

**MOISES BATISTA DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE NOVOS MEIOS DE CULTURA PARA  
DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE *Fonsecaea pedrosoi* E ANÁLISE  
DA INFLUÊNCIA IÔNICA SOBRE O SEU DIMORFISMO**

**BELÉM**

**2006**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**MOISES BATISTA DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE NOVOS MEIOS DE CULTURA PARA  
DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE *Fonsecaea pedrosoi* E ANÁLISE  
DA INFLUÊNCIA IÔNICA SOBRE O SEU DIMORFISMO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular.**

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado.  
Departamento de Patologia – CCB – UFPA**

**BELÉM  
2006**

**MOISES BATISTA DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE NOVOS MEIOS DE CULTURA PARA  
DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE *Fonsecaea pedrosoi* E ANÁLISE  
DA INFLUÊNCIA IÔNICA SOBRE O SEU DIMORFISMO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular, avaliado pela seguinte banca examinadora**

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado  
Departamento de Patologia, UFPA**

**Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
Departamento de Fisiologia, CCB-UFPA**

**Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira  
Departamento de Farmácia, UFPA**

**Prof. Dr. José Luiz Vieira  
Departamento de Farmácia, UFPA**

**BELÉM  
2006**

## SUMÁRIO

DESCRIÇÃO	PÁGINA
<b>Capa</b> .....	i
<b>Folha de rosto</b> .....	ii
<b>Banca Avaliadora</b> .....	iii
<b>Sumário</b> .....	iv
<b>Agradecimentos</b> .....	vi
<b>Resumo</b> .....	08
<b>Abstract</b> .....	09
<b>1. Introdução</b> .....	10
1.1 A Cromoblastomicose.....	10
1.2 Clínica, Diagnóstico e Tratamento.....	10
1.3 Ecoepidemiologia.....	13
1.4 Agentes etiológicos.....	15
1.5 Caracteres Morfológicos de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> .....	15
1.6 Taxonomia.....	16
1.7 Biossíntese de melanina.....	16
1.8 Indução <i>in vitro</i> de células escleróticas.....	17
<b>2. Objetivos</b> .....	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específico.....	19
<b>3. Metodologia</b> .....	20
3.1 Preparo dos meios de cultura.....	20
3.1.1 Meios de Cultura Naturais.....	20
3.1.2 Meio de Cultura Quimicamente Definido.....	20
3.2 Amostras Fúngicas.....	20
3.3 Isolamento e contagem de conídios.....	21
3.4 Indução de células escleróticas.....	21
3.5 Coloração pelo Giemsa.....	21
3.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	21
3.7 Microscopia eletrônica de transmissão.....	22
3.8 Teste de esgotamento.....	23

3.9 Isolamento de DHN-Melanina de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> .....	23
3.10 Isolamento do anticorpo anti-melanina humano.....	24
3.11 Imunomarcção de melanossomos.....	24
<b>4. Resultados.....</b>	<b>25</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>42</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>43</b>

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pai supremo, fonte de energia.

A minha FAMÍLIA, minha mãe **Raimunda Maria Soares Batista**, sempre apoiando, permitindo e facilitando a concretização de meus sonhos, meu pai **Alberto Oliveira**, meus irmãos **Rui e Polyana** pela companhia nos mais diferentes momentos de minha estrada e pela alegria transmitida por eles no meu dia-a-dia. A **Rivanice** e **Leonardo** por toda a estima e incansável dedicação.

Ao LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA, em especial ao orientador e amigo Prof. Dr. **Claudio Guedes Salgado** pelos ensinamentos profissionais e pessoais, ao mestre **Jorge Pereira da Silva** que com seu inesgotável bom humor e palavras de incentivo, mas principalmente por sua amizade e por ter me conduzido ao Laboratório. Este abraço se estende a **Suellen, Maysa, Lívia, Simone, Kátia, Vânia e Silvia**, pela sólida amizade que construímos durante os anos e por todos os incontáveis dias e noites de trabalho harmonioso.

Ao Instituto Evandro Chagas pela colaboração do setor de MICROSCOPIA ELETRÔNICA, em especial ao amigo Prof. **José Antonio Picanço Diniz Jr.** e ao corpo técnico do biotério.

Ao grupo do laboratório de Biologia Celular de Fungos do Instituto Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Rozental, ao laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana Coordenado pelo Dr. Marcio Rodrigues do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, ao Laboratório de Estrutura de Superfície de Microorganismos do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Celuta Alviano e ao laboratório de Ultraestrutura Herta Mayer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aos AMIGOS (em ordem cronológica), que estiveram a meu lado no decorrer desta jornada, em especial a **Renata Tavares Nonato, Gisele Couceiro, Christovam Pamplona, Ana Carolina Scerni, Paola Cristina, Adriana Maciel, Cristiano Justino, Daniel Gomes, Silvia Bahadian Moreira e**

**Graziela Matiel Doimo**, pelas maravilhosas companhias, momentos juntos, sonhos realizados, apoio, respeito e carinho compartilhados.

