultures plates near the bacterial colony (Figure 1-B).



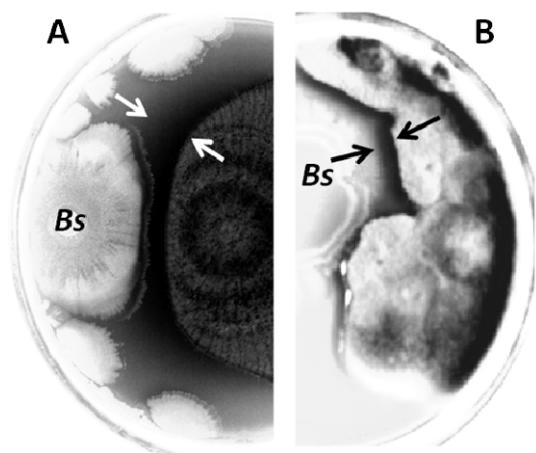
**Figure 1** – Co-cultures between environmental strains of *A. niger* and *B. subtilis* (Bs). A) Inhibition of the fungal colony on SDA medium. B) Precipitation line formed near the bacterial colony.

Green fluorescence was observed after exposure to ultraviolet light (UV), particularly in the inhibition zone. Inhibitory zones on DNase medium (Figure 2) containing toluidine-blue dye were initially light pink in color and then became yellow, whereas inhibitory zones on SDA medium with the same dye did not exhibit this pigmentation.



**Figure 2** – Inhibitory growth of phytopathogens on DNase medium and zone linked to the antifungal activity of *B. subtilis* (*Bs*). A) *F. oxysporum* B) *Colletotrichum* sp.

Diffusion of reddish-brown and red pigments, which were most likely phaeomelanin, on agar plates by fungal colonies of *A. niger* (Figure 3-A) and *A. alternata* (Figure 3-B) were observed after one week of co-culture with *B. subtilis*.



**Figure 3** – Reddish-brown and red pigments secreted by *Asp. niger* (A) and *A. alternata* (B) after one week of co-culture with *B. subtilis* (*Bs*).

## DISCUSSION

The identification of the *Bacillus* species is very difficult due to the high level of phenotypic variability, environmental diversity, and absence of

suitable qualitative methods. For this reason, molecular analyses have been advantageous tools in characterization of the *Bacillus* spp. The phylum Firmicutes presents high homology in gene targets for phylogenetic characterization, such as 16S and 23S rRNA (Earl et al., 2007, Wang et al., 2007, Bavykin et al., 2004). Several conserved proteins related to cellular transcription and replication, such as RNA polymerases and DNA gyrases, respectively, can also be used in gene sequencing and phylogeny (Earl et al., 2007, Chun and Bae, 2000). Although the genetic heterogeneity of these proteins could be interesting for molecular characterization, a high intra-specific homology on subunits  $\alpha$  or  $\beta$  may be found across *Bacillus* groups making this a poor marker for differentiation of species and subspecies. The recovery of partial (over 400 bp) and near-full-length sequences have resulted in more accurate molecular identification than short sequences (near 200 bp) (Wang et al., 2007). Similarity among aligned sequences should be  $\geq 99\%$  and the ideal is above 99.5%. In this investigation, we did not succeed in species-specific characterization after sequencing the 16S rRNA gene. Identity of 100% with sequences of *B. subtilis* available in the database banks was observed only after crossing the near-full-sequence of 16S rRNA gene and gene sequences of *gyrA* and *rpoB*.

Gram-positive bacilli are found in soil, acting as bioregulators, biocontrollers, and decompositors (Whipps, 2001, Araujo et al., 2005, Keel and Défago, 1997). Microbial interaction studies are very important in the discovery of antimicrobials, insecticides, and pro- and pre-biotics (Whipps, 2001, Guo et al., 2006, Stein, 2005). A variety of interactions, such as competition for nutrients or space, may be the cause of antagonistic reactions (Whipps, 1997, Keel and Défago, 1997). Antibiosis normally occurs via the release of substances that inhibit microbial growth (Whipps, 2001). The production of secondary metabolites by *Bacillus* spp, including antibiotics of low-molecular-weight and natural cyclic-peptides, has been related to the inhibition of many organisms, including fungal species (Stein, 2005, Romero et al., 2007). The bacterium studied has shown good antifungal activity to environmental fungi and phytopathogens, particularly by antibiosis. As expected, *B. subtilis* that presented biocidal effectors against fungi has been utilized as a biocontroller of phytopathogenic fungi (Broggini et al., 2005). Precipitation lines between *Bacillus* and fungi colonies have been reported (Cornea et al., 2003). These are most likely due to compounds

produced by the fungus that spreading on agar may be associated with inhibitory substances produced by the *Bacillus* sp.

Antagonism *in vitro* varies according to culture media, bacterial antagonist and fungal species (Walker et al., 1998). The pH might be crucial for inducing enzyme production by *Bacillus* spp from an intestinal source. In our research, a more pronounced inhibition of fungi occurred on the acid medium (SDA, pH = 5.6) compared to TSA, pH = 7.3. There are evidences that fungal inhibitory effects may be caused by enzymatic compounds (Cornea et al., 2003, Bizani and Brandelli, 2002, van der Wal et al., 1995). Active enzymes from *Bacillus* spp can damage fungal cellular walls (Barbosa-Corona et al., 1999, Mavingui and Heulin, 1994). Bacterial exochitinases and glucanases may have an important antagonist role against fungi (Dijksterhuis et al., 1999, Keel and Défago, 1997). Many Gram-positive bacteria are good producers of DNase exoenzymes (Sanchez-Porro et al., 2003). In this study, we observed a relationship between antifungal activity and DNA-hydrolysis zones, suggesting that the secreted inhibitory factors may be involved with DNases. However, future studies are needed to investigate this hypothesis.

In many instances, microbial resistance to hostile environment is directly associated with dark pigmented polymers (Henson et al., 1999, Jacobson, 2000). Melanized cells are more resistant to hydrolytic enzymes, oxidative radicals, high temperatures, antifungals, and host defenses (Nosanchuck and Casadevall, 2003, Henson et al., 1999). In this work, a striking secretion of melanin by melanogenic fungi after co-culture with *B. subtilis* was verified in agar plates, showing that fungi under stressful growth conditions can produce pigments that may give more protection against bacterial substances or may be the result the melanin pathway stimulation by secondary metabolites.

Biocontrollers have been proposed as safe methods due to their natural effects against phytopathogens, low operational cost, ease of growing, high resistance to environmental conditions, stability during the industrial process, and non-toxicity to life (Elad, 2003, Pryor et al., 2007, Whipps, 1997). The interactions of *Bacillus* spp with plants and soils have been linked to increases in vegetable biomass, elimination of pathogenic flora and more efficient fixation of nitrogen compounds (Whipps, 2001, Keel and Défago, 1997). These microorganisms may thus act as "phytoprobiotics". Regional utilization of biocontrols

may be more attractive and ecologically suitable than other available alternatives largely used in local agriculture pest control, such as chemical pesticides.

In this research, a natural antimicrobial action against environmental and phytopathogenic fungi was detected from an environmental bacterium isolate, indicating that this microorganism has the potential for biotechnological application as a biocontrol agent. However, more experimental assays are necessary because the fungal induction of melanogenesis process may be a factor related to increased resistance and virulence of many species.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work received the financial support of CNPq and FAPEMAT project number Nº. 002.138/2007.

## RESUMO

Na presente investigação, nosso objetivo principal foi relatar diferentes interações *in vitro* de um isolado bacteriano ambiental com espécies fúngicas. Através da identificação clássica, nós verificamos que o bacilo ambiental apresentava endósporos terminais e subterminais, características metabólicas de mesofilia, acidofilia, halotolerância, redução de nitrato e produção de enzimas, como caseinase e catalase. Análise de seqüências parciais do gene 16S RNAr contendo de 500 a 700 bases revelou identidade com gênero *Bacillus*. No entanto, a espécie *Bacillus subtilis* foi confirmada somente depois da análise de seqüências dos genes rpoB, gyrA, and 16S RNAr. Intensa atividade inibitória aos fungos ambientais, como *Penicillium* sp, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, e fitopatogênicos, como *Colletotrichum* sp, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* e *F. oxysporum* f.sp *vasinfectum*, foi observada em coculturas com a cepa bacteriana (*B. subtilis*), particularmente em ágar Sabouraud dextrose e ágar DNase. Pigmentos de cor avermelhada e vermelho-amarronzado, provavelmente feomelaninas, foram secretados respectivamente por colônias de *A. alternata* e *A. niger* depois de sete dias de cultivo.

## REFERENCES

- Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. (1995), Bacteriocins: modes of action and potentials in

- food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 169-85.
- Araujo, F. F., Henning, A. and Hungria, M. (2005), Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 1639-1645.
- Arras, G. and Arru, A. (1997), Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, **47**, 97-120.
- Barbosa-Corona, J. E., Contreras, J. C., Velazquez-Robledo, R., Bautista-Justo, M., Gomez, R. M., Cruz-Camarillo, R. and Ibarra, J. E. (1999), Selection of chitinolityc strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 1125-1129.
- Bavykin, S. G., Lysov, Y. P., Zakhariev, V., Kelly, J. J., Jackman, J., Stahl, D. A. and Cherni, A. (2004), Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3711-30.
- Bizani, D. and Brandelli, A. (2002), Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *J. Appl. Microbiol.*, **93**, 512-9.
- Broggini, G., Duffy, B., Holliger, E., Schärer, H., Gessler, C. and Patocchi, A. (2005), Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. *Eur. J. Plant Pathol.*, **111**, 93-100.
- Chun, J. and Bae, K. S. (2000), Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial gyrA gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **78**, 123-7.
- Cornea, C. P., Grebenisan, I., Mateescu, R., Vamanu, E. and Campeanu, G. (2003), Isolation and Characterization of New *Bacillus* spp. Strains-Useful as Biocontrol Agents of Plant Pathogens. *Rouman. Biotechnol. Lett.*, **8**, 1115-1122.
- De Clerck, E., Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J. and De Vos, P. (2004), Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3664-72.
- Dijksterhuis, J., Sanders, M., Gorris, L. G. and Smid, E. J. (1999), Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **86**, 13-21.
- Earl, A. M., Losick, R. and Kolter, R. (2007), *Bacillus subtilis* genome diversity. *J. Bacteriol.*, **189**, 1163-70.
- Elad, Y. (2003), Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. *Comm. Agricult. Appl. Biol. Sci.*, **68**, 17-24.
- Foldes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L. and Szigeti, J. (2000), Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **89**, 840-6.
- Guo, X., Li, D., Lu, W., Piao, X. and Chen, X. (2006), Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the *in vivo* effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**, 139-46.
- Henson, J. M., Butler, M. J. and Day, A. W. (1999), The dark side of the mycelium: Melanins of Phytopathogenic Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **37**, 447-471.
- Horikoshi, K. (2008), Past, present and future of extremophiles. *Extremophiles*, **12**, 1-2.
- Jacobson, E. S. (2000), Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 708-17.
- Keel, C., and Défago, G. (1997), Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact, pp. 27-46. In A. C. Gange and V. K. Brown (eds.), *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Blackwell Science, London.
- Mavingui, P. and Heulin, T. (1994), *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil. Biol. Biochem.*, **26**, 801-803.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. and Setlow, P. (2000), Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 548-72.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M. and Antranikian, G. (1999), Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 711-29.
- Nosanchuk, J. D. and Casadevall, A. (2003), The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.*, **5**, 203-23.
- Pryor, S. W., Siebert, K. J., Gibson, D. M., Gossett, J. M. and Walker, L. P. (2007), Modeling production of antifungal compounds and their role in biocontrol product inhibitory activity. *J. Agric. Food. Chem.*, **55**, 9530-6.
- Reva, O. N., Vyunitskaya, V. A., Reznik, S. R., Kozachko, I. A. and Smirnov, V. V. (1995), Antibiotic susceptibility as a taxonomic

- characteristic of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 409-11.
- Rintala, H., Pitkaranta, M., Toivola, M., Paulin, L. and Nevalainen, A. (2008), Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiol.*, **8**, 56.
- Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J. L., Davila, J. C. and Perez-Garcia, A. (2007), Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 969-76.
- Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E. and Ventosa, A. (2003), Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 295-300.
- Stein, T. (2005), *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, **56**, 845-57.
- van der Wal, F. J., Luirink, J. and Oudega, B. (1995), Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. *FEMS Microbiol. Rev.*, **17**, 381-99.
- Walker, R., Powell, A. A. and Seddon, B. (1998), *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 791-801.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. and Cole, J. R. (2007), Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5261-7.
- Whipps, J. M. (1997), Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Adv. Botan. Res.*, **26**, 1-134.
- Whipps, J. M. (2001), Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, **52**, 487-511.
- Winn, W. J., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G. and Schreckenberger, P. (2006), *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, pp1736.

## ABBREVIATIONS

SDA = Sabouraud dextrose agar, SDB = Sabouraud dextrose broth, PBS = phosphate buffered saline, PCR = Polymerase Chain Reaction, rpoB = RNA polymerase subunit B, gyrA = DNA gyrase subunit A, rRNA = ribosomal RNA.

## **ANEXO 3**

Peripheral tolerance caused by simultaneous stimuli at different sites in  
experimental murine infections with *Fonsecaea pedrosoi*.  
Submitted to Virulence.

**Peripheral tolerance caused by simultaneous stimuli at different sites in experimental murine infections with *Fonsecaea pedrosoi*.**

Alexandre Paulo Machado

Assistant Professor of Microbiology, Departamento de Ciências Básicas em Saúde,  
Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brasil.

Maria Regina Regis Silva

Adjunct Professor of Pathology, Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Olga Fischman

Adjunct Professor, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Correspondence:

Alexandre Paulo Machado

Laboratório de Microbiologia

Departamento de Ciências Básicas em Saúde

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade Federal de Mato Grosso

Avenida Fernando Corrêa, s/nº Coxipó

Cuiabá-MT

CEP 78060-900

Phone: +55 [65] 3615-8835

e-mail: alepaulo@ecb.epm.br, alepaulo@hotmail.com

Run title: **Peripheral tolerance caused by microbial co-stimulation**

## Abstract

In the present study, we studied peripheral tolerance following stimulation of two different sites in mice groups (BALB/c, Swiss, C57BL6) by inoculation of the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. Using this murine model of infection, we show that immune induction with antigens at more than one site leads to immune suppression in murine chromoblastomycosis (CBM). Footpad infection and simultaneous stimuli of the peritoneum or mucosal routes appears to cause persistent infection and fungal metastasis. Using mice knockouts (KO), we observed that co-stimuli caused progressive illness in CD8-KO animals and an effective immune response in the absence of IL-10. In Xid mice, co-stimulation provoked chronic infection, suggesting that B1 B-cells play an important role in control of fungal infection. Long persistence of fungal cells in Xid mice was linked to microbial adaptation for the parasitary life. The tissue response to infection was similar in all mouse groups co-stimulated that in anatomopathologic sections revealed multi-focal and granuloma-like lesions. In general, these mice showed resistant response at primary antigenic-site with an intense migration of polymorphonuclear leucocytes (PMNs), whereas the other distant site (footpad) showed signs of immunosuppression. The migration of PMNs to the secondary site (footpad) increases in later periods of infection and was associated with fungal elimination, especially after disappearance of the primary antigenic-focus. Our findings suggested that the inflammatory/immunosuppression mechanisms induced by antigenic co-stimulation to solve systemically the same problem acts coordinately by local distinctly responses.

Keywords: *Fonsecaea pedrosoi*, experimental chromoblastomycosis, peripheral tolerance

Abbreviations: CBM, chromoblastomycosis; SDA, Sabouraud dextrose agar; PMNs, polymorphonuclear leucocytes; H&E, hematoxylin-eosin; KO, knockout; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; MHC-II, major histocompatibility complex class II; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon; CD4, cluster of differentiation 4; CD8, cluster of differentiation 8; APC, antigen-presenting cell; Xid, X-linked immunodeficiency.

## Introduction

Since the beginning of the 20<sup>th</sup> century, host immunity linked to rejection of the same tumors at sites distant from the prior inoculated metastized tumor has attracted attention [1, 2]. Then, the phenomenon of microbial immunosuppression and its relation with host tolerance has been reviewed [3]. Mice infected on the footpad with *Mycobacterium lepraeumurium* and simultaneously challenged with the same heat-killing microorganism were found to be hyporesponsive to infection [4]. Surprisingly, host inter-specific microbial co-stimuli have been associated with down-modulation of the immune response to helminthic infections, as well as to vaccines commonly used worldwide [5-8]. This promiscuous immunity probably occurs because once the suppressive response is activated, it seems to be nonspecific [9]. More recently, however, a link between T suppressor cells and peripheral tolerance induced after *Leishmania major* inoculation at two sites has been described [10, 11].