Aos meus amigos **Murilo Belessi, Ierval Lobato, Gel, Ana, Alex, Dellana, André e Edilson** e aos componentes da equipe “*Salamandra Radical*” de tantas corridas e expedições **Paula Azevedo, Carolina Camargo e Rodrigo**

*A todos vocês um forte abraço!*

Este trabalho só foi possível em razão do apoio técnico-financeiro dos seguintes órgãos: Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Candia”; Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará (SESPA); Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente (SECTAM); Programa de Apoio a Pesquisa da Universidade do Estado do Pará (UEPA); PROINT - UFPA; e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## RESUMO

A cromoblastomicose é uma patologia cosmopolita de difícil tratamento, em que o Brasil registra a segunda maior prevalência mundial de casos, e o Estado do Pará a maior prevalência brasileira, com mais de 400 casos registrados em pouco mais de 50 anos. Caracteriza-se por seu aspecto clínico verrucoso, onde as lesões localizam-se principalmente nos membros inferiores, atingindo trabalhadores rurais. No diagnóstico laboratorial, ao exame micológico direto são observadas células escleróticas que se caracterizam por coloração acastanhada e septação multiplanária. Atualmente, estas células podem ser induzidas *in vitro* por processos dependentes de agentes “indutores”, como o DL-propranolol ou do Fator Agregador de plaquetas (PAF), que requerem cerca de 45 dias para a completa diferenciação. O surgimento de novos meios de cultura que promovam a indução de células escleróticas de forma mais rápida e eficiente é imperioso para estudos sistemáticos acerca da biologia, do metabolismo celular dos agentes da cromoblastomicose e da interação patógeno-hospedeiro. Nosso principal objetivo foi elaborar novos meios de cultura naturais e um meio quimicamente definido, a partir de conídios do principal agente da cromoblastomicose, o fungo melânico *Fonsecaea pedrosoi*. Para a obtenção dos meios naturais foram testadas as biomassas de *Euterpe oleracea*, *Bactris gasipaes*, *Eugenia stipitata*, *Malpigia glabra*, *Citrus limom*, *Citrus aurantifolia* e *Theobroma grandiflorum*, obtendo-se a indução em 10 dias com o meio de *B. gasipaes* e em 48 horas no meio de *T. grandiflorum*. Para a confecção do meio quimicamente definido foram testados os seguintes elementos: sódio, magnésio, potássio, ferro, manganês, cálcio, carboidratos e aminoácidos. Utilizando-se um meio de cultura com Dextrose, Nitrato de Potássio, Fosfato de Sódio Monobásico e de Sulfato de Magnésio, e pH 2.7 foi possível induzir células escleróticas em apenas 24 horas. Para a confirmação da similaridade das células escleróticas induzidas com escleróticas teciduais foram realizadas observações em microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura e transmissão, além do isolamento da melanina de conídios de *F. pedrosoi* e a marcação destes com o anticorpo anti-melanina humano, onde foi possível a identificação dos melanossomos. Estes resultados indicam que células escleróticas podem ser induzidas por meios naturais a temperatura ambiente, e possuem diferenciação dependente de variações iônicas e de pH.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose, também conhecida como cromomicose, dermatite verrucosa, feoesporotricose, cladosporiose, figueira, formigueiro, pé-musgoso, doença de Fonseca, doença de Pedroso, micose de Carrión, micose de Lane-Pedroso ou blastomicose negra (LACAZ C.S. & MARTINS E.J., 1991; RIPPON J.W., 1988) teve o primeiro caso observado foi em 1904 por Guiteras e Alexandrino Pedroso em Cuba e em 1911 ocorreu o primeiro diagnóstico no Brasil, no estado de São Paulo (LACAZ C.S. & MARTINS E.J., 1991). Esta é uma micose crônica da pele e do tecido subcutâneo, com aspecto verrucoso, causada por fungos demáceos após a implantação traumática de um dos agentes etiológicos (RUBIN *et al.*, 1991).

### 1.2. CLÍNICA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.

A cromoblastomicose apresenta aspectos clínicos bastante diversos, podendo-se encontrar lesões nodulares, verrucosas, tumorais, em placas, cicatriciais e tricofitoides, variando desde lesões localizadas até lesões disseminadas, caracterizando a cromoblastomicose cutânea disseminada (SALGADO *et al.*, 2005). Essa variação levou a tentativa de graduação da severidade do quadro em leve, moderado e grave, considerando-se o número, extensão e a disseminação das lesões (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992).

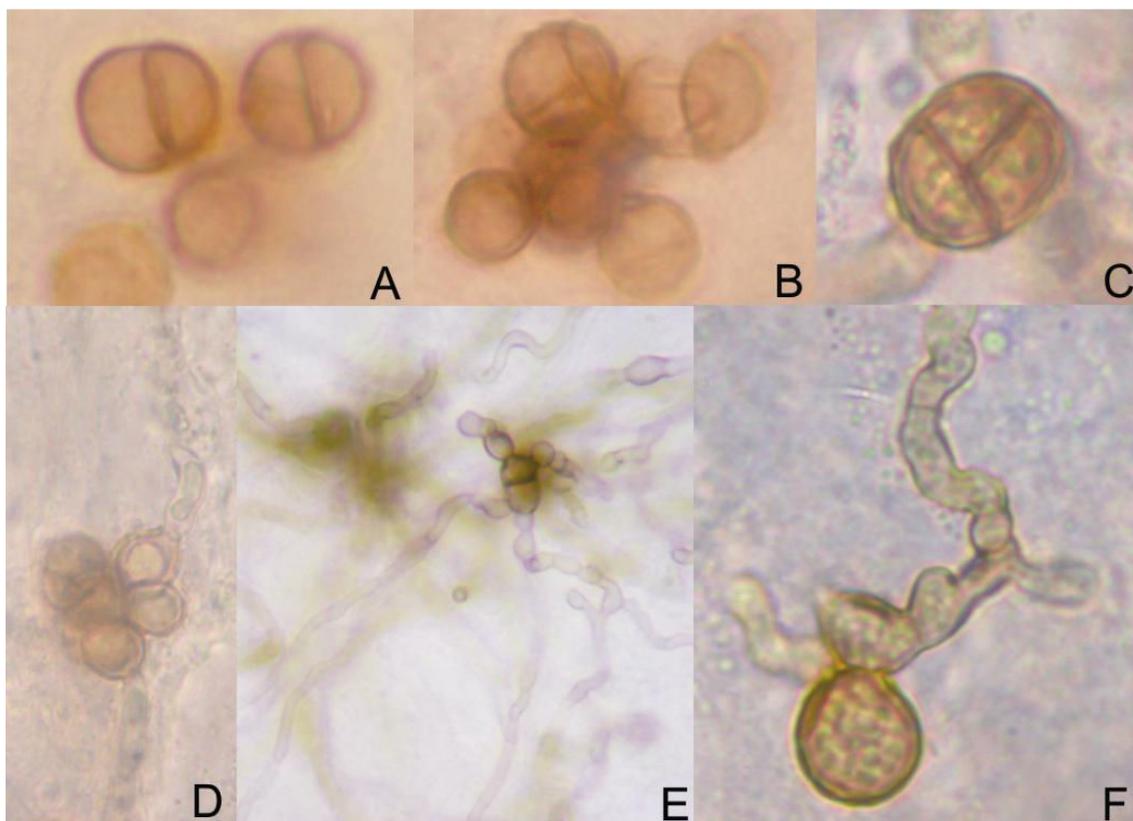
As lesões observadas em pacientes portadores de cromoblastomicose podem ser representadas pela presença de placas verrucosas, únicas ou múltiplas, de limites nítidos e bordas bem definidas, associadas a nódulos que podem ulcerar, tornando-se vegetantes, adquirindo aspecto papilomatoso semelhante a couve-flor (LACAZ C.S. & MARTINS E.J., 1991). As lesões localizam-se principalmente nos membros inferiores, atingindo pessoas que têm contato com áreas de floresta, como agricultores, lavradores e madeireiros (ESTERRE *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 1998) (figura 01).



**Figura 01. Diferentes aspectos clínicos das lesões de cromoblastomicose.** A) Lesões verrucosas, vegetantes com fibrose acentuada e atrofia cicatricial, B) Lesões verrucosas e nodulares, C) Lesão em placa, psoriasiforme, D) Lesões verrucosas, E) Lesões verrucosas e nodulares, disseminadas pelo tegumento (SALGADO *et al.*, 2005).

Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia. Pacientes atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária "Dr. Marcello Candia".

Os aspectos clínicos não são suficientes para que o diagnóstico de cromoblastomicose seja confirmado, sendo necessário o diagnóstico laboratorial, através do exame micológico direto, onde são observadas células arredondadas de coloração acastanhada denominadas de células escleróticas, corpos fumagóides ou células muriformes (MATSUMOTO, 1984). Estas células podem ser observadas isoladamente ou em pequenos grumos a partir do raspado da lesão ou mesmo do material purulento ali encontrado (MATTE *et al.*, 1997). As células escleróticas no tecido apresentam classicamente a divisão multiplanária, que se caracteriza pela formação de septos em diferentes planos celulares (RIPPON J.W., 1988) e comumente são também observadas hifas que se originam destas estruturas (figura.02).