Over the past 15 years, evidence has accumulated that suppressor cells such as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells (T regs) are important for peripheral tolerance and down-regulation of various immune responses [12, 13]. The production of tolerant cells may be beneficial to hosts and parasites [9, 14]. The immunosuppressive response provoked by these cells can, for instance, block the collateral tissue damage that results from excessive inflammation and can cause chronic or persistent infections, as well as the remain of the microbes in the host for an extended period that may cause of adaptions to a parasitic co-existence [15]. Control or regulation of the immune system to prevent or minimize the damage caused by reactivity to antigens or over-active immune responses to pathogens can be modulated either by immunosuppressive cellular contacts or by production of cytokines [9, 15]. Suppressive cells also produce interleukin-10 (IL-10), and exert strong anti-inflammatory effects [15, 16]. The severe human form of chromoblastomycosis (CBM) has been shown to correlate with high levels of IL-10, whereas low or moderate clinical manifestations correlate with lower production of IL-10 [17].

Local and systemic action of lymphocytes may have different features for CBM disease. *Fonsecaea pedrosoi* infection in athymic mice with higher susceptibility regressed following the adoptive transfer of lymphocytes [18], thus demonstrating the importance of these cells to fungal control. The absence of CD4 T cells has been reported as a factor that inhibits the ability of mice to defend against *F. pedrosoi* [19]. On the other hand, the significant migration of polymorphonuclear leucocytes (PMNs)

to the inoculation site may be linked with resistance to *F. pedrosoi* infection [18, 20, 21]. Macrophages may induce neutrophil apoptosis through membrane tumor necrosis factor (TNF) [22]. This apoptosis may lead to the release of complement proteins, microbicidal molecules, and oxidative enzymes, as well as the activation of phagocytes for subsequent clearance [23, 24].

The development of immune responses to antigens may depend on the interactions between reactive-T cells and B cells [25]. Despite the professional antigen-presenting macrophages and dendritic cells, mature B lymphocytes play a pivotal role in autoimmunity as antigen-presenting cells (APCs), as well as in cellular responses to self-antigens [26]. Furthermore, the possible presence of B-cells may also be important for the host “peripheral intolerant” response to non-self-antigens.

In general, animals inoculated at a single site with high parasitic burdens of *F. pedrosoi* cells have proven unsuitable as models of experimental CBM, especially because of the acute course of infections and efficient fungal elimination by the host response [20, 27-29]. However, the inoculation of CBM agents in different peritoneal sites in mice allows increased fungal persistence [30, 31]. Following the studies that showed increased host susceptibility to *F. pedrosoi*, we have become interested in understanding the elementary immune mechanisms involved in the induction of persistent mycosis through antigenic stimulation of multiple sites.

Despite many studies on peripheral tolerance to self- and non-self-antigens, many of the *in vitro* and *in vivo* mechanisms remain uncertain. Therefore, the main goal of the present study was to verify the outlines of murine immune response stimulated by the same microbial antigens at two sites, using different antigen-presenting routes, viable and unviable inocula, specific animal knockouts, and Xid mice (which are deficient in B1 B-cells).

## Materials and methods

### Mice

Lineages of 6- to 8-weeks-old mice weighing approximately 23 g were used throughout this study. The specific-pathogen-free animals were purchased from the Centre of Development for Experimental Models to Medicine and Biology (CEDEME/UNIFESP) and from the Biotery of Isogenic Mice of the Department of Immunology of Sao Paulo University (ICB/USP), Sao Paulo, Brazil. The protocol used

was approved by the UNIFESP Ethics Committee (project 0808/05). Twenty mice were used for each group. A lethal dose of two cycles of 300 rad was administered individually to one group of BALB/c mice because of the radiosensitivity of peritoneal B1 B-cells. All experimental procedures were conducted in accordance with standard guidelines on the use and care of laboratory animals [32-34].

### Microorganism

*Fonsecaea pedrosoi* strain EPM – 380/03, isolated from a patient with CBM examined in 2003 in the Dermatology Outpatient Department of Federal University of São Paulo (UNIFESP), was cultivated on Sabouraud dextrose agar (SDA, DIFCO Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 80 mg/L gentamicin at a temperature of 25 °C. The *F. pedrosoi* strain was subcultured every 15 days into SDA with gentamicin. To enhance fungal virulence, the *F. pedrosoi* was intraperitoneally reinoculated three times in animals at concentrations of  $1 \times 10^8$  cells/mL, and recovered 12 days later in Mycosel™ agar (BD BBL, Franklin Lakes, NJ, USA) [30].

### Inocula

Fungal cultures were incubated in 300 mL of potato dextrose broth (PDB, DIFCO Laboratories), supplemented with 80 mg/L gentamicin and 0.05 mg/mL chloramphenicol, pH 5.7, at 30 °C for 30 days in cylindrical 1-L glass bottles (KIMAX® GL-45, DAIGGER Lab Equipments and Supplies) at 100 rpm on a gyratory shaker. These cultures were then filtered twice on ordinary filter paper, and the cells were recovered by centrifuging the filtrate at 3000 g for 10 min. Conidia and yeast-like forms were the most abundant cell types based on light microscopy.

*F. pedrosoi* cells were washed and concentrated three times in phosphate-buffered saline (PBS). Inoculum viability was determined using Calcofluor white. The suspensions containing fungal forms were adjusted in PBS to concentrations of  $1 \times 10^6$  cells/mL in a Neubauer chamber.

### Mucosal antigenic and peritoneal stimulation

Fungal inocula were autoclaved in 50-mL Falcon tubes for 20 min at 121 °C. Approximately 50 µL of autoclaved inoculum containing dead cells were orally administered (v.o.) three times a week to BALB/c mice, and after the last dose of the week, the footpad was concomitantly infected subcutaneously (s.c.) with viable fungal

cells. Other BALB/c group was tracheotomized in order to allow injection of 50 µL of heat-killed inoculum into the pulmonary mucosa. The remaining groups were inoculated intraperitoneously (i.p.) with approximately 100 µL of heat-killed inoculum. Animal groups stimulated at two sites were immunized and subsequently infected, except for the ones previously treated v.o.

#### Infectious immune stimulation at one and two sites

Ten minutes prior to infection, animals were anesthetized i.p. with 0.4 µL of Anasedan and 0.35 mL of Dopalen per kg body weight (<http://www.vetbrands.com.br>). Three groups of mice (BALB/c, Swiss, C57BL/6) were infected s.c. on the plantar side with 50 µL of viable inoculum. Another three groups of the same lineages were infected with viable inocula on the footpad and peritoneum. After observation of distinct host reactions among the BALB/c mice infected at one and two sites, we performed i.p. stimulation of the double-stimuli (two-site stimulation) group with 100 µL of heat-killed fungal cells, and subsequently footpad infection s.c. with 50 µL of viable inoculum.

In this study, we also aimed to analyze cellular responses *in vivo* following double stimulation (i.p. and s.c.). We used groups of animals with knockouts of CD4, CD8, TNF- $\alpha$ , IL-10, or MHC-II, as well as BALB/c mice deficient in B1 B-cells and mice that had been irradiated (see animal groups in “Mice”). A 50 µL volume of PBS was administered to five mice in each of the three lineage groups (BALB/c, Swiss, C57BL/6) to serve as negative controls. Swelling was monitored every week up to a maximum of 165 days using a Mitutoyo digital caliper (<http://www.mitutoyo.com>). Footpad volume was calculated based on height and width measurements and the mathematic formula for the volume of a cylinder. Results are expressed as mean ± SE. Based on normality data as defined by the omnibus normality test of D'Agostino and Pearson, significant differences were determined using Student's *t*, Friedman, and ANOVA tests (Prism software, <http://www.prism-software.com>). Three animals from each group were sacrificed and organs were removed weekly from groups infected unifocally, or monthly from mice inoculated at two sites. A portion of each specimen of infected tissue was cultivated on SDA at 37 °C for 20 days. Tissue fragments of peritoneal abscesses and infected footpads were clarified with 20% KOH Parker ink for observation by direct microscopy.

#### Histopathology

Tissue specimens were left in 10% formalin for more than 12 hours, irrespective of whether they contained macroscopic black spots or not. Bone tissue from the feet was decalcified with 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) [35]. The specimens were embedded in paraffin, and serial sections with a thickness of 3-5 µm were stained with hematoxylin-eosin (H&E) [31].

## Results and Discussion

### One-site infection

Our previous studies demonstrated that mice infected with concentrated inocula of *F. pedrosoi* hyphae show an intense inflammatory response. However, the inflammatory response was less vigorous when similarly concentrated conidia inocula were used, indicating that different fungal forms trigger different host responses. At 15 days after inoculation, the site of infection on the footpad showed the presence of conidia; fungal budding-cells, which are oval or round forms with a more rigid and thicker cell wall; and small, thin hyphae probably resulting from conidia germination. Sclerotic-like forms were observed an average of 25 days after infection. In general, destruction of conidia and small hyphae occurred as early as during the second week [36]. The infected footpads showed an intense inflammatory response, which normally decreased starting 30 days after inoculation (Graph 1). Clinical and mycological cure of *F. pedrosoi* infection at one site commonly regressed after 35 days due to an intense inflammatory response that was linked to an abundant PMN migration to the abscess. Acute infections with CBM agents and the production of neutrophilic abscess or exudates after inoculation at a single site have been described [21, 29, 37, 38]. Recently, an antimicrobial complex termed the neutrophil extracellular trap (NET) has been reported that efficiently binds and kills microorganisms and is released after neutrophil degranulation [39]. In our previous study, we suggested that the fungal killing *in vivo* may be due to the cellular discharge of these complexes at sites of inflammation [36]. Thus, the intensity of neutrophil infiltration may be a factor associated to host resistance and it may interfere with the adaptive process in which fungal pathogens shift to parasitism.

### Co-stimuli

Inoculation of *Leishmania major* at two sites in BALB/c mice has been shown to induce the migration of regulatory T cells to one of the infection sites, resulting in

greater infection persistence than in animals inoculated at a single site [11]. Persistent *F. pedrosoi* infection occurs following fungal inoculation at various peritoneal sites [30]. Similarly, data in the present study show mice immune-stimulated at two sites (peritoneum and footpad) with viable *F. pedrosoi* cells developed persistent infection. Further experiments in this study have shown that this persistence arises when animals are inoculated with viable and nonviable cells respectively at the footpad (s.c.) and peritoneum (i.p.). Surprisingly, the increase of the footpad volume and fungal persistence in animals inoculated at two sites with viable and nonviable cells were similar to those in animals inoculated at two sites with only viable cells. This demonstrates that the presence of antigens at different sites can stimulate inflammatory reactions different from those triggered by unifocal stimuli (Graph 1), regardless of the cellular viability of the parasite. This result was observed in all groups, including outbred mice (Graph 2).

Thus, double-stimulated animals developed persistent infection. In addition, we observed different tissue responses in anatomopathologic sections of animals stimulated at one and two sites. Mice inoculated at a single site produced a neutrophil-rich abscess [36], while groups concomitantly stimulated at more than one site showed multiple focal lesions (granuloma-like) that were rich in histiocytes, especially on the footpad (Figure 1). We frequently observed a neutrophilic abscess with the characteristics of intense acute inflammation in peritoneal tissue from animals co-stimulated. The decrease in fungal cells (sclerotic bodies) of the multifocal lesions on the footpad correlated with an increase in neutrophil migration to these sites that begins primarily after the disappearance of the peritoneal abscess in the absence of antigen. This finding demonstrates that the development of an efficient inflammatory response at one infectious site (footpad) depends on the elimination of the antigenic stimulus at another site (peritoneum).

The lack of host immunity has been attributed to the metastasis of sclerotic cells in an experimental CBM model with a deficient immune cellular response [18]. Dissemination of sclerotic cells from the footpads to other sites, such as scrotum, liver, tail, spleen, pancreas, and viscera has frequently been observed in double-stimulated mice (Figure 2). Cellular response is the most important mechanism of defense against fungi, and it is mediated primarily by neutrophils [40, 41]. Compromising or suppressing their function therefore increases vulnerability to fungal infections [42].

Infectious tolerance caused by humoral or cellular factors may suppress neutrophilic activity by means similar in infections by *Aspergillus fumigatus* [43].

#### Co-stimulation of mucosa and footpad

The generation of systemic tolerance after oral antigen exposure is well established, and it generally requires high doses of antigen [48-50]. To test whether fungal stimulation at two sites well-recognized to be tolerant route can also cause an immunosuppressive response, we inoculated nonviable cells in oral or pulmonary mucosa before infecting the footpad. At that point, the concept of “super-infection” as inducer of a tolerant response seemed unclear because responses were similar in animals co-stimulated independently if the one primary-site were inoculated with viable or nonviable fungal cells. Indeed, intense inflammatory response and efficient fungal control have been shown to correlate with high inoculum concentrations in animals that received stimuli at one site [36]. In addition, we think that the inflammatory process at a sole site of *F. pedrosoi* infection reduces local immunosuppression. In our case, footpad swelling had become less intense and lesions only stabilized after two months of mice group that were immunized by v.o. prior to infection (Graph 3). This result suggests that antigenic co-stimulation can raise the probably periferical tolerance to *F. pedrosoi* infection, as evidenced in the present study by the lower inflammatory response at sites of secondary infection in mice that were pre-stimulated (v.o.) and that subsequently developed persistent infection. BALB/c mice concurrently stimulated via tracheal immunization and subcutaneously infected on the footpad showed swelling similar to that seen after unifocal infection in early periods of infection, but the double-stimulated animals subsequently showed persistent infection (Graph 4).

Such oral and pulmonary stimuli causing later persistent infection of the footpad, suggesting that antigenic induction of both mucosal routes can promoted a peripheral tolerant response to fungal-antigens. The tolerant response is more apparent in group previously treated v.o. with antigenic doses prior to infection than mice challenged i.t. In general, in both co-stimuli groups, the healing phase of the infectious process started after five months, in contrary of animal groups inoculated at single-site that healed often after two months. Histological characteristics were similar for mice intraperitoneally stimulated. The footpad lesions of mucosal-stimulated mice were also lessened during the increase in neutrophil migration to the infection site (footpad), as seen in the group challenged at the peritoneum after absence of antigen in primary focus. Thus, it is

possible that the immune response for controlling specific pathogens at multiple sites resolves the infection only one site at a time. The natural attempt of immune response to exhibit particular actions (sectoral) to eliminate one infectious foci at a time may be beneficial for the host as a whole. Indeed, necrosis of multiple sites or a strong inflammatory response at several sites would be extremely harmful to the host. The problem with peripheral tolerance is the length of time that the infection continues, which may allow the pathogen to adapt to the host by becoming parasitic. Nevertheless, although persistent infection was observed in the present study following co-stimulation, experimental chronic disease due to CBM agents probably also depends on pre-adapted virulent fungal forms that resist the host stress conditions, including neutrophil action. Thus, the chronic course of the disease may be a function of such factors as fungal forms and host immunity.

#### One- and two-site immune stimulation of KO mouse with deletions of CD4, CD8, IL-10, MHC-II, or TNF

We studied various KO mice to verify the insights described above concerning murine peripheral tolerance to *F. pedrosoi* infection. Although KO animals infected at one site were generally more susceptible to fungal infection than wild-type mice (Graphs 5- 9), the KO groups showed similar tissue reactions and cure route. However, the course of infection was different in the CD4 and CD8 KO mice receiving concomitant stimulation. For example, the CD4 KO mice showed significant footpad swelling soon after infection, and this regressed by 60 days in most cases (Graph 5). Various CD4 KO mice that were double-stimulated normally healed after 165 days. In contrast, CD8 KO mice presented larger necrotic lesions with progressive footpad swelling and no signs of healing (Graph 6).

Suppressed host immune response against chromoblastomycosis agents may be related to the induction of a specific population of T cells [44]. Thus, mice stimulated at two sites can display a late protective response in the absence of T CD4 receptors (healing after 165 days), whereas CD8 KO animals have severe, progressive infection, suggesting an increase of suppressor activity specific to *F. pedrosoi* antigens at secondary infectious foci in the absence of CD8 receptor. In histological sections, neutrophilic abscesses were seen on tissues from all animals infected at a single site (s.c.) and focal lesions rich in histiocytes in groups stimulated at two sites (i.p./s.c.). Induction of a suppressive response by T regulatory cells has been shown to be

dependent on MHC II [45, 46]. *Fonsecaea pedrosoi* is an extracellular parasite and its antigens are probably displayed by APCs, mainly through the MHC II route. Our results demonstrate that co-stimulation probably is caused independent of MHC II because MHC-II KO mice showed persistent infection (Graph 7). Although the *F. pedrosoi* antigens-processing may occurs by endocytic vesicles.