**Figura 02. Exame micológico direto.** Células escleróticas observadas ao exame micológico direto da lesão de pacientes, evidenciando a coloração acastanhada e as septações multiplanárias (A, B, C e E), assim como a existência de hifas em alguns dos casos (C, D, E e F).

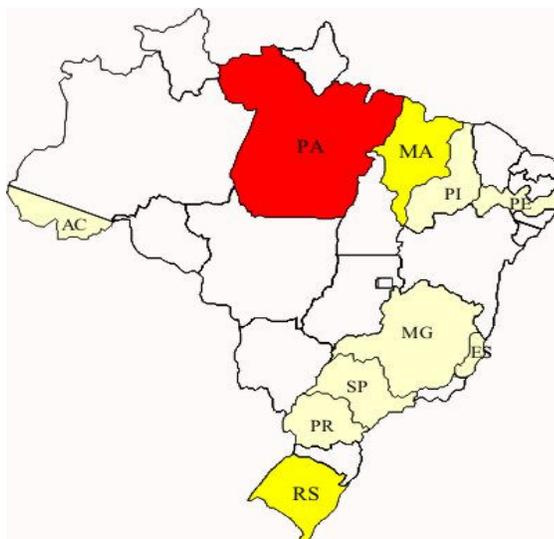
Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia. Material obtido de pacientes atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária "Dr. Marcello Candia".

O tratamento da cromoblastomicose não é padronizado, existindo inúmeros esquemas terapêuticos, desde a exérese cirúrgica para pequenas lesões até a crioterapia, que além de onerosa é bastante agressiva, deixando marcas permanentes no paciente tratado. Além de medicamentos como o itraconazol, utilizado em concentrações que variam entre 100 mg/dia (RESTREPO *et al.*, 1988) até 400mg/dia (UNGPAKORN & REANGCHAINAM, 2006), também podem ser empregadas outras drogas como terbinafina, anfotericina-B e 5-fluocitocina (VITALE *et al.*, 2003), com estudos demonstrando diferentes graus de sucesso, além dos tratamentos serem longos e dispendiosos (BONIFAZ *et al.*, 1997; ESTERRE *et al.*, 1996b).

Na tentativa de obter esquemas terapêuticos eficientes, diferentes drogas têm sido estudadas, assim como esforços vêm sendo canalizados no sentido de analisar as variações das cepas de *F. pedrosoi* (ANDRADE *et al.*, 2004) e a



Paulo, Espírito Santo, Pernambuco, Piauí, Maranhão, Acre e Pará (figura 04), sendo a região Centro-Oeste a única no país sem registro de casos.



**Figura 04. Distribuição nacional dos casos publicados de cromoblastomicose.**

Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia. Diagrama montado no Laboratório de Dermato-Imunologia, utilizando as diferentes fontes disponíveis na literatura. Branco (sem registro de caso), amarelo claro (até 10 casos registrados), amarelo vivo (entre 10 e 100 casos registrados) e vermelho (mais de 100 casos)

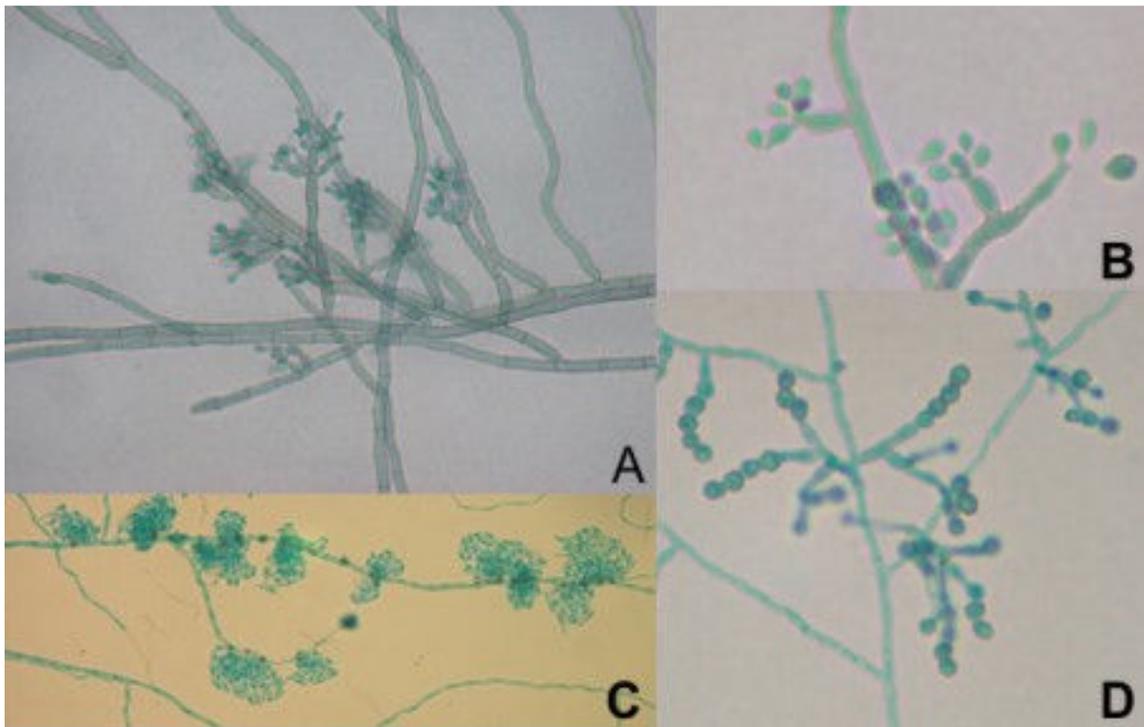
O Estado do Pará é a principal área endêmica do País com 325 casos registrados em 55 anos (SILVA *et al.*, 1998). Recentemente entre os anos de 2001 e 2006, foram diagnosticados na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Candia” (URE Marcello Candia) mais de 80 novos casos de cromoblastomicose (dados não publicados), ficando o estado do Rio Grande do Sul com a segunda maior prevalência nacional apresentando 100 casos registrados entre os anos de 1963 e 1998 (MINOTTO *et al.*, 2001).