In a previous study, we showed that neutrophil degeneration *in vivo* may be involved in controlling *F. pedrosoi* cells [36]. Pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , may be associated with neutrophil apoptosis during inflammatory processes [22]. We also observed persistent infections in TNF KO animals stimulated at two sites (Graph 8). Furthermore, high levels of IL-10 have been detected after immune co-stimulations [11, 46]. IL-10 has been described as an important cytokine in persistent and chronic infections. In our investigation, independently of the number of inoculated sites and histopathological profiles, the IL-10 KO groups showed a similar ability to eliminate the fungal infection. This indicates that, in the absence of IL-10, infection does not persist, especially in co-stimulated mice. The finding that IL-10 KO animals co-stimulated did not have persistent infection (Graph 9), and that tissue reactions were similar to those of other groups of mice stimulated at two sites, indicates that these cytokines can play an important role in modulating suppressive immunity to experimental infection with *F. pedrosoi*.

Although many of our graphs do not indicate longer-term outcomes because of the previously mentioned limitation on footpad measurements, the mycological and clinical healing of KO groups that received two-site stimulation generally occurred after 165 days after infection. Exceptions were the CD8 KO group, which did not heal, and the IL-10 KO group, which healed similar to animals inoculated at one single site.

#### Infections of mice deficient in B1 B-cells and irradiated mice

The footpad lesions of Xid mice infected at a single site decreased similarly to the BALB/c infected-group (Graph 10). However, Xid mice stimulated at two sites (s.c. and i.p.) had chronic infections. After four months, these mice had disorganized, enlarged focal lesions with a great number of fungal cells, including small and thin hyphae (Figs. 3A and B). However, eight months after the infection, both lesions were small and encompassed, with a low number of sclerotic cells and without thin hyphae (Fig. 3C and D). Fungal elimination on the footpad in irradiated, double-stimulated BALB/c mice took longer than in the group inoculated at a single site (Graph 11). This

host response may be the result of the repopulation with peritoneal B1 B-cells. Thus, given multiple antigenic stimuli cause chronic infection in the absence of B1 B lymphocytes and in the presence of these cells the outcomes abrogated, it is possible that the B-cell population plays antagonistic roles in the suppressive response.

Finally, this model of “infectious tolerance” can be expanded to experiments with other fungal agents that are used to evoke persistent or chronic infection. However, microbial cells or potentially infective forms should be employed for experimental murine infections because these immunosuppressive tools are only auxiliary means to increase the chances of obtaining durable or persistent infections. The term “super-infection” has been used in several relates, even for infections at more than one site. We believe that this term should only be used when high parasite concentrations are administered at a single localized site, or occasionally for endogenous infections. However, when the hosts receive the same stimuli at multiple sites, the terms “multi-foci” or “multi-site infection” may be preferable. Another insight provided by this study is the possibility that APCs from different sites have different properties that contribute to immunosuppression in different ways by systemically-dependent and local-independently fashions.

Thus, our observations suggest that the antigenic co-stimuli cause induction of an integrated immune system with different local responses that depends systemically as whole to solve one problem multifocal. If this reasoning is accurate, the co-stimulation phenomenon involved in immunosuppressive responses may be an important tool to our understanding of peripheral tolerance.

#### Acknowledgements

This study was financially supported in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### References

- [1] E. Bashford, J. Murray, M. Haaland. Resistance and susceptibility to inoculated cancer In: Fund. ITS Rot Iot ICR (ed). London, England.: Taylor & Francis, 1908, pp359-97.
- [2] P. Ehrlich. *Collected Studies on Immunity*. London, England: J.Wiley & Sons, 1906.
- [3] J.H. Schwab. Suppression of the immune response by microorganisms. *Bacteriological Reviews* **39** (1975), 121-43.

- [4] Lefford MJ, Mackaness GB. Suppression of immunity to *Mycobacterium lepraeumurium* infection. *Infection and Immunity* **18** (1977), 363-9.
- [5] Borkow G, Bentwich Z. Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: role of hyporesponsiveness and anergy. *Clinical Microbiology Reviews* **17** (2004), 1012-30.
- [6] P.J. Cooper, I. Espinel, M. Wieseman, W. Paredes, M. Espinel, R.H. Guderian, T.B. Nutman. Human onchocerciasis and tetanus vaccination: impact on the postvaccination antitetanus antibody response. *Infection and Immunity* **67** (1999), 5951-7.
- [7] D. Elias, H. Akuffo, A. Pawlowski, M. Haile, T. Schon, S. Britton. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* **23** (2005), 1326-34.
- [8] G.R. Stewart, M. Boussinesq, T. Coulson, L. Elson, T. Nutman, J.E. Bradley. Onchocerciasis modulates the immune response to mycobacterial antigens. *Clinical and Experimental Immunology* **117** (1999), 517-23.
- [9] N. Cools, P. Ponsaerts, V.F. Van Tendeloo, Z.N. Berneman. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *Journal of Leukocyte Biology* **82** (2007), 1365-74.
- [10] Y. Belkaid, C. A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, D.L. Sacks. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature* **420** (2002), 502-7.
- [11] S. Mendez, S.K. Reckling, C.A. Piccirillo, D. Sacks, Y. Belkaid. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *The Journal of Experimental Medicine* **200** (2004), 201-10.
- [12] P.Y. Pan, J. Ozao, Z. Zhou, S.H. Chen. Advancements in immune tolerance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60** (2008), 91-105.
- [13] C.A. Piccirillo, E.M. Shevach. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Seminars in Immunology* **16** (2004), 81-8.
- [14] Y. Belkaid, B.T. Rouse. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature immunology* **6** (2005), 353-60.
- [15] A. O'Garra, P.L. Vieira, P. Vieira, A.E. Goldfeld. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *The Journal of Clinical Investigation* **114** (2004), 1372-8.
- [16] G. Trinchieri. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *The Journal of Experimental Medicine* **204** (2007), 239-43.
- [17] M.G. Sousa, C.M.P.S. Azevedo, R.C. Nascimento, E.E.B. Ghosn, K.L. Santiago, V. Noal, G.F. Bomfim, S.G. Marques, A.G. Gonçalves, D.W.C.L. Santos, S.R.

Almeida. *Fonsecaea pedrosoi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines in monocytes from patients with severe and mild forms of chromoblastomycosis. *Journal of Leukocyte Biology* **84** (2008), 864-70.

[18] J. Ahrens, J.R. Graybill, A. Abishawwl, F.O. Tio, M.G. Rinaldi. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **40** (1989), 651-8.

[19] M. Teixeira de Sousa, E. Ghosn, S. Almeida. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scandinavian Journal of Immunology* **64** (2006), 595-600.

[20] K. M. Nishimura. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection *Mycopathologia* **76** (1981), 155-66.

[21] H.C. Gugnani, M.N. Obiefuna, S.E. Ikerionwu. Studies on pathogenic dematiaceous fungi, II. Pathogenicity of *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa* for laboratory mice. *Mykosen* **29** (1986), 505-15.

[22] C. Allenbach, C. Zufferey, C. Perez, P. Launois, C. Mueller, F. Tacchini-Cottier. Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. *Journal of Immunology* **176** (2006), 6656-64.

[23] F.L. Ribeiro-Gomes, M.T. Silva, G.A. Dosreis. Neutrophils, apoptosis and phagocytic clearance: an innate sequence of cellular responses regulating intramacrophagic parasite infections. *Parasitology* **132 Suppl** (2006), S61-8.

[24] J. Nuutila, E.M. Lilius. Distinction between bacterial and viral infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* **20** (2007), 304-10.

[25] S. Yu, P.K. Maiti, M. Dyson, R. Jain, H. Braley-Mullen. B cell-deficient NOD.H-2h4 mice have CD4+CD25+ T regulatory cells that inhibit the development of spontaneous autoimmune thyroiditis. *The Journal of Experimental Medicine* **203** (2006), 349-58.

[26] A. Meyer-Bahlburg, D.J. Rawlings. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, **7** (2008), 313-6.

[27] Y. Al-Doory. *Chromoblastomycosis*. Montana: Mountain Press Publishing Company (1972).

[28] N. Kurita. Cell-mediated immune responses in mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia* **68** (1979), 9-15.

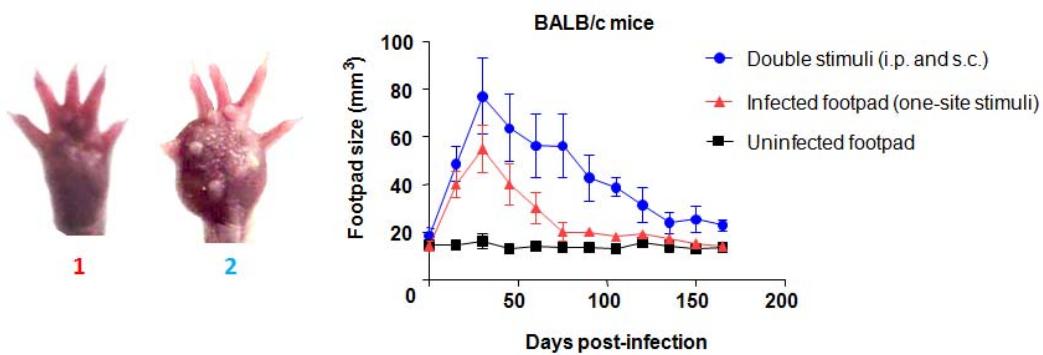
[29] P.V. Kurup. Pathogenicity of *Phialophora pedrosoi*. *Mykosen* **14** (1971) 41-4.

[30] N. Cardona-Castro, P. Agudelo-Florez. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Medical Mycology* **37** (1999), 81-3.

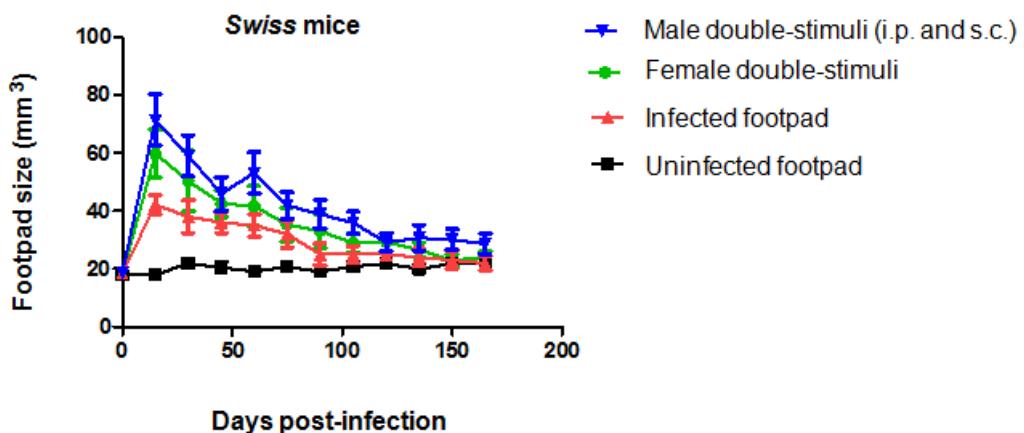
- [31] N. Cardona-Castro, P. Agudelo-Florez, R. Restrepo-Molina. Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **91** (1996), 779-84.
- [32] CCAC. *Guide to the care and use of experimental animals* (1993). [http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals\\_GDL.pdf](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals_GDL.pdf)
- [33] CGUANBR. *Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research* (2003). [http://grants.nih.gov/grants/olaw/National\\_Academies\\_Guidelines\\_for\\_Use\\_and\\_Care.pdf](http://grants.nih.gov/grants/olaw/National_Academies_Guidelines_for_Use_and_Care.pdf)
- [34] NACLR. *Guidelines on the care and use of animals for scientific purposes* (2004). [http://www.ava.gov.sg/NR/rdonlyres/C64255C0-3933-4EBC-B869-84621A9BF682/8338/Attach3\\_AnimalsforScientificPurposes.PDF](http://www.ava.gov.sg/NR/rdonlyres/C64255C0-3933-4EBC-B869-84621A9BF682/8338/Attach3_AnimalsforScientificPurposes.PDF)
- [35] W.T. Bourque, M. Gross, B.K. Hall. A histological processing technique that preserves the integrity of calcified tissues (bone, enamel), yolk amphibian embryos, and growth factor antigens in skeletal tissue. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **41** (1993), 1429-34.
- [36] A.P. Machado, M.R.R. Silva, O. Fischman. Local responses mediated by phagocytes after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and transformation in vivo of conidiogenous cells. *Micoses* (2008), "in press".
- [37] A. Polak. Experimental infection of mice by *Fonsecaea pedrosoi* and *Wangiella dermatitidis*. *Sabouraudia* **22** (1984), 167-9.
- [38] T.J. Walsh, D.M. Dixon, A. Polak, I.F. Salkin. Comparative histopathology of *Dactylaria constricta*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Wangiella dermatitidis*, and *Xylohypha bantiana* in experimental phaeohyphomycosis of the central nervous system. *Mykosen* **30** (1987), 215-25.
- [39] T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology* **176** (2007), 231-41.
- [40] J.W. Murphy. Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi. *Annual Review of Microbiology* **45** (1991), 509-38.
- [41] A.W. Segal. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* **23** (2005), 197-223.
- [42] E. Andres, J. Zimmer, S. Affenberger, L. Federici, M. Alt, F. Maloisel. Idiosyncratic drug-induced agranulocytosis: Update of an old disorder. *European Journal of Internal Medicine* **17** (2006), 529-35.
- [43] J. Aguirre, W. Hansberg, R. Navarro. Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology* **44 Suppl** (2006), 101-7.

- [44] P. Esterre, S. Richard-Blum. Chromoblastomycosis: new concepts in physiopathology and treatment. *Journal de Mycologie Medicale* **12** (2002), 21-4.
- [45] S. Ostman, M. Taube, E. Telemo. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* **116** (2005), 464-76.
- [46] I.J. Suffia, S.K. Reckling, C.A. Piccirillo, R.S. Goldszmid, Y. Belkaid. Infected site-restricted Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *The Journal of Experimental Medicine* **203** (2006), 777-88.

## Figures and Graphs



Graph 1 – Co-stimuli of footpad and peritoneum causing increase of footpad swelling and persistent infection in BALB/c mice. Footpads of mice were measured every 15 days for 165 days after inoculation with *F. pedrosoi*. Animals infected s.c. at the footpad with viable *F. pedrosoi* cells (triangles) generally present an infection plateau after 30 days and healing after 60 days post-infection, whereas lesions of mice co-stimulated by immunization i.p. with unviable cells and footpad-infection s.c. with fungus have a strong swelling and slower healing rate (circles). The control group of animals was treated with 50 µL of PBS (uninfected footpad, squares). Data are shown with mean and SE values, Student's *t* test P< 0.001. Left of the graph are shown images of footpads 30-day post-infection from mice stimulated at a single site (1) and at two sites (2).



Graph 2 – Co-stimulated Swiss male mice were more susceptible to fungal infection than both female double-immunostimulated and male mice infected at one site. Footpads of outbreed animals were infected s.c. and immunized i.p., respectively, with viable and unviable *F. pedrosoi*-cells. Mice stimulated at two sites present persistent infection, in contrast to those infected at one site. Data are shown with mean and SE values, ANOVA test, P < 0.05.

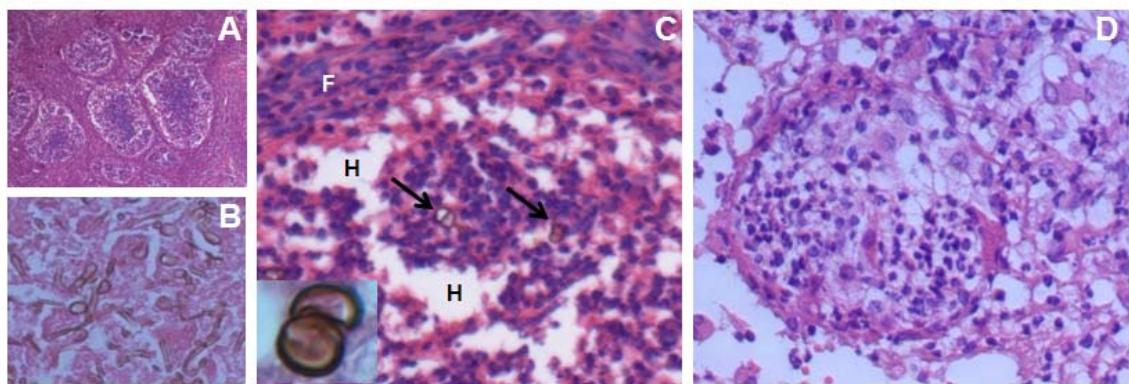
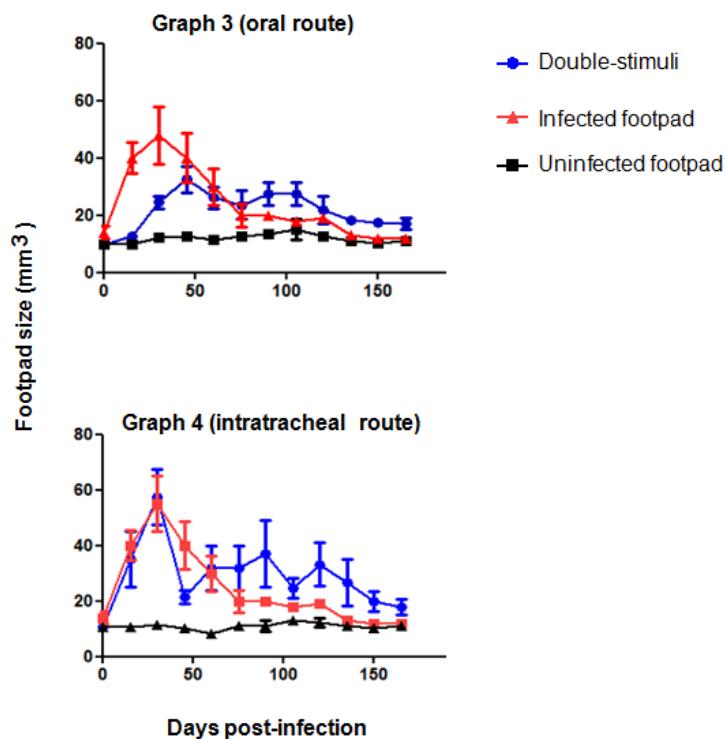


Figure 1- Common histopathological findings of footpad tissue from mice stimulated at two sites; H&E. Focal lesions that were granuloma-like (A, 40x) and rich in fungal cells (B, 400x) observed 30 days post-infection. C – After 60 days of infection, lesions presented low numbers of sclerotic-like cells (arrows; 200x and insert 1000x), rich in histiocytes<sup>(H)</sup> and organized focal lesions surrounded by fibroblasts<sup>(F)</sup>. D – 90 days post-infection, high numbers of neutrophils were verified in focal lesions without the presence of fungal cells.



Graphs 3 and 4 – Kinetics of footpads lesions from BALB/c mice that were infected with viable cells of *F. pedrosoi* and received oral (graph 3) or pulmonary (graph 4) mucosal stimuli with unviable fungal-cells. Oral route administration was approximately 50 µL of  $1 \times 10^6$  cells/mL heat-killed *F. pedrosoi*-cells three times weekly. The other group of mice received a single dose of the same cellular antigen injected in pulmonary mucosa after tracheostomy. Our data showed that the prior stimulation by the oral route can produce a lower early inflammatory response, whereas animals that were two-site stimulated at the same time (both footpad s.c. and pulmonary mucosa i.t.) have a similar response to mice infected at one site, with an intense swelling at approximately 30 days. Data are shown with mean and SE values, Student's *t* test was used to verify the significance between double-stimuli and footpad infection (one-site) data, *P* > 0.05.

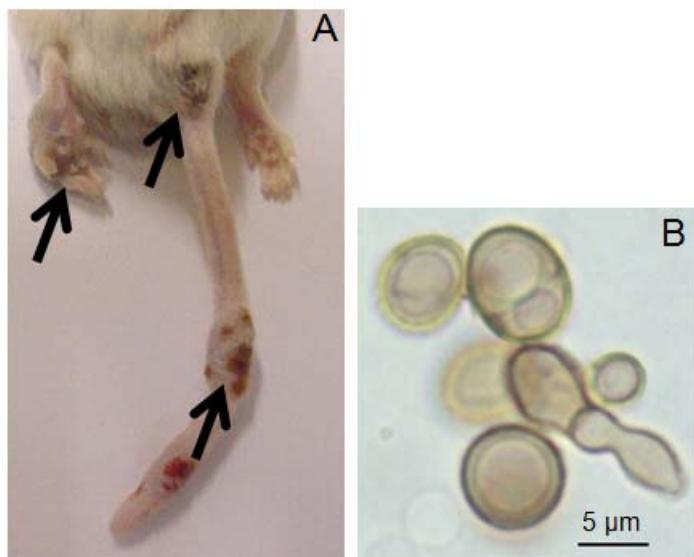
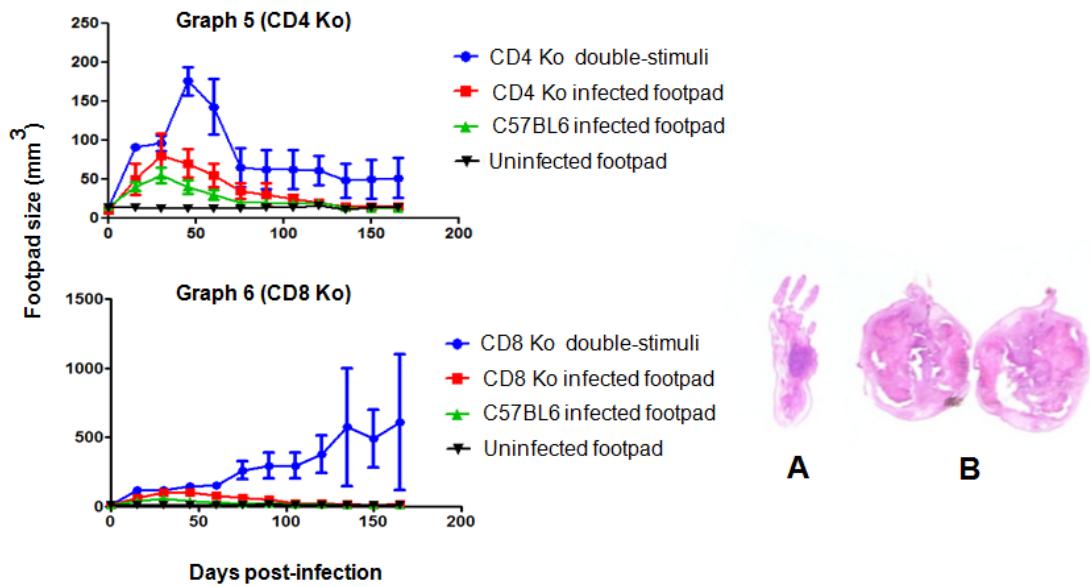
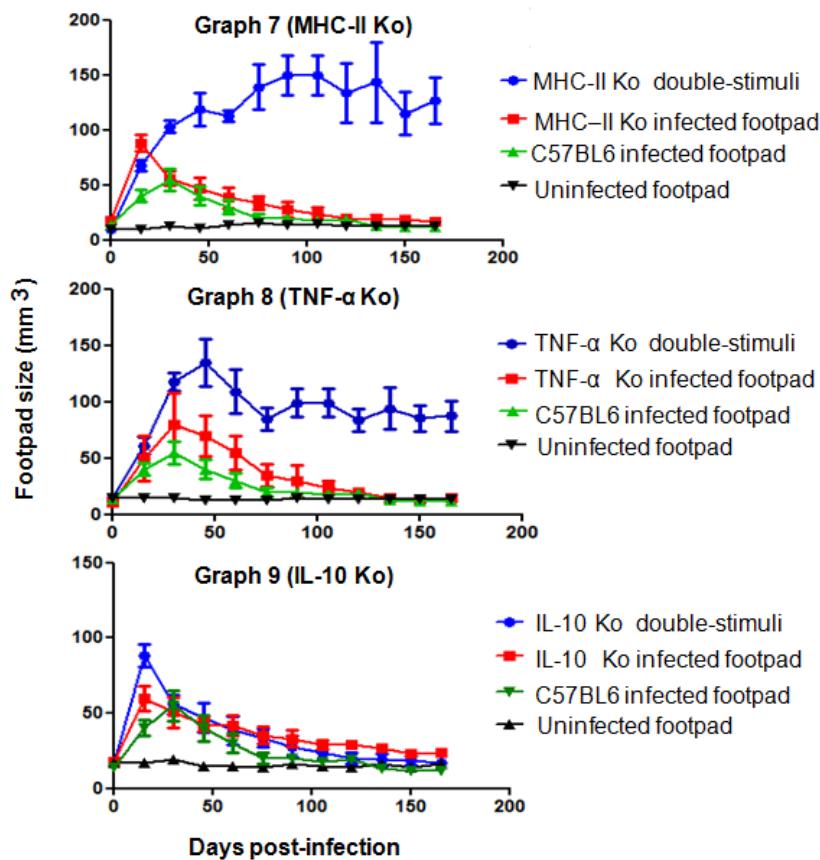


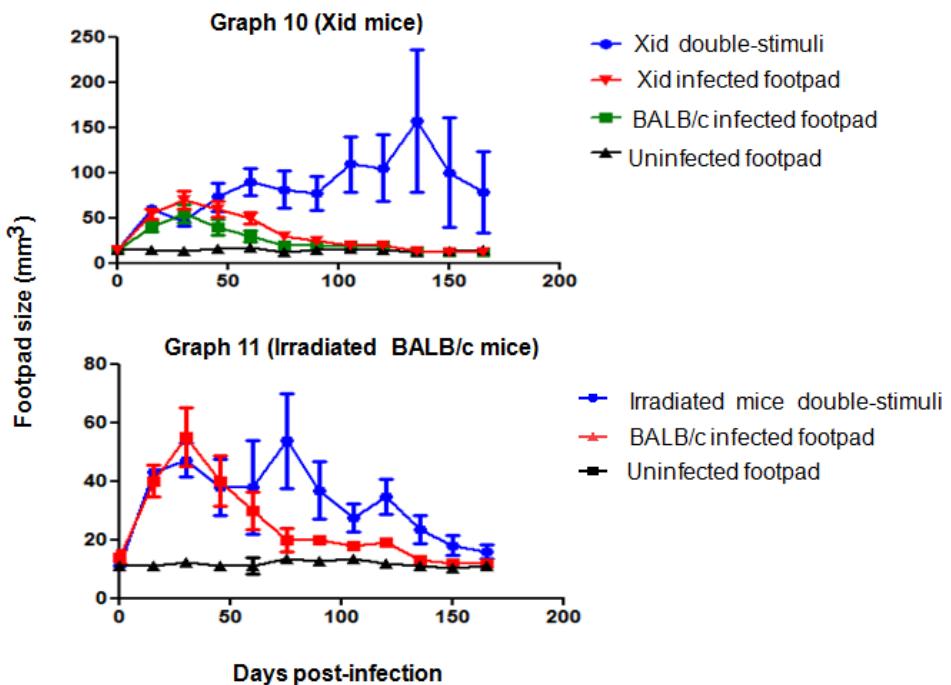
Figure 2 – Metastasis of sclerotic-like cells in animals stimulated at two sites. A – Mouse infected with *F. pedrosoi*-cells at footpad, which the animal received simultaneously immunization i.p. with heat-killed fungal-cells. B – Common morphology of sclerotic-like cells that migrated to other sites, 1000x. The metastases were frequently observed 20 to 40 days post-infection.



Graphs 5 and 6 - CD4 Ko and CD8 Ko mice that were footpad-infected with viable *F. pedrosoi*-cells and co-stimulated at i.p. site with heat-killed fungal-cells (double-stimuli). In early periods post-infection, increased swelling of footpads was observed in two animal groups. On the CD4 Ko group, the inflammation decreases after 60 days (Graph 5). However, CD8 Ko mice did not heal and showed a strong progressive enlargement of the footpad (Graph 6), suggesting that a non-CD8 lymphocytes population might be involved in immunosuppressive response exacerbation. Data are shown with mean and SE values, ANOVA test was used to data of graph 5 and 6,  $P < 0.05$ . In the right panel, pictures of histopathological sections from the footpad of a one-site infected CD8 Ko mouse at 60 days (A), and enlarged-footpads from CD8 Ko mice two-site stimulated, after 150 days (B).



Graphs 7, 8 and 9 – MHC-II, TNF- $\alpha$ , and IL-10 Ko mice group co-immunostimulated at two sites. All animals presented a progressive inflammatory process of footpads in early periods post-infection. However, double-stimulated MHC-II and TNF- $\alpha$  Ko groups developed an immunosuppressive response, and consequentially a persistent infection, whereas the IL-10 Ko mice groups healed after 60 days. Friedman tests were used for data from the MHC-II group,  $P = 0.0002$ , and the TNF- $\alpha$  group,  $P < 0.001$ ; and a one-way ANOVA test for the IL-10 group,  $P > 0.05$ .



Graphs 10 and 11 - Deficiency in B1 B-cells causes an increase of host susceptibility to *F. pedrosoi*-infection of mice co-stimulated by immunization at i.p. site with heat-killed fungal cells (double-stimuli). Xid mice immunostimulated at two sites present a chronic infection, showing that the absence of B1 B-cells may be linked to the uncontrollability of fungal illness after induction of an immunosuppressive response (Graph 10). Fungal control of irradiated animals after 90 days generally occurs post-infection, probably due to later peritoneal repopulation of B1 B-cells (Graph 11). Data are shown with mean and SE values. ANOVA was used for analyses of significance for Xid mice ( $P < 0.05$ ) and the Student's *t* test was used for the irradiated mice and BALB/c footpad infection data ( $P = 0.0304$ ).

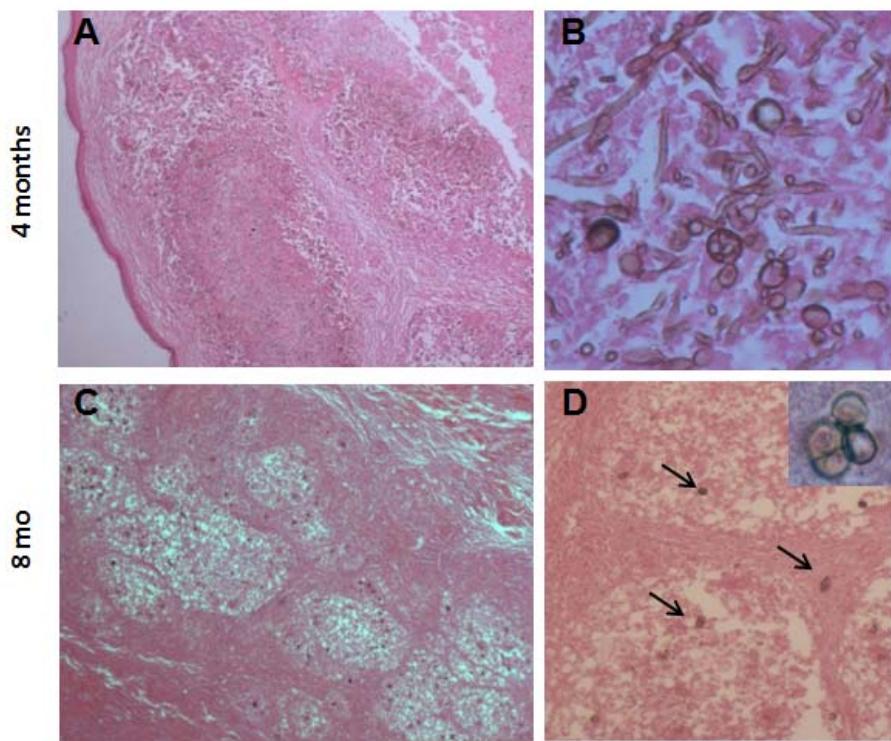


Figure 3 – Histopathological characteristics of focal lesions in Xid mice 4 and 8 months post-double stimuli, H&E staining. Larger and irregular lesions of the footpad (A, 100x) with high numbers of thin, small hyphae, conidia and conidiogenous cells (B, 400x) 4 months post-infection. Small and well-organized granuloma-like lesions (C, 100x) with a few number of sclerotic-like cells (D, 200x and insert 1000x) were observed after 8 months.

## **ANEXO 4**

Experimental murine chromoblastomycosis obtained with *Fonsecaea pedrosoi* isolate cultivated for a long period. Submitted to The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (JVATiTD), 2009.

Experimental murine chromoblastomycosis obtained with *Fonsecaea pedrosoi* isolate cultivated for a long period.

Alexandre Paulo Machado

Department of Basic Health Sciences,

Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Brazil.