O isolamento dos agentes da cromoblastomicose de material ambiental é comum, ocorrendo a partir de material vegetal vivo (SALGADO *et al.*, 2004), em decomposição ou diretamente do solo (GEZUELE *et al.*, 1972), sendo relatado por grande parte dos pacientes atendidos na URE Marcello Candia que o início da lesão ocorreu após traumatismo com este tipo de material, assim como ocorre com os coletores e quebradeiras dos babaçuais maranhenses (SILVA *et al.*, 1995), já foi

possível a observação das formas patológicas em cortes histológicos de tecidos vegetais de cactáceas (ZEPPENFELDT *et al.*, 1994).

#### 1.4. AGENTES ETIOLÓGICOS

A cromoblastomicose é causada por uma variedade de fungos melânicos, que são agrupados em quatro principais gêneros, a saber: *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* (BARBA-GOMEZ *et al.*, 1992) e *Fonsecaea*, sendo este considerado o principal agente (MCGINNIS, 1983; SILVA *et al.*, 1998) (figura 05). Em alguns casos, podemos encontrar ainda o gênero *Rhinocladiella* (ARANGO *et al.*, 1998), sendo que todos estes apresentam ocorrências saprofíticas bem documentadas (RIOS-FABRA *et al.*, 1994).

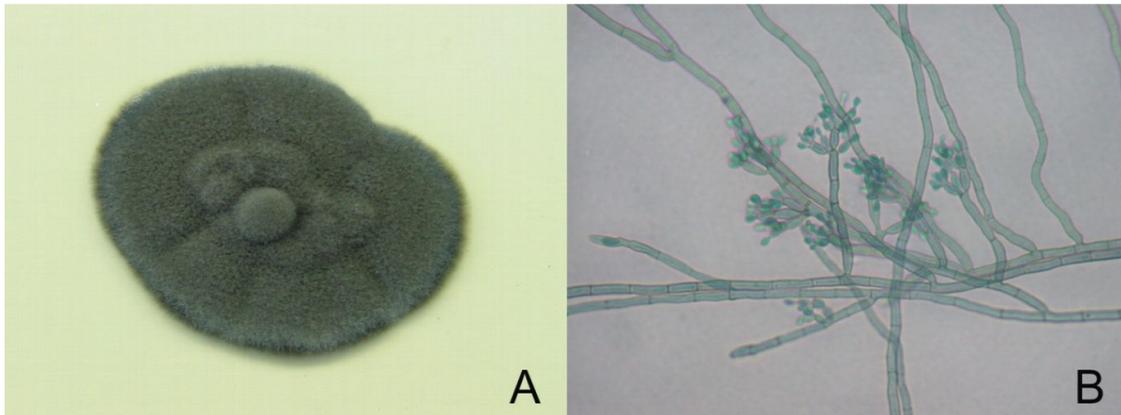


**Figura 05: Principais agentes da cromoblastomicose, A) *Fonsecaea pedrosoi*, B) *Phialophora verrucosa*, C) *Exophiala spinifera* e D) *Cladophialophora carrioni*.**

Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia.

#### 1.5. CARACTERES MORFOLÓGICOS DE *Fonsecaea pedrosoi*.

A macroscopia da colônia de *F. pedrosoi* é aveludada de anverso escuro, indo do verde-oliva ao negro, e reverso também negro, apresentando uma conidiação do tipo holoblástica e simpodial, onde os conídios são formados com tempos diferentes pelas células conidiogênicas e não rompem a parede destas para exteriorizarem-se, sendo essa conidiação conhecida como do tipo Cladosporium (figura 06) (DE HOOG et al., 2001).