Edna Freymuller

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology,

Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Olga Fischman

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology,

Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Address:

Alexandre Paulo Machado

Laboratório de Microbiologia

Departamento de Ciências Básicas em Saúde

Faculdade de Ciências Médicas

Universidade Federal de Mato Grosso

Avenida Fernando Corrêa, s/nº Coxipó

Cuiabá-MT

CEP 78060-900

Phone number: +55 (65) 3615-8835

e-mail: alexandre.paulo@unifesp.br or alepaulo@hotmail.com

## Abstract

The goal of this study is to describe *F. pedrosoi* propagules capable of causing chronic murine disease. Several changes in *F. pedrosoi* hyphae were identified in fungal cells culturing over a long period of time. By optical microscopy, many cells were observed to be rounded with a double-tight and melanin-rich cell wall. Terminal and intercalary chlamydoconidia were also frequently observed. Analyses of images from transmission electron microscopy (TEM) showed many cells with a cell wall composed of at least three layers and an outer layer enriched in melanin. Two groups of 20 BALB/c mice were infected subcutaneously in their footpads with *F. pedrosoi* cells at an inoculum concentration of approximately  $1 \times 10^4$  cells/mL. In one group, long-term cultured *F. pedrosoi* cells were inoculated in one footpad, and in the other group, both footpads were infected. Active lesions were observed up to seven months post-infection, particularly in mice inoculated at two sites. At this time, the animals were sacrificed and the study ended. Histological sections revealed characteristics bearing a strong resemblance to human disease such as tissue hyperplasia, granulomas with microabscesses, and sclerotic cells. From this study, we present an indication of fungal cells from old-cultures capable of provoking chronic chromoblastomycosis disease under experimental conditions, especially when more than one site was infected.

**Keywords:** *Fonsecaea pedrosoi*, experimental chromoblastomycosis, sclerotic cells.

**Abbreviations:** CBM, chromoblastomycosis; SDA, Sabouraud dextrose agar; SDB, Sabouraud dextrose broth; PMNs, polymorphonuclear leucocytes; TEM, transmission electron microscopy; H&E, hematoxylin-eosin; PAS, periodic acid-Schiff; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

## Introduction

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic human disease caused by several dematiaceous fungal species, of which *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii* are the most commonly isolates throughout the world (1, 2). CBM therapy has been difficult, especially for severe clinical forms (1, 3). Therefore, finding a suitable model for chronic experimental CBM is important for studying the immunological response and testing novel antifungal drugs. The presence of parasitic forms commonly known as sclerotic (fumagoid or muriform) cells (also known as Medlar bodies) in tissues is a typical sign of the human disease (2, 4). However, the fungal forms involved in establishing infection and the mechanism of their adaptation to parasitism remain unknown.

Cellular fungal modifications most often occur as resistance to chemical, biological and physical stress conditions. Fungal cells similar to the parasitic forms found in CBM can be induced *in vitro* under acidic conditions and low concentration of calcium (5-7). Still, the infective potential of these forms requires further experimental study. The fungal cell transformation to sclerotic forms has been proposed as a virulence factor (6, 8). Sclerotic cells were detected in environmental samples of vegetables (6, 8, 9), suggesting the possible existence *in natura* of forms pre-adapted to parasitism. Recently, artificial inoculations of *C. carrionii* in cactus tissue revealed a morphological resemblance between meristematic cells formed after vegetable transience and sclerotic bodies (10). Although hyphae and conidia are currently cited in literature as potentially infective for humans, several studies are missing to reproduce a stable chronic infection for a long time with these forms cultivated in agar or broth for periods of 15 to 30 days (11-17). Fungal infections at single site with forms from young cultures generally produce acute inflammatory reactions mediated mainly by neutrophils and animals healing until 2 months independently of the site of infection or inoculum concentration (11, 13, 14, 17, 18). Increased persistence of *F. pedrosoi* infection was found in animals inoculated at more than one site (19). A link between T suppressor cells and peripheral tolerance induced after *Leishmania major* inoculation at two sites has been described (20, 21). In our previous experiments, we observed that inoculation at two sites with 30-day-old forms is sufficient to cause this persistent infection. However, the infection sites in the greater number of the

animals healed within 3 to 4 months post-inoculation and did not develop a stable chronic infection (unpublished data).

Therefore, the aims of the present study were to describe (i) the morphology of *F. pedrosoi* forms obtained from old cultures, and (ii) ability of these fungal cells to provoke infection in laboratory mice at one and two sites.

## Materials and methods

### *Fonsecaea pedrosoi* isolate

A *Fonsecaea pedrosoi* strain (EPM – 380/03) provided from a patient with CBM examined in 2003 in the Dermatology Outpatient Department, UNIFESP was cultivated on Sabouraud dextrose agar (SDA, DIFCO Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 80 mg/L gentamycin (Schering-Plough corporation) at a temperature of 25°C. The fungal strain used in this study was preserved in sterile distilled water inside of sealed penicillin-tubes by Castellany methodology and maintained at room temperature. Aliquots contained fungal cells were collected using sterilized insulin needle for cultivation.

### Culture

The *F. pedrosoi* strain was cultivated in 1 L cylindrical glass bottles (KIMAX® GL-45, DAIGGER Lab Equipment and Supplies) containing 300 mL of Sabouraud dextrose broth (SDB, DIFCO Laboratories, Detroit, MI) with gentamycin, pH 5.7, at 30°C on a incubator (TE-420, TECNAL) with agitation set at 100 rpm for six months.

### *F. pedrosoi* cells

Cultures of *F. pedrosoi* were vortexed and filtered through sterile gauze to retain macroscopic fungal balls and mycelial aggregates. Filtrates were drawn up into a 50 mL glass needle and ejected into a beaker several times to disrupt the small mycelia clusters and to obtain solitary cells and small fragments of hyphae. Cells were then recovered by centrifuging the homogenates at 3000 g for 10 min, and were observed by optical microscopy.

Images were captured using a Q-Color5 digital camera fitted to an Olympus BX50 microscope. Images were processed using Image Pro Express software (version 6.3, [www.mediacy.com](http://www.mediacy.com)). Samples from old cultures were cultivated on blood agar and maintained at 30°C to test for bacterial contamination.

#### Transmission electron microscopy (TEM)

For TEM, *F. pedrosoi* cells cultured for six months were fixed for two hours at room temperature with 3% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. The fixed cells were washed in cacodylate buffer three times for 30 min each wash and once overnight, and then fixed for two hours with 2% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer. Cells were subsequently washed with 0.1 M cacodylate buffer three times for 15 min, then gradually dehydrated in a series of ethanol solutions and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were mounted on Formvar grids, stained with 4% uranyl acetate and lead citrate (22), and observed under a JEOL 1200 EX II transmission electron microscope at 80 kV (materials cited for TEM from *Electron Microscopy Sciences Company*).

#### Inocula

Inocula viability was assessed using LIVE/DEAD ® Cell Vitality Assay Kit (L34951, Invitrogen, [probes.invitrogen.com/media/pis/mp34951.pdf](http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp34951.pdf)) in fluorescent microscopy. Suspensions containing fungal forms were adjusted to a concentration of  $1 \times 10^4$  cells/mL in a Neubauer chamber. Minimal concentration of the fungal inoculum for animal infection was standardized by a pilot study. Short hyphal fragments had approximately six to ten septa. The separation between septa was used to distinguish individual hyphal cells, which were then counted. The inocula population contained a cellular mix of approximately 23% solitary chlamydoconidia-cells, 18% roundish cells, 26% conidia, and 33% hyphal fragments. The inocula suspension had a viability of approximately more than 95% of total cells.

#### Infection

Two groups of 20 BALB/c male mice weighing approximately 23 g each (six to eight weeks-old) were used throughout the study. These pathogen-free

animals were purchased from CEDEME/UNIFESP (São Paulo, Brazil). The protocol used was approved by the UNIFESP Ethics Committee (project number 0808/05). Ten minutes prior to infection, animals were i.p. anesthetized with 0.4 µL Anasedan and 0.35 mL/kg Dopalen (Vetbrands, Jacareí/SP, Brazil). Approximately 50 µL of the *F. pedrosoi* cell suspension was inoculated subcutaneously into the footpads (~ 500 cells/footpad). Swelling was monitored every 30 days up to a maximum of seven months using a Mitutoyo digital caliper (<http://www.mitutoyo.com>). Footpad volume was calculated based on height and width measurements and the mathematic formula for the volume of a cylinder. Results are expressed as mean ± SE. Based on normality data as defined by the omnibus normality test of D'Agostino and Pearson, significant differences were determined using an ANOVA test (Prism software, <http://www.prism-software.com>). Seven months post-infection, mice were sacrificed and footpads were removed using procedures in accordance with guidelines on the use and care of laboratory animals (23-25). A sample of infected tissue was biopsied and cultivated on SDA. Fresh tissue samples were clarified with 20% KOH and analyzed directly by optical microscopy.

### Histopathology

Tissue specimens were left in 10% formalin for over 12 hours. Bone tissue from the paws was decalcified with 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich) (17). The specimens were embedded in paraffin, and 3 to 5 µm serial sections from the blocks were stained with hematoxylin-eosin (H&E, Sigma-Aldrich) and periodic acid-Schiff (PAS, MERCK Chemicals).

## Results

### Light microscopy and TEM

Different morphological forms were found by optical microscopy; there were spherical or ovoid-shaped cells and hyphae with intercalary or terminal chlamydoconidia shapes. In general, these forms were 5 µm to 20 µm in diameter, sometimes with planate divisions and a large nucleus (Figure 1). A significant number of cells were more pigmented than others (Figure 2). By TEM, we verified that the cell wall of these forms was composed of a thick multilayer containing at least three layers (Figure 3). The outer layer had a dark,

electron-dense appearance, and was probably comprised of melanin (Figure 3D). Bacterial contamination was not detected in samples taken from old cultures.

#### Infection with cells from old cultures

Mouse footpads were monitored over the course of seven months, and animals maintained a stable and chronic infection process. At four to five days post-infection, animals developed a small inflammatory response on their footpad. By the end of the first month, we noted footpad swelling, particularly in the mice inoculated at two sites. The swelling lasted for up to two months, and it acquired a firm consistency. After five months, several animals that were inoculated in two footpads developed foot hyperkeratosis. All animals infected showed progressive inflammatory process of footpads in the early post-infection period (Figure 4). However, animals inoculated in two footpads exhibited more swelling, chronicity, and stability of the infectious process. Eight mice inoculated at one site healed after five months. Infection metastasis to other organs did not occur. In general, a small number of sclerotic bodies (three to four cells/optical field) were observed in lesions during direct examination (Figure 5) and in anatomicopathologic sections (Figure 6). Histopathological findings revealed tissue hyperplasia, granulomas and the proliferation of pseudoepitheliomatous cells. In addition, lesions were observed containing microabscesses surrounded by foamy macrophages with PMN infiltration, and encapsulated by fibroblasts. Rare eosinophils and lymphocytes were found. Neutrophils were found around and inside microabscesses. Granulomas of mice inoculated at one site had more PMN infiltration than those of animals inoculated at two sites, suggesting that the migration and action of these cells at the infection site might be important for infection control. Viable fungal cells were recovered from 18 animals (90%) injected at multiple sites and from seven animals (35%) infected at one site.

#### Discussion

Since the discovery of CBM, a number of studies involving experimental inoculation with CBM agents have been carried out in an attempt to develop an animal model of the disease (11-13, 15, 16, 26). However, a suitable model for

chronic experimental CBM has yet to be established (4, 27). *Fonsecaea pedrosoi* inoculated in various peritoneal sites caused persistent infection (19, 28). Suppressed host immune response in the presence of chromoblastomycotic agents might be related to the induction of a specific population of T cells (4). Inoculation of *Leishmania major* at two sites on BALB/c mice, for example, stimulated the migration of regulatory T cells to one of the infection sites, resulting in greater infection chronicity than that observed in animals inoculated at a single site (21). In this study, we verified that *F. pedrosoi* cells cultured for a long period of time could cause chronic infection in BALB/c mice, especially if the inoculation occurred at more than one site. We also verified that low concentrations of aged inoculum are capable of producing a stable experimental infection, in contrast to other studies that using a high number of *F. pedrosoi* cells to obtain acute infections (13, 15, 16).

A variety of cellular forms of the *F. pedrosoi* strain were observed in the present study (Figure 1). The nutritional starvation in old cultures might be one explanation for the abnormal fungal morphology observed *in vitro*. Many other dematiaceous fungi such as *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Scytalidium lignicola*, *Phialophora verrucosa*, *P. parasitica*, *P. richardsiae*, *C. carrionii*, *C. boppii*, and *Rhinocladiella aquaspersa* as well as several clinical strains of *F. pedrosoi* ( $n = 8$ ) showed high-melanized forms, such as chlamydoconidia and sclerotic-like cells, after culturing for longer than six months (unpublished data). Prominent melanization of certain fungal forms was observed in TEM as electron-dense pigments, particularly in the outer layer of the cell wall. The microbial ability to synthesize melanins can be related to virulence and pathogenicity (29). Many pathogenic fungi have melanized forms or secrete melanin in order to increase their resistance to environmental hazards, and to enable them to evade host defense-mechanisms (30). However, in addition to wall coverage and melanin secretion, infective forms of CBM agents may possess additional virulence factors harmful to hosts. The transformation of dematiaceous cells into resistant forms similar to sclerotic bodies should be considered an important virulence factor. For this, meristematic forms (resistant thick-walled globose cells) found in vegetables may be possible precursor cells of CBM-parasitic forms. In plant hosts they can be regarded as an extremotolerant survival phase (6, 10). Production of

sclerotic cells *in vitro* results from morphological changes in hyphae and conidia of *F. pedrosoi* and *Cladophialophora* spp chemically induced by growth under stress conditions (5, 6, 31, 32). Hence, the fungal changes in hostile environments could be considered a step for pre-adaptation of CBM-agents to human/animal parasitism. Interestingly, many fungal forms of *F. pedrosoi*, including terminal chlamydoconidia-shaped cells, have been observed in samples collected from thorns of *Mimosa pudica*, which is reported to be a probable natural source of CBM agents (33). A significant number of chlamydoconidia-shaped, roundish, melanin-enriched cells were observed in the inocula used to cause animal infections in the present study. Such forms might be precursors of the sclerotic cells subsequently observed at seven months post-infection. Both the melanized cells and the sclerotic cells had similar morphology and diameters of approximately 5 to 10 µm.

Acute cellular response in animals that is effective against *F. pedrosoi* cells from young cultures involves intense neutrophil infiltration (11-13, 17). In this study, however, the sclerotic bodies were resistant to neutrophil killing mechanisms and macrophage phagocytosis. Tissue sections taken from infection sites in animals inoculated at a single site showed a higher number of neutrophils than those taken from animals inoculated at multiple sites, and several mice from the infection-unifocal group healed after five months. Histopathological sections of tissue from human disease show hyperkeratotic pseudoepitheliomatous hyperplasia with microabscesses rich in polymorphonuclear neutrophils (34, 35). According to our histological results, we detected tissue hyperplasia and granulomatous reactions with microabscesses containing central neutrophil-infiltrates surrounded by foamy macrophages, sclerotic bodies inside giant cells, rare lymphocytes and eosinophils, and an external layer encapsulated by fibroblasts. We also noted additional pathological characteristics that further indicated the similarity in the disease process between our infected mice and human CBM patients, such as fibrosis, acanthosis and hyperkeratosis.

In this investigation, experimental CBM disease with chronic outcomes was demonstrated to be linked to fungal morphology and host responses. Old cultures may represent an alternative means to obtain chlamydoconidia-shaped and well-melanized roundish cells capable of provoking a stable chronic

infection resistant to the host response, especially if these forms are inoculated into mice at more than one site. In the future, such *F. pedrosoi* forms might be a suitable method for investigating infections *in vivo*, although the time required can be rather long, requiring at least 10 months.

### Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Maria Regina Regis Silva, Department of Pathology (UNIFESP/SP) for help with histopathological analyses. This study was carried out with financial support from CNPq.

### References

1. Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol*. 2009;47(1):3-15.
2. Lopez Martinez R, Mendez Tovar LJ. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol*. 2007; 25(2): 188-94.
3. Vitale RG, de Queiroz Telles F, de Hoog S. The dark world of black fungi--a major area of concern. Preface. *Med Mycol*. 2009;47(1):1.
4. Esterre P, Richard-Blum S. Chromoblastomycosis: new concepts in physiopathology and treatment. *J Mycol Med*. 2002;12:21-4.
5. da Silva MB, da Silva JP, Sirleide Pereira Yamano S, Salgado UI, Diniz JA, Salgado CG. Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells in vitro. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(11):3839-41.
6. Badali H, Gueidan C, Najafzadeh MJ, Bonifaz A, van den Ende AH, de Hoog GS. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. *Stud Mycol*. 2008; 61:175-91.
7. Mendoza L, Karuppayil SM, Szaniszlo PJ. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses*. 1993; 36(5-6):157-64.
8. De Hoog G, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Gerrits Van Den Ende A, et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol*. 2000; 38 Suppl 1:243-50.
9. Zeppenfeldt G, Richard-Yegres N, Yegres F. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. *Rev Iberoam Micol*. 1994;11:61-3.