**Figura 06: Aspectos morfológicos de *Fonsecaea pedrosoi*.** A) Macroscopia do anverso da cultura e B) Microcultivo revelando os conidióforos tipo cladosporium, com a conidiação simpodial.  
Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia.

## 1.6. TAXONOMIA

Os agentes da cromoblastomicose têm baixo poder patogênico e apresentam um dimorfismo que depende tanto do hospedeiro como da cepa inoculada (MATSUMOTO, 1984), contudo este mecanismo ainda não está esclarecido (WALTER *et al.*, 1982). O gênero *Fonsecaea* está inserido taxonomicamente na divisão Amastigomycota, classe Hyphomycetes, onde estão agrupadas espécies pertencentes a duas outras classes: Ascomycetes e Basidiomycetes que apresentam a parte sexuada do seu ciclo, muito rara, desconhecida ou mesmo inexistente, sendo então os Hyphomycetes uma classificação artificial que incorpora os estados anamórficos dos Ascomycetes e Basidiomycetes e inseridos na família Dematiaceae (DE HOOG *et al.*, 2000).

A taxonomia do principal agente da cromoblastomicose fica assim estabelecida:

Reino: Fungi  
Divisão: Amastigomycota  
Classe: Hyphomycetes  
Família: Dematiaceae  
Gênero: *Fonsecaea*  
Espécie: *Fonsecaea pedrosoi*

### 1.7. BIOSÍNTESE DE MELANINA

A biossíntese de pigmentos melânicos, nos seres humanos, ocorre pela ação de uma fenoloxidase, que oxida a tirosina à L-dopa, até a sua autopolimerização e o surgimento da melanina, este processo ocorre em uma organela especializada denominada melanossomo, que pode ser visualizada com mais facilidade nos melanócitos (Polak, 1990, Dell'Angelica, 2003).

Estes pigmentos melânicos foram descritos em fungos em 1960, contudo estudos revelaram que este não é um componente essencial à estes microorganismos (Wheller & Bell, 1988), a via biossintética dos pigmentos ocorrerá em duas vias principais: 1) a via da dihidroxifenilalanina, ou via DOPA, por oxidação da L-dopa formando similares aos observados em seres humanos semelhantes aos da via humana ou 2) via do dihidroxinaftaleno, ou via DHN, iniciando sua biossíntese a partir do acetato, derivado do ciclo de Krebs, sendo esta a via descrita como principal para os Ascomicetos e Deuteromicetos (Kogej et al., 2004).

A deposição da melanina, nas células fúngicas, ocorre tanto no citoplasma (Polak, 1990), quanto na parede celular, já sendo estes os possíveis locais da produção de melanina nestes organismos. Contudo, os melanossomos, têm sido o local atribuído à síntese de melanina em fungos demáceos (Franzen et al., 1999), mas ainda não caracterizados no fungo melânico principal agente da cromoblastomicose o *Fonsecaea pedrosoi*.

### 1.8. INDUÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS ESCLERÓTICAS

O processo de indução *in vitro* das células escleróticas dos agentes de cromoblastomicose vem sendo estudado há quase cinquenta anos, inicialmente com os trabalhos de Margarita Silva (1957) que, baseada em trabalhos similares realizados com outros fungos, elaborou um meio de cultura, por ela denominado “linfa sintética” composto por: glicose (0,7g), uréia (0,18g), NaCl (7,0g), MgCO<sub>3</sub> (0,1g), CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,035g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,38g), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,031g), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,072g) e Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (0,03g) diluídos em 990ml de água destilada, e para a complementação protéica foi usado plasma humano, extratos alcoólicos de cabelos e unhas, obtendo células esféricas articuladas em fragmentos de hifas similares a clamidósporos (SILVA M., 1957).

Posteriormente Ibrain-Granet (1985), utilizando uma cepa de *F. pedrosoi* obteve células arredondadas, mas que por não apresentarem septação característica das escleróticas observadas *in vivo*, foram então denominadas pelo autor, como *yeast-like*. Este experimento foi realizado em caldo Sabouraud com pH ajustado para 2,5, sob agitação constante a 20°C, com o fungo sendo transferido para outro frasco após 8 dias, nas mesmas condições, e somente após 30 dias eram observadas as células *yeast-like* (IBRAIN-GRANET O., 1985).

Mendoza (1993), propôs um meio quimicamente composto por: 3g de NaNO<sub>3</sub>; 1g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,265g de NH<sub>4</sub>Cl e 0,003g de Tiamina, a adicionando-se 30g de glicose, e com o pH ajustado para 2,5 obteve sucesso no processo de transformação das hifas e conídios em células escleróticas utilizando Ca<sup>+</sup>. Resultado similar foi obtido com a utilização de EGTA, 2 μmol<sup>-1</sup>, sendo que ambos os experimentos foram realizados com cultivos a 25°C, necessitando cerca de 21 dias para a diferenciação (MENDOZA *et al.*, 1993).

As formas teciduais (células escleróticas ou células muriformes) de *F. pedrosoi* atualmente são induzidas *in vitro* da seguinte forma: a massa fúngica é cultivada inicialmente em um litro de meio Butterfield (glicerol 5ml, MgSO<sub>4</sub> 0.1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,5g, biotina 5x10<sup>-5</sup>g, tiamina-HCl 10<sup>-4</sup>g) com pH 6,5, em

alíquotas de 250ml à temperatura ambiente por 20 dias, obtendo-se exclusivamente micélio, que é transferido para 500ml de meio Butterfield pH 2,7, acrescido de DL-propranolol em uma concentração final de 800mM e cultivado sob agitação a 37°C por 45 dias, obtendo-se então as células escleróticas similares às observadas *in vivo* (ALVIANO *et al.*, 1992b; DA SILVA *et al.*, 2002).

As células escleróticas também podem ser obtidas conservando-se a técnica acima descrita, substituindo-se o  $\beta$ -bloqueador pelo Fator Agregador de Plaquetas (PAF) em uma concentração final de  $10^{-6}$ M, no entanto, sem reduzir o tempo de indução ou os recursos técnicos exigidos (ALVIANO *et al.*, 2003c).

A indução *in vitro* das formas teciduais dos agentes de cromoblastomicose é fundamental para a compreensão do processo patológico tecidual causado pelo fungo no hospedeiro. A indução destas células atualmente tem como principal desvantagem sua dependência de bloqueador de canais de cálcio DL-propranolol ou do PAF, que somado as dificuldades técnicas da padronização de parâmetros laboratoriais, como temperatura específica e agitação constante, além da lentidão do processo. Novos meios de cultura assim como o entendimento das vias metabólicas deste organismo. Novos meios para obtenção de células escleróticas de maneira mais rápida e que possibilitem o acompanhamento do processo de indução por microscopia ótica invertida, permitirão que possamos avaliar a ação de drogas nas formas teciduais dos diferentes agentes da cromoblastomicose, possibilitando também experimentos de interação das formas teciduais com diferentes células dos sistemas sistema imune, levando a compreensão dos aspectos fisiopatológicos da cromoblastomicose.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Geral

Elaborar novos meios de cultura para diferenciação celular de *Fonsecaea pedrosoi* e analisar a influência de componentes destes meios na indução de células escleróticas, formas teciduais do fungo.

### 2.2. Específicos

- 2.2.1. Escolher diferentes fontes de biomassa natural para a elaboração dos meios de cultura.
- 2.2.2. Padronizar a técnica para a produção de meios de cultura que tenham como base biomassa vegetal.
- 2.2.3. Elaborar um meio de cultura quimicamente definido que realize a indução de conídios de *Fonsecaea pedrosoi* em células escleróticas.
- 2.2.4. Acompanhar as alterações morfológicas dos conídios por microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão e varredura.
- 2.2.5. Realizar de testes de esgotamento do meio quimicamente definido.
- 2.2.6. Isolar melanina a partir da cultura de *Fonsecaea pedrosoi*
- 2.2.7. Isolar o anticorpo anti-melanina do soro de pacientes de cromoblastomicose para utilizar na marcação da melanina do fungo *in vitro*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Preparo dos meios de cultura

##### 3.1.1. Meios naturais

A preparação dos meios de cultura foi padronizada da seguinte maneira: 150g de biomassa vegetal, onde o mesocarpo das frutas selecionadas são triturados e diluídas com água bidestilada e deionizada estéril, em uma proporção final de 1:3. Essa solução é homogeneizada, centrifugada a 5000rpm por 5 minutos e o sobrenadante é filtrado em membrana de 0,22 $\mu$ m, sendo os pHs ajustados entre 2,5 e 3,0 com a utilização de ácido clorídrico ou ácido cítrico em soluções 1M. O produto final é esterilizado em autoclave antes de ser utilizado nos experimentos. A preservação dos meios é feita a 4°C por um período superior a 6 meses, sem alteração na transparência ou no pH.

##### 3.1.2. Meio quimicamente definido

O meio de cultura quimicamente definido para a indução das células escleróticas foi desenvolvido a partir de revisão dos meios de cultura quimicamente definidos descritos em literatura, que foram comparados entre si, estabelecendo-se um meio mínimo para a indução de células escleróticas. Para isso analisamos os diferentes compostos químicos contendo: 1) Sódio, 2) Magnésio, 3) Potássio, 4) Manganês, 5) Cálcio, 6) Ferro, 7) Carboidratos e 8) Aminoácidos. Estes compostos foram testados em diferentes combinações, concentrações e pHs.