10. De Hoog G, Nishikaku A, Fernandez-Zeppenfeldt G, Padín-González C, Burger E, Badali H, et al. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carriponii* complex, with the description of a novel species. Stud Mycol. 2007; 58(1):219-34.
11. Polak A. Experimental infection of mice by *Fonsecaea pedrosoi* and *Wangiella dermatitidis*. Sabouraudia. 1984; 22(2):167-9.
12. Walsh T, Dixon D, Polak A, Salkin I. Comparative histopathology of *Dactylaria constricta*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Wangiella dermatitidis*, and *Xylohypha bantiana* in experimental phaeohyphomycosis of the central nervous system. Mykosen. 1987; 30(5):215-25.
13. Kurita N. Cell-mediated immune responses in mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. Mycopathologia. 1979; 68(1):9-15.
14. Nishimura K, Miyaji M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection Mycopathologia. 1981;76(3):155-66.
15. Al-Doory Y. Chromoblastomycosis. Montana: Mountain Press Publishing Company 1972.
16. Kurup P. Pathogenicity of *Phialophora pedrosoi*. Mykosen. 1971; 14(1):41-4.
17. Gugnani H, Obiefuna M, Ikerionwu S. Studies on pathogenic dematiaceous fungi, II. Pathogenicity of *Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa* for laboratory mice. Mykosen. 1986; 29(11):505-15.
18. Kurup PV. Pathogenicity of *Phialophora pedrosoi*. Mykosen. 1971; 14(1):41-4.
19. Cardona-Castro N, Agudelo-Florez P. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. Med Mycol. 1999; 37(2):81-3.
20. Belkaid Y, Piccirillo C, Mendez S, Shevach E, Sacks D. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nature. 2002; 420(6915):502-7.
21. Mendez S, Reckling S, Piccirillo C, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. J Exp Med. 2004; 200(2):201-10.
22. Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol. 1963; 17:208-12.
23. CGUANBR. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. 2003. Available from: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/>

National\_Academies\_Guidelines\_for\_Use\_and\_Care.pdf.

24. NACLR. Guidelines on the care and use of animals for scientific purposes. 2004. Available from: [http://www.ava.gov.sg/NR/rdonlyres/C64255C0-3933-4EBC-B8694621A9BF682/8338/Attach3\\_AnimalsforScientificPurposes.PDF](http://www.ava.gov.sg/NR/rdonlyres/C64255C0-3933-4EBC-B8694621A9BF682/8338/Attach3_AnimalsforScientificPurposes.PDF)
25. CCAC. Guide to the care and use of experimental animals. 1993. Available from: [http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals\\_GDL.pdf](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals_GDL.pdf).
26. Ahrens J, Graybill J, Abishaw A, Tio F, Rinaldi M. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. Am J Trop Med Hyg. 1989; 40(6):651-8.
27. Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. Curr Opin Infect Dis. 2006; 19(2):148-52.
28. Cardona-Castro N, Agudelo-Florez P, Restrepo-Molina R. Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91(6):779-84.
29. Nosanchuck J, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol. 2003; 5(4):203-23.
30. Jacobson E. Pathogenic roles for fungal melanins. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(4):708-17.
31. da Silva J, Alviano D, Alviano C, de Souza W, Travassos L, Diniz J, et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 Mar 25; 33(1):63-9.
32. Mendoza L, Karuppayil S, Szaniszlo P. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. Mycoses. 1993; 36(5-6):157-64.
33. Salgado C, da Silva J, Diniz J, da Silva M, da Costa P, Teixeira C, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004; 46(1):33-6.
34. Esterre P, Ricard-Blum S. Chromoblastomycosis: new concepts in physiopathology and treatment. J Mycol Med. 2002; 12:21-4.
35. Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A. Histopathology of chromoblastomycosis. Mycopathologia. 1989;105(1):1-6.

Figure 1 – Highly-melanized fungal forms with diameters ranging from 5 to 20  $\mu\text{m}$  from pure cultures of *F. pedrosoi* cultivated for six months, 1000x. Multi-cellular (A, B) and unicellular (C, D) chlamydoconidia. (E-H) Roundish cells. \* Many cells have an enlarged nucleus (light green).

Figure 2- More highly-melanized hyphal cells from *F. pedrosoi* cultured for six months, 400x.

Figure 3 – *Fosecaea pedrosoi*-chlamydoconidia cells from six-month cultures. A- Light microscope image, 1000x. B- Autofluorescent wall layers, 1000x. C- TEM of roundish-cell, longitudinal, and transversal septa. D- TEM of wall from terminal-chlamydoconidia, showing four layers with an external electrondense layer.

Figure 4 – Kinetics of lesions from BALB/c mice that were infected s.c. with aged inocula of *F. pedrosoi* at one (squares, red) and two footpads (triangles, blue). The control group of animals was treated with 50  $\mu\text{L}$  of PBS (circles, black). Footpads of mice were measured every 30 days for seven months after inoculation. Animals infected at two sites had strong swelling and more chronicity of the infectious process. Data are shown with mean and SE values, ANOVA test,  $P < 0.05$ .

Figure 5 – Sclerotic cells observed by direct examination of samples of footpad tissue at seven months after infection; (A) 100x, (B) 400x, (C and D) 1000x.

Figure 6 – Photomicrography of histopathological sections from footpad tissue of animals with chronic experimental CBM infection at seven months after infection; tissue was stained with PAS. Granulomatous reaction containing microabscesses (A, arrows) with neutrophilic infiltration, foamy macrophages, low numbers of lymphocytes and eosinophils, and recovery by fibroblasts (B). Few sclerotic cells of *F. pedrosoi* were found on granulomas of mice inoculated at one site (C) or two sites (B). PMN-rich cellular infiltration surround by macrophages (Mφ) of animal tissue infected at one site (C). Sclerotic cells with diameters of 5 to 10  $\mu\text{m}$  (D and E). (A) 40x, (B) 200x, (C) 100x, (D and E) 1000x. \*Panel E is a magnified view of C (arrow). Mφ = macrophages, PMNs = polymorphonuclear leucocytes.

## **ANEXO 5**

*Bacillus subtilis* induces morphological changes in *Fosecaea pedrosoi* cells *in vitro* and results in fungal forms that are more resistant to the host response *in vivo*. Submitted to The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (JVATiTD), 2009.

*Bacillus subtilis* induces morphological changes in *Fosecaea pedrosoi* cells *in vitro* and results in fungal forms that are more resistant to the host response *in vivo*

Alexandre Paulo Machado<sup>1,2</sup>, Mariana Anzai<sup>1</sup>, Olga Fischman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences of Health,  
Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Immunology and Parasitology,  
Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

## Abstract

Interactions between microorganisms can be cause of morphological modifications, particularly in fungal cells. The aim of this work was to examine the changes that occur in the cells of the fungus *F. pedrosoi* after co-culturing with *B. subtilis* *in vitro* and to explore the results this interaction *in vivo* in an experimental murine infection. *Bacillus subtilis* strain was inoculated into a 15-day pure culture of *F. pedrosoi*. *In vitro*, after 48 hours of co-culturing, the fungal cells appeared roundish (arthroconidia-like). The secretion of fungal dark pigments and production of terminal chlamydoconidia was observed in hyphae after one week. In the *in vivo* study, two animal groups of 30 BALB/c mice each were used in this study. One group was inoculated intraperitoneally with hyphal fragments from the co-culture of bacteria and fungus; the other group was infected only *F. pedrosoi* hyphae. After seven days post-infection, both animals groups developed neutrophilic abscesses. Phagocytosis of bacilli by macrophages occurred after three days. At later periods, generally after 25 days, only roundish cells similar to sclerotic bodies remained in the tissues while hyphae were eliminated at 15 to 20 days. These fungal forms originating mainly from terminal chlamydoconidia. The co-culturing between bacteria and fungus may be a way to quickly obtain the resistant fungal forms for host defenses, especially for chromoblastomycosis (CBM) experimental infections.

**Key-words:** *Bacillus subtilis*, *Fonsecaea pedrosoi*, microbial interaction.

Abbreviations: CBM = chromoblastomycosis, SDA = Sabouraud dextrose agar, SDB = Sabouraud dextrose broth, B&B = Brown-Brenn, H&E = hematoxylin-eosin.

**CONFLICTS OF INTEREST:** There is no conflict.

**Financial support:** FAPEMAT and CNPq

Address:

Alexandre Paulo Machado  
Laboratório de Microbiologia  
Departamento de Ciências Básicas em Saúde  
Faculdade de Ciências Médicas  
Universidade Federal de Mato Grosso  
Avenida Fernando Corrêa, s/nº Coxipó  
Cuiabá-MT  
CEP 78060-900  
Phone: +55 (65) 3615-8835  
e-mail: alepaulo@ecb.epm.br or alepaulo@hotmail.com

## INTRODUCTION

Dematiaceous fungi are saprobes that are found mainly in soils and organic matter as decomposers (1). A natural characteristic of these microorganisms is their dark cellular pigment, which is the result of a melanization process. Melanins have been linked to resistance in adverse environmental conditions, high virulence, and low susceptibility to antifungal drugs (2, 3). Many dematiaceous fungi are harmful to their hosts, in particular the *Herpotrichiellaceae* family, which includes a great number of CBM agents (4). Worldwide, *Fonsecaea pedrosoi* is the most frequently isolated specie in CBM disease (5). Generally, infection occurs after a traumatic inoculation with vegetable fragments that are contaminated with the fungus (6-8). A typical sign of the disease is the presence of parasitic forms that are commonly known as sclerotic cells (bodies) in the tissue (6).

Gram-positive bacilli are widespread in the environment, particularly in soils. These organisms have been used for several biotechnological applications, for example as biocontrollers, probiotics, bioregulators, and for the production of antibiotics, insecticides and enzymes (9-14). Gram-positive bacteria can secrete a variety of substances that are inhibitory to fungi (15). *Bacillus subtilis* for example, has the ability to inhibit the growth of many environmental and phytopathogenic fungi (16-19). This organism has also been reported to inhibit a fungal CBM agent *in vitro* (20). It has also been reported that *Bacillus* spp can induce morphological changes in dematiaceous fungi (19, 21, 22).

In a preliminary study, we isolated an environmental Gram-positive bacterium from Brazilian soil that antagonizes several fungi, including dematiaceous species (unpublished data). Here, we studied the interactions between this bacterium and a clinical strain of *F. pedrosoi* in two ways: (i) firstly, we examined the *in vitro* changes in fungal cells after co-culturing with bacillus, and (ii) second, we explored the *in vivo* significance of this interaction.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

two groups with 30 BALB/c male mice weighing about 23 g (6 to 8-week-old), were used throughout this study. The specific-pathogen-free animals were purchased

from CEDEME/UNIFESP (Sao Paulo, BR). The protocol used was approved by the UNIFESP Ethics Committee under project number 0808/05.

## **Microorganisms**

*F. pedrosoi* strain (EPM – 380/03) was isolated from a patient with CBM examined in the Dermatology Outpatient Department, UNIFESP, in 2003. It was cultivated on Sabouraud dextrose agar (SDA, DIFCO Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 80 mg/L gentamycin at a temperature of 25°C, with periodic transfers at 15-day intervals into SDA with antibiotics. An environmental bacillus isolated from random soil samples collected from the Campus of the Federal University of Cuiabá (Mato Grosso, BR) was used in this study; as in previous co-culture assays, it was able to inhibit the growth of some phytopathogenic fungi and to induce the release of dark pigment by dematiaceous molds. This bacterium was identified as *Bacillus subtilis* by classical and molecular methods (unpublished data).

### ***F. pedrosoi* hyphae**

Cultures of *F. pedrosoi* were incubated for 15 days on Sabouraud dextrose broth (SDB) with and without gentamycin, pH 5.7, while shaking at 150 rpm at 37°C.

### **Co-culture of *F. pedrosoi* and *B. subtilis***

The *Bacillus subtilis* strain was inoculated with a sterilized loop into 15-day *F. pedrosoi* cultures on SDA or SDB without antibiotic and maintained at a temperature of 37°C. SDB cultures were agitated at a rate of 150 rpm for one week. These co-cultures of cells were analyzed daily by optical microscopy.

### **Inocula**

Broth cultures were vortexed with 4 mm glass beads for 20 min and filtered on sterilized gauze to retain macroscopic globoid mycelia. With a 50-mL needle, the filtrates were drained and dispensed several times in a 100 mL glass-beaker to break up small mycelia-clusters and obtain solitary hyphal fragments. Inocula viability was performed with Calcofluor white in fluorescent microscope. The suspensions containing fungal forms were adjusted to a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells in a Neubauer chamber. Short hyphal fragments had approximately 6-10 septa. The

separation between septa was used to distinguish individual hyphal cells, which were then counted.

## **Infection**

Ten minutes prior to infection, animals were anesthetized by i.p. route with 0.4 µL of Anasedan and Dopalen 0.35 mL/Kg (Vetbrands, Jacareí - S.P., Brazil). Approximately 100 µL of the suspension containing  $1 \times 10^6$  hyphal cells (approx.  $1 \times 10^5$  short hyphae fragments) were inoculated i.p. with a 25x8/21G1 needle. The kinetics of the infection were followed for one month. Three animals were sacrificed every three days, and the abscesses were immediately removed. Part of the infected tissue specimens was cultivated on SDA.

## **Histopathology**

Fragments of fresh tissue samples of the abscesses were left in 10% formalin for 12 hours. The specimens were embedded in paraffin, and serial sections of 3 to 5-µm from the blocks were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and by Brown-Brenn method (tissue Gram stain).

## **RESULTS**

### **Dark-pigment secretion on media culture**

Viable *F. pedrosoi* cells from the broth co-cultures with *B. subtilis* were observed daily over the course of the week. The secretion of a chestnut-brown pigment, probably melanin, was observed in co-cultures on SDA (Figure 1-A) and SDB (Figure 1-B) media.

### **Modifications of fungal morphogenesis**

Usually, the morphology of *F. pedrosoi* hyphal cells on broth media with antibiotic is right and linear, with lower conidia production by conidiophores (Figure 2-A). After 48 hours of co-culturing with *B. subtilis*, however, the *F. pedrosoi* hyphae were rounded and arthroconidium-like (Figure 2-B). The hyphal conidiogenesis and conidiophores (phialid-type) production were also enhanced (Figure 2-C). Terminal globoid cells (chlamydoconidia-like) of 5 to 10 µm in diameter, usually with a thick-wall, were found in hyphae after a week of co-culturing (Figure 3).

## Murine infection with *F. pedrosoi* hyphae and co-cultured of fungal cells and *B. subtilis*

In both animal groups, we observed an intense inflammatory response in mice infected and palpable lesions with approximately 8 mm in diameter a week post-infection. A capsulated neutrophilic abscess with a necrotic centre was found at the inoculation site. Cellular layers were composed of distinct sets of specific cells, such as neutrophils in the central region, foamy macrophages in the periphery, and fibroblasts surrounding the abscess (Figure 4). Rare lymphocytes were detected. Dematiaceous hyphae were found in necrotic center. Gram-positive bacilli were phagocytosed by macrophages by three days post-infection with the co-culture (Figure 5). After a week, however, only the *F. pedrosoi* cells remained and were recovered from the infected tissue. Fungal forms similar to sclerotic bodies, in particular proceeding from the terminal chlamydoconidia, were observed in histological sections of the abscess produced by the infection with the co-cultured cells (Figure 6). These brown-rounded cells were *in vivo* less susceptible than hyphae to the microbicidal action of phagocytes. In general, most of the animals that were infected with the co-cultured cells healed after 25 to 30 days, while the clinical and mycological healing of mice infected with only *F. pedrosoi* hyphae was frequently achieved after 15 days of infection.

## DISCUSSION

Gram-positive bacilli and fungi are widely found in soils and are important bioregulators (10, 23, 24). The coexistence of microorganisms in the environment during evolution promoted several interactions, such as predation, symbiosis, mutualism, competition, and antibiosis (11, 25). Microbial antagonisms have been studied due their numerous biotechnological applications, particularly those related to development of new biocontrol forms (9, 11, 24). Many *Bacillus* species have natural biocidal activities against fungi and other bacteria; as such, they are frequently described as biocontrollers of phytopathogens (15, 21, 24, 26, 27). In this study, an environmental bacterium (*B. subtilis* strain) that has a good antibiosis activity against environmental fungi and phytopathogens was used in co-cultures with *F. pedrosoi* (clinical isolate).

The melanin secretion by the dematiaceous fungus increased after co-culturing with *Bacillus* and was secreted later in the broth and agar media. The ability of microbes to synthesize melanins is related to virulence and pathogenicity (3). Fungal melanogenesis was found to be stimulated after co-culturing *Cryptococcus neoformans* with *Klebsiella aerogenes* (28). In this case, a substance that is derived from the bacterial metabolism seems to be capable of inducing fungal melanization (29). Several pathogenic species can be transformed into melanized-forms or secrete melanin in order to increase antifungal resistance or evade host defense mechanisms (2, 3). It is possible that the melanin secretion by *F. pedrosoi* is associated with bacterial antibiosis or that metabolic substances are capable of inducing the melanogenesis pathway; however, more studies are necessary to confirm these hypotheses. In this work, we observed the microbial growth and survival of two microorganisms in laboratory conditions; the results observed are likely to occur in nature, however.

Chlamydoconidia are roundish cellular forms with a thick wall that is found in filamentous fungi at intercalary or terminal positions in the hyphae. Generally, these cells are formed under environmental stress and improve the survival of the fungus during adverse conditions. The formation of chlamydoconidia-shaped cells was shown after the interaction of dematiaceous fungi with *B. subtilis* or with bacterial metabolic products (21, 22). The introduction of the bacillus into the 15-day cultures of *F. pedrosoi* caused morphological changes in the fungal hyphae, including the presence of terminal chlamydoconidia-shaped cells. Previously, it has been noted that *Pseudomonas cepacia* mutants that are defective in the production of antifungal compounds fail to induce cellular abnormalities in phytopathogenic fungi, suggesting that antibiosis may be responsible for fungal morphological changes (30). Hence, our experiments raise concerns about the possibility that resistant fungal forms can be spread in nature as a result of several factors, including microbial interactions.

Curiously, we observed in histological sections that the host inflammatory response was not fully capable of eliminating all of the *F. pedrosoi* forms in the animal tissue. Some chlamydoconidia-shaped cells persisted a few days longer than the hyphae in host tissue. For this, morphological changes may be an important factor in fungal resistance to host defenses. Although these cells were more resistant to host immunity, however, all mice were healed by 25-days post-infection.

In the history of CBM research, several works have focused on establishing an experimental infection that is similar to the human disease (31-35). Currently, however, there is no suitable animal model for this purpose. Nonetheless, chlamydoconidia-shaped cells have been shown to be eligible for future studies on the development of experimental infections, in which *B. subtilis* or other antagonistic strains can be used in co-cultures with CBM agents, especially because these forms may be precursors of sclerotic bodies.

In conclusion, our results show that the interaction *in vitro* between *F. pedrosoi* and *B. subtilis* stimulated the melanin secretion and induction of morphological changes in the *F. pedrosoi* strain. Chlamydoconidia-shaped cells were more resistant to the host immune response than hyphae. Thus, co-culturing antagonistic bacteria and CBM pathogens may be an interesting method to obtain fungal forms that are more resistant to host defense.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Dr. Maria Regina Regis Silva, Department of Pathology (UNIFESP/SP) for help with histopathological analyses. Financial support was provided by CNPq and FAPEMAT, project number Nº. 002.138/2007.

## REFERENCES

1. Vicente V, Angelis D, Queiroz-Telles F, Pizzirani-Kleiner A. Isolation of Herpotrichiellaceous fungi from the environment. *Braz J Microbiol* 2001; 32(1): 47-51.
2. Jacobson E. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 708-17.
3. Nosanchuck J, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 2003; 5(4): 203-23.
4. De Hoog G. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. *Mycoses* 1997; 40 Suppl 2: 5-8.
5. Santos A, Palmeira V, Rozental S, et al. Biology and pathogenesis of Fonsecaea pedrosoi, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31(5): 570-91.
6. Esterre P, Richard-Blum S. Chromoblastomycosis: new concepts in physiopathology and treatment. *J Mycol Med* 2002; 12: 21-24.
7. Queiroz-Telles F, McGinnis M, Salkin I, Graybill J. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17(1): 59-85, viii.
8. Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2007; 25(2): 188-94.
9. Handelsman J, Stabb E. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *Plant Cell* 1996; 8(10): 1855-1869.

10. Keel C, Défago G, eds. *Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact* London, England: Blackwell Science; 1997.
11. Whipps J. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 2001; 52(Spec Issue): 487-511.
12. Guo X, Li D, Lu W, Piao X, Chen X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2006; 90(2): 139-46.
13. Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 51(6): 711-29.
14. Rao M, Tanksale A, Ghatge M, Deshpande V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(3): 597-635.
15. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 2005; 56(4): 845-57.
16. Dass C, Teyegaga A. Growth Suppression of Some Wood-Decay and Other Fungi by *Bacillus subtilis*. *Aust J Bot* 1996; 44(6): 705-712.
17. Cazorla F, Romero D, Perez-Garcia A, et al. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J Appl Microbiol* 2007; 103(5): 1950-9.
18. Pryor S, Siebert K, Gibson D, Gossett J, Walker L. Modeling production of antifungal compounds and their role in biocontrol product inhibitory activity. *J Agric Food Chem* 2007; 55(23): 9530-6.
19. Romero D, de Vicente A, Olmos J, Davila J, Perez-Garcia A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *J Appl Microbiol* 2007; 103(4): 969-76.
20. Romero H, Viscaya L, Ferrara G. *Bacillus subtilis* inhibits growth of *Cladophialophora carrionii* in vitro. *J Mycol Med* 2006; 16: 92-94.
21. Shirokov A, Loginov O, Melent'ev A, Aktuganov G. [Protein and peptide factors from *Bacillus* sp.739 inhibit the growth of phytopathogenic fungi]. *Prikladnaia Biokhimiia Mikrobiologiiia* 2002; 38(2): 161-5.
22. Sharma N, Sharma S. Control of foliar diseases of mustard by *Bacillus* from reclaimed soil. *Microbiol Res* 2008; 163(4): 408-13.
23. Gall L. Significance of microbial interactions in control of microbial ecosystems. *Biotechnol Bioengineer* 1970; 12(3): 333-40.
24. Boer W, Folman L, Summerbell R, Boddy L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29(4): 795-811.
25. Little A, Robinson C, Peterson S, Raffa K, Handelsman J. Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Ann Rev Microbiol* 2008.
26. Walker R, Powell A, Seddon B. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J Appl Microbiol* 1998; 84: 791-801.
27. Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeyama K, Shirata A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 2001; 91: 181-87.
28. Frases S, Chaskes S, Dadachova E, Casadevall A. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a melanin-like pigment in *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(2): 1542-50.
29. Frases S, Salazar A, Dadachova E, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(2): 615-21.

30. Upadhyay R, Jayaswal R. Pseudomonas cepacia causes mycelial deformities and inhibition of conidiation in phytopathogenic fungi. *Curr Microbiol* 1992; 24(4): 181-187.
31. Polak A. Experimental infection of mice by Fonsecaea pedrosoi and Wangiella dermatitidis. *Sabouraudia* 1984; 22(2): 167-9.
32. Walsh T, Dixon D, Polak A, Salkin I. Comparative histopathology of Dactylaria constricta, Fonsecaea pedrosoi, Wangiella dermatitidis, and Xylohypha bantiana in experimental phaeohyphomycosis of the central nervous system. *Mykosen* 1987; 30(5): 215-25.
33. Ahrens J, Graybill J, Abishawl A, Tio F, Rinaldi M. Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40(6): 651-8.
34. Cardona-Castro N, Agudelo-Florez P. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Med Mycol* 1999; 37(2): 81-3.
35. Kurup P. Pathogenicity of Phialophora pedrosoi. *Mykosen* 1971; 14(1): 41-4.

**Figure 1-** Chestnut-brown pigment secretion after one week of co-culturing *F. pedrosoi* with *B. subtilis*. A – Plate co-culture on SDA medium, (+) positive reaction of pigment secretion near to bacterial colonies and (-) negative region. B – Flask co-culture on SDB medium without antibiotic. C- Pure culture of *F. pedrosoi* cultivated for 15 days on SDB medium with antibiotic. Bs, *Bacillus subtilis* colony.

**Figure 2- A** - *Fonsecaea pedrosoi* cells from a 15-day culture on SDB with antibiotic, 200x. **B**- Cellular rounding (arthroconidia-like) and increase of conidiogenesis after two days of co-culturing with the *B. subtilis* strain, 200x. **C** – Hyphal induction of lateral conidiophore (P, phialid-type) growth and conidiogenesis (C), 1000x (bacteria, arrow).

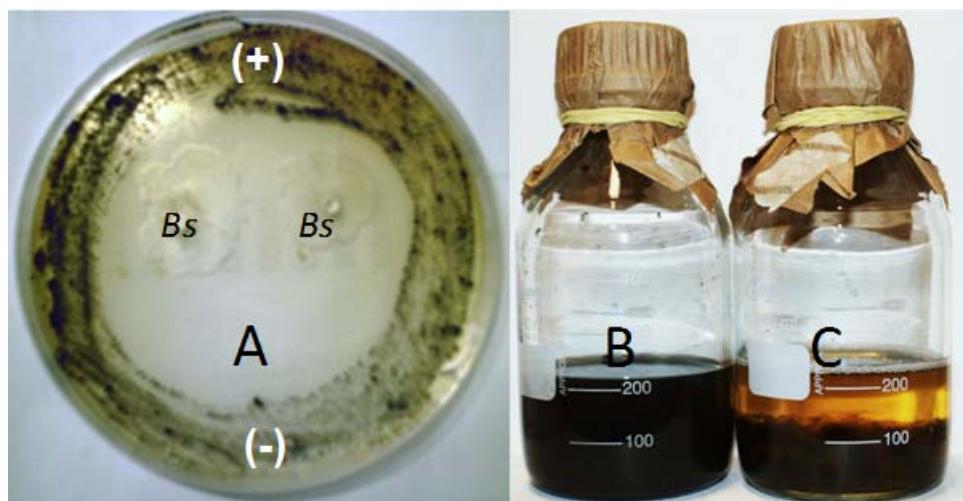
**Figure 3-** *Fonsecaea pedrosoi* terminal roundish-cell observed *in vitro* after a week of co-culturing with *B. subtilis* strain, 1000x.

Figure 4 – Peritoneal abscess observed in animals after 15 days pos-infection with hyphae of *F. pedrosoi*. A and B - peritoneal nodule, 4 to 7 mm. C – Abscess layers: fibroblasts (F, pink), macrophages (MΦ, yellow), polymorphonuclear leucocytes (PMNs, blue) and hyphae in abscess center. D and E - cellular layers; H&E, x400 and 1000x.

**Figure 5** - Phagocytosis of *B. subtilis* (blue stained) by macrophages at three days post-infection with the co-culture of fungi and bacteria; B&B stain, 1000x

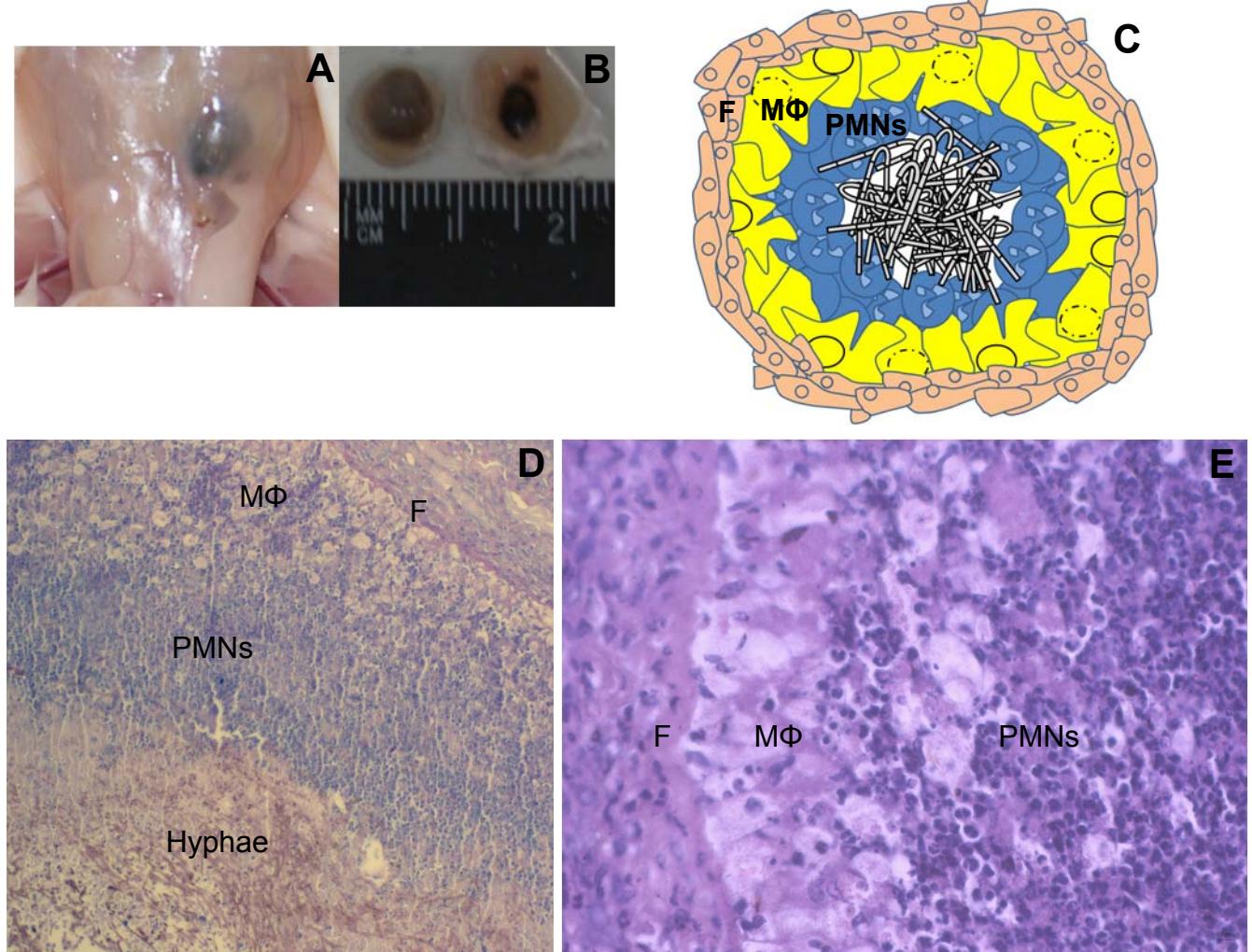
**Figure 6** – A – Roundish cells observed 20 days after infection of mice with co-culture of *F. pedrosoi* and *B. subtilis*; B&B stain, 100x. B - Terminal chlamydoconidia on hyphae; H&E, 400x. C – Brown-roundish cells; B&B stain, 1000x, D – Foamy macrophage (M) and brown-roundish cells, B&B stain, 400x, E- Proliferation of brown-roundish cells, B&B stain, 1000x.

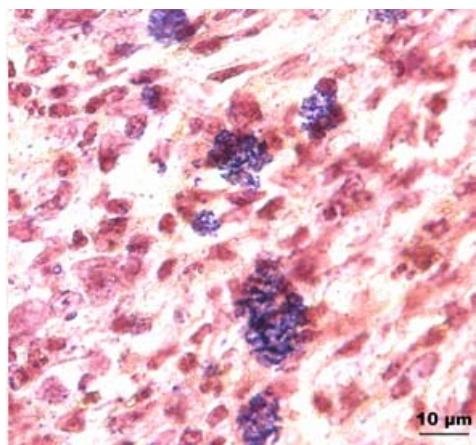
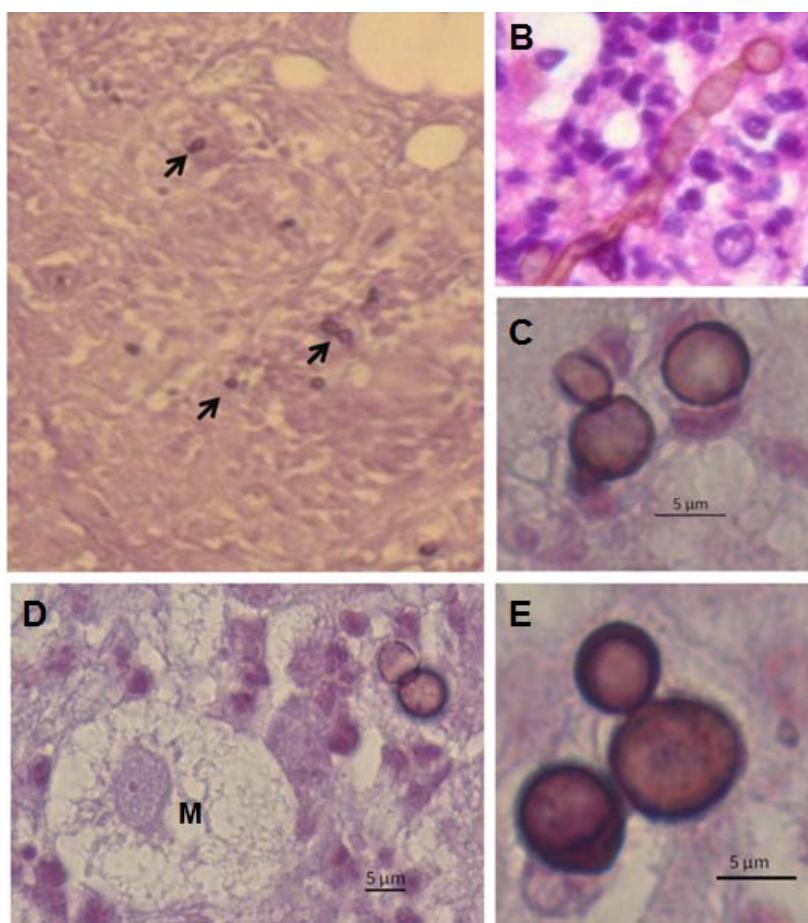
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3****Figure 4**

**Figure 5****Figure 6**

## **ANEXO 6**

Curriculum Lattes

# Alexandre Paulo Machado

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia (2000) e mestrado em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo (2003). Atualmente é Professor Assistente da Universidade Federal de Mato Grosso. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Microbiologia, atuando principalmente nos seguintes temas: Bacteriologia e Micologia.  
**(Texto informado pelo autor)**

**Última atualização do currículo em 27/05/2009**

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/0491349127793074>



## Dados pessoais

**Nome** Alexandre Paulo Machado

**Nome em citações bibliográficas** MACHADO, A. P.

**Sexo** Masculino

**Endereço profissional** Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Ciência Básicas em Saúde.  
Av. Fernando Correia da Costa - S/N  
Coxipó  
78060-900 - Cuiaba, MT - Brasil  
Telefone: (65) 36158835  
URL da Homepage: [www.UFMT.br](http://www.UFMT.br)

## Formação acadêmica/Titulação

**2004** Doutorado em Microbiologia e Imunologia .

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.