#### 3.2. Amostras Fúngicas.

A cepa de *F. pedrosoi* utilizada nos experimentos de indução das células escleróticas a partir das formas filamentosas foi isolada em meio de cultura Micosel<sup>®</sup> a partir de material biológico obtido de raspados da lesão de um dos pacientes portadores de cromoblastomicose que foi atendido na URE Marcello Candia, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta de material é

parte do procedimento padrão para o diagnóstico e posterior tratamento dos pacientes. A cepa é mantida em meio ágar Sabouraud, devidamente identificada por aspectos laboratoriais (macroscopia de colônia e microcultivo em lâmina), estando catalogada no acervo da micoteca do Laboratório de Dermato-Imunologia sob a inscrição LDI-16.

### 3.3. Isolamento e contagem de conídios.

O protocolo estabelecido para o isolamento e contagem de conídios inicia-se com a remoção da massa fúngica existente na superfície das colônias cultivadas por 15 dias em Ágar-Batata (meio estimulador de conidiogênese), que é transferida para 10ml de soro fisiológico, em tubo tipo Falcon de 15ml e agitada em vortex por 30 segundos para desagregar os conídios dos conidióforos. Em seguida, a suspensão é filtrada através de uma membrana de nylon, para a retenção das hifas e submetida a centrifugação de 4000rpm por 5 minutos, sendo o volume final reduzido à 1ml para contagem em câmara de Neubauer.

### 3.4. Indução de células escleróticas

A indução das células escleróticas nos diferentes meios foi realizada em placas de cultivo celular com 24 poços de fundo chato (TPP, Suíça), à temperatura ambiente, sem agitação, sendo utilizado como antibiótico a gentamicina na concentração final de 20µg/ml. Para a certificação de que este componente não tem interferência no processo de indução *in vitro* também foram realizados experimentos sem a presença de antibióticos, tomando-se todas as precauções para evitar a contaminação do material por bactérias.

### 3.5. Coloração pelo Giemsa

As células escleróticas obtidas nos meios de cultura foram aderidas em lamínulas recobertas com Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), fixadas em metanol durante 1 minuto, coradas por 5 minutos com solução 5% de Giemsa diluída em água tamponada e montadas entre em uma lâmina de vidro.

### 3.6. Microscopia eletrônica de varredura

Para análise ultraestrutural, as células escleróticas obtidas foram centrifugadas a 1500rpm por 3 minutos para a formação de *pellet* que foi fixado por 2 horas à temperatura ambiente em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M e pH7.2. Após esse período, as células foram aderidas à lamínula previamente recoberta com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA), seguindo-se três lavagens no mesmo tampão, e a pós-fixação com solução de OsO<sub>4</sub> (tetróxido de ósmio, Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA) à 1%, 0,8% de ferricianeto de potássio, 5mM CaCl<sub>2</sub> em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 à temperatura de 4°C por uma hora. Para desidratação, realizou-se a passagem do material em acetona diluída a 30, 50, 70 e 90%, com 20 minutos para cada etapa e duas vezes de 20 minutos em acetona à 100%, seguidas por um processo de secagem por ponto crítico de CO<sub>2</sub> (EMITECH-K850, Inglaterra). A seguir, as lâminas são fixadas em suporte (*stub*), metalizadas com ouro (EMITECH-K550, Inglaterra) e observadas no microscópio eletrônico de varredura modelo LEO1450VP (LEO, Inglaterra).

### 3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

As células escleróticas obtidas foram fixadas a temperatura ambiente por 2 horas em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M e pH 7,2. Após 2 horas de fixação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e pós-fixadas em solução contendo 1% OsO<sub>4</sub>, 0,8% de ferricianeto de potássio e 5mM CaCl<sub>2</sub> em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 à temperatura de 4°C por uma hora. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas 3 vezes no mesmo tampão e desidratadas com passagem em uma série de acetona em água a 30, 50, 70 e 90%, com tempo de 20 minutos para cada etapa e duas vezes 20 minutos em acetona 100%. Após desidratação, as células foram infiltradas com uma mistura epon/acetona na proporção 1:3, 1:2, 1:1, 2:1 e 3:1, respectivamente, por 12 horas e em epon puro por 24 horas. Após polimerização em epon por 48 horas, cortes ultrafinos foram obtidos e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 900, Alemanha).

### 3.8. Teste de esgotamento

Visando conhecer qual ou quais os compostos que são exauridos durante o processo de indução e manutenção das células escleróticas, após transcorrido o tempo necessário para o início da reversão do processo de indução de células escleróticas, o meio utilizado foi retirado dos poços, e por centrifugação a 2500 RPM por 5 minutos, as células escleróticas foram removidas o meio teve o seu pH reajustado para 2,68, e os componentes do meio quimicamente