*Título:* Estímulo da resposta imune na cromoblastomicose murina experimental, *Orientador:* Olga Fischman Gompertz.

*Bolsista do(a):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .

*Palavras-chave:* Fonsecaea pedrosoi; Cromoblastomicose; Resposta imune; modelo animal.

*Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia / *Subárea:* Micologia Médica.

*Setores de atividade:* Desenvolvimento de produtos tecnológicos voltados para a saúde humana.

- 2001 - 2003** Mestrado em Microbiologia e Imunologia   
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.  
*Título:* Análise microbiológica de endoscópios (broncoscópios, gastroscópios e colonoscópios) em dois hospitais universitários do Brasil., *Ano de Obtenção:* 2003.  
*Orientador:* Olga Fischman Gompertz.  
*Bolsista do(a):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .  
*Palavras-chave:* endoscópios; limpeza e desinfecção; contaminação.  
*Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia / *Subárea:* Microbiologia Aplicada.  
*Setores de atividade:* Cuidado à saúde das populações humanas.
- 1996 - 2000** Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil.  
*Bolsista do(a):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .

### **Formação complementar**

- 2009 - 2009** Capacitação de tutores. (Carga horária: 16h).  
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil.
- 2007 - 2007** Resistencia em bactérias Gram-positivas. (Carga horária: 4h).  
Sociedade Brasileira de Microbiologia.
- 2007 - 2007** Resistência bacteriana em bactérias Gram-negativas. (Carga horária: 4h).  
Sociedade Brasileira de Microbiologia.
- 2005 - 2005** Curso Internacional de Micologia Médica. (Carga horária: 90h).  
Universidade Federal do Paraná.
- 2005 - 2005** Curso de Filogenia Molecular. (Carga horária: 20h).  
Universidade Federal do Paraná.
- 1998 - 1998** Curso de Curta Duração.  
Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil.

### **Atuação profissional**

**Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil.**

#### **Vínculo institucional**

- 2006 - Atual** Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Efetivo, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

**Outras informações** Professor Assistente

### **Atividades**

**02/2007 - Atual** Extensão universitária , Departamento de Ciência Básicas em Saúde.

Atividade de extensão realizada  
Cine Saúde Debate Cerrado - 2007.

**02/2007 - Atual** Conselhos, Comissões e Consultoria, Departamento de Ciência Básicas em Saúde.

Cargo ou função  
Comissão de Combate a Dengue no Campus da UFMT.

**08/2006 - Atual** Pesquisa e desenvolvimento , Departamento de Ciência Básicas em Saúde, .

Linhas de pesquisa  
Micologia em Cuiaba

**07/2006 - Atual** Ensino, Medicina, Nível: Graduação.

Disciplinas ministradas  
Microbiologia

**Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.**

### **Vínculo institucional**

**2004 - Atual** Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Outro, Carga horária: 25

**Outras informações** bolsista de doutorado

### **Vínculo institucional**

**2001 - 2003** Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Outro, Carga horária: 20

**Outras informações** bolsista de mestrado

## **Atividades**

**6/2004 - Atual** Outras atividades técnico-científicas , Departamento de Dermatologia, Disciplina de Dermatologia Geral.

Atividade realizada  
aulas práticas de micologia médica.

**2/2004 - Atual** Outras atividades técnico-científicas , Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia, Disciplina de Biologia Celular.

Atividade realizada  
monitoria voluntária em aulas práticas de micologia médica para curso de medicina.

**8/2002 - Atual** Ensino, Medicina, Nível: Graduação.

Disciplinas ministradas  
Aulas práticas de micologia médica

**8/2001 - Atual** Atividades de Participação em Projeto, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia, Disciplina de Biologia Celular.

Projetos de pesquisa  
Micoses

**6/2003 - 12/2003** Outras atividades técnico-científicas , Departamento de Dermatologia, Disciplina de Dermatologia Geral.

Atividade realizada  
aulas práticas de micologia médica.

**2/2003 - 12/2003** Outras atividades técnico-científicas , Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia, Disciplina de Biologia Celular.

Atividade realizada  
monitoria em aulas práticas de micologia médica.

**8/2002 - 8/2003** Outras atividades técnico-científicas , Departamento de Dermatologia, Disciplina de Dermatologia Geral.

Atividade realizada  
microbiologista voluntário do grupo de micoses e leishmaniose.

**1/2002 -** Outras atividades técnico-científicas , Departamento de

**12/2002** Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia, Disciplina de Biologia Celular.

Atividade realizada  
monitoria voluntária para graduação em micologia médica.

### **Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil.**

#### **Vínculo institucional**

**1997 - 2001** Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Outro, Carga horária: 20

**Outras informações** Aluno de graduação da instituição

#### **Atividades**

**07/1999 - 01/2001** Estágios , Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Biociências.

Estágio realizado  
Estágio não remunerado no Laboratório de Microbiologia (1 ano e 6 meses).

**1999 - 2000** Outras atividades técnico-científicas , Instituto de Ciências Biomédicas, .

Atividade realizada  
monitoria voluntária em microbiologia.

**05/1997 - 05/1999** Estágios , Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Biociências.

Estágio realizado  
laboratório de Imunologia (apoio CNPq).

#### **Linhas de Pesquisa**

1. Micologia em Cuiaba

## **Projetos de Pesquisa**

### **2001 - Atual Micoses**

*Descrição:* Micoses oportunísticas, subcutanea, cutanea, superficiais e profundas.

*Situação:* Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.

*Alunos envolvidos:* Graduação ( 3 ) / Especialização ( 0 ) / Mestrado acadêmico ( 2 ) / Mestrado profissionalizante ( 0 ) / Doutorado ( 1 ) .

*Integrantes:* Olga Fischman Gompertz - Integrante / Rodrigo Mulero Ortiz - Integrante / Danielle Gonçalvez - Integrante / Guilherme Marin Saraiva - Integrante / Alexandre Paulo Machado - Coordenador.

*Financiador(es):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa..

## **Áreas de atuação**

- 1.** Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.
- 2.** Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada.
- 3.** Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada / Especialidade: Microbiologia Médica.
- 4.** Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Micologia Médica.

## **Idiomas**

**Inglês** Compreende Bem, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

**Francês** Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

**Espanhol** Compreende Razoavelmente Lê Pouco.

## **Prêmios e títulos**

**2004** XII Prêmio Pereira Barreto, UNIFESP.

**1998** Feira de Ciencias, Estado de Minas Gerais.

## **Produção em C,T & A**

### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. BOATTO, Humberto ; MACHADO, A. P. ; SAIONARA, Maria ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; GIRÃO, Manoel . Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil.. RBGO. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 29, p. 80-84, 2007.
2. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; GONTIJO, Paulo Pinto ; PIMENTA, Ana Teresa ; GEOCZE, Stephan . MICROBIOLOGIC PROFILE OF FLEXIBLE ENDOSCOPE DISINFECTION IN TWO BRAZILIAN HOSPITALS. Arquivos de Gastroenterologia (Online), v. 43, p. 255-258, 2006.
3. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; GEOCZE, Stephan . Análise microbiológica de gastroscópios descontaminados em aparelho Cleantop WM-1 por uso da água eletrolítica ácida. Arquivos de Gastroenterologia, Brasil, v. 42, n. 1, p. 60-62, 2005.
4. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; YAMASHITA, Jane Tomimori ; HIRATA, Sergio Henrique ; OGAWA, Marilia Marufugi . Dermatophytosis on the eyelid caused by *Microsporum gypseum*. Mycoses (Berlin), Alemanha, v. 48, p. 73-75, 2005.
5. APARECIDA, Maria ; Sandra Regina ; MACHADO, A. P. ; Flávia Andrade Chaves Borges ; Henrique Lanza ; Janethe Deolinda de Oliveira Pena . The ajadvante effect of saponin (Quillaja Bark) in the vaccine against murine cutaneous leishmaniasis. Bioscience Journal (UFU), v. 20, p. 107-114, 2004.

#### **Resumos publicados em anais de congressos**

1. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; Viviane Karoline Vivi ; Katiane M. Vaez ; Mariana Caselli Anzai . Interação entre microrganismos *Fonsecaea pedrosoi* e *Bacillus sp* in vitro e in vivo. In: 24 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasilia. 24 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
2. MACHADO, A. P. ; BORI, Adriana ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; MUSARRA, Ana Flávia ; CURY, Arlete . Efeito da associação entre cetoconazol e ácido undecilênico sobre trinta isolados clínicos de *Trichophyton rubrum*.. In: Congresso latinoamericano de micologia, 2005, Brasilia, 2000.

3. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; BOATTO, Humberto ; GIRÃO, Manoel ; SAIONARA, Maria . O papel dos parceiros sexuais nas vulvovaginites de repetição.. In: V Congresso latinoamericano de micologia, 2005, Brasília, 2000.
4. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; CAMARGO, Zoilo Pires de . Cromoblastomicose murina experimental.. In: V Congresso latinoamericano de micologia, 2005, brasília, 2000.
5. MACHADO, A. P. ; CAMARGO, Zoilo Pires de ; GOMPERTZ, Olga Fischman . Infecção murina com diferentes estruturas fúngicas de Fonsecaea pedrosoi.. In: Simpósio Nacional de Micologia Médica, 2005, Belém do Pará, 2000.
6. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; BOATTO, Humberto . ESTUDO MICOLÓGICO DAS VULVOVAGINITES EM SÃO PAULO . In: IV Congresso de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais da Sociedade Brasileira de Micologia, 2004.
7. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; KONNELL, Giovana Von . ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS FÚNGICAS EM MATERIAL CLÍNICO PELO MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA. SUA CORRELAÇÃO COM A RECUPERAÇÃO DE DERMATÓFITOS EM CULTIVO. In: IV Congresso de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais da Sociedade brasileira de Micologia, 2004.
8. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; GABRIELA, Maria . Neuropatia periférica e onicomicoses em pés de pacientes diabéticos. In: IV Congresso de Micologia, 2004, Ouro Preto. Anais da Sociedade Brasileira de Micologia, 2004.
9. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; GABRIELA, Maria . Pé diabético: importância da avaliação laboratorial no diagnóstico das onicopatias.. In: XII Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP, 2004, São Paulo. Anais do Congresso de Iniciação Científica/UNIFESP, 2004.
10. MACHADO, A. P. ; YAMASHITA, Jane Tomimori ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; RUETE, Lara . Feohifomicose em transplantado renal -relato de caso.. In: 58 Congresso Brasileiro de Dermatologia, 2003, Vitória. Anais da Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2003.
11. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; BORI, Adriana . Onycopaties caused by fungal agents (Sao Paulo - Brazil).. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis. Anais da Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.

12. MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; PIMENTA, Ana Teresa ; GONTIJO, Paulo Pinto ; GEOCZE, Stephan . Microorganisms isolated from endoscopes at two Brasilian Hospitals.. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis. Anais da Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.
13. MACHADO, A. P. ; LEÃO, Raquel Souza ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; HIRATA, Sergio Henrique ; YAMASHITA, Jane Tomimori . Dermatofiose palpebral causada por Microsporum gypseum.. In: 57º Congresso Brasileiro de Dermatologia, 2002, Porto Alegre. Anais da Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2002.
14. ★ MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman . Métodos de Conservação em Fungos Dimórficos. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001.
15. MACHADO, A. P. ; PIMENTA, Ana Teresa ; GONTIJO, Paulo Pinto . Contaminação de endoscópios em hospital universitário. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu. Anais da Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001.
16. ★ MACHADO, A. P. ; APARECIDA, Maria . Adjuvante Saponina na imunorregulação da leishmaniose. In: VIII Encontro de Iniciação Científica, 1999, Campo Grande. Anais do VIII Encontro de Iniciação Científica, CNPq, 1999.

### **Resumos publicados em anais de congressos(artigos)**

1. ★ MACHADO, A. P. ; GOMPERTZ, Olga Fischman ; GEOCZE, Stephan . Microbiological study of endoscopes from to Brazilian University Hospitals.. Gut - An International Journal of Gastroenterology and Hepatology, ESPANHA, 2003.

### **Demais tipos de produção bibliográfica**

1. ★ MACHADO, A. P. ; OGAWA, Marilia Marufugi . Candidíases. Sao Paulo: Lemos Editorial, 2002 (Fascículo de circulação nacional).

### **Produção artística/cultural**

- 1 MACHADO, A. P. ; Matheus, T . Cine Saúde Debate Cerrado - 2007. 2007 (Cinema).

## **Bancas**

### **Participação em bancas examinadoras**

#### **Trabalhos de Conclusão de Curso de graduação**

1. MACHADO, A. P.. Participação em banca de Suzana de Oliveira Nunes. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato glicólico de própolis e do óleo de copaíba em cepas de Candida.. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro Universitário de Várzea Grande.

## **Eventos**

### **Participação em eventos**

1. XXX Seminários de Estudos Biológicos e VII Encontro Regional de Botânicos do Centro-Oeste.Ações benéficas e deletérias dos microrganismos na saúde humana e animal com olhar sobre as micotoxinas. 2008. (Encontro).
2. 24 Congresso Brasileiro de Microbiologia.Interação entre os microrganismos Fonsecaea pedrosoi w Bacillus sp in vitro e in vivo. 2007. (Congresso).
3. II Jornada de Enfermagem em Feridas e Estomias de Mato Grosso.Infecções no pé diabético. 2006. (Congresso).
4. Mecanismos de Infecção e Vacinas. 2006. (Congresso).
5. Congresso Latino Americano de Micologia.Congresso Latino Americano de Micologia. 2005. (Congresso).
6. Cong. Intern. Pbmicose.Congresso Internacional de Paracoccidioidomicose. 2005. (Congresso).
7. Congresso de Micoses Amazonicas.Congresso de Micologia Médica. 2005. (Congresso).
8. IV congresso brasileiro de micologia.IV Congresso Brasileiro de Micologia. 2004. (Congresso).
9. XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia.XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2003. (Congresso).
10. .III Congresso Brasileiro de Micologia. 2001. (Congresso).
11. .XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2001. (Congresso).

12. Congresso Lat. Americano de Micol. Congresso latino-americano de Micologia. 2000. (Congresso).
13. .XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia. 1999. (Congresso).
14. .VIII Encontro de Iniciação Científica. 1999. (Encontro).
15. .XVI Semana Científica de Estudos Biológicos. 1999. (Outra).
16. .Xv Semana Científica de Estudos Biológicos. 1998. (Outra).
17. .XIV Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas. 1998. (Outra).
18. .II Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmaniose. 1998. (Outra).
19. .VIII Encontro de Biomédicos. 1997. (Encontro).

### **Orientações**

#### **Supervisões e orientações concluídas**

#### **Trabalho de conclusão de curso de graduação**

1. Katiane Miranda Vaes. Atividade antimicrobiana em amostras de óleo de espécies de Copaifera. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Mato Grosso. Orientador: Alexandre Paulo Machado.

#### **Iniciação Científica**

1. Mariana Anzai. Interação in vitro entre *Bacillus subtilis* e *Fonsecaea pedrosoi* e consequências in vivo. 2008. Iniciação Científica. (Graduando em Biologia) - Universidade Federal de Mato Grosso, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Alexandre Paulo Machado.
2. Viviane Karolina Vivi. estudo de antígenos de agentes de cromoblastomicose. 2006. Iniciação Científica. (Graduando em Biologia) - Universidade Federal de Mato Grosso, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Alexandre Paulo Machado.

# 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](#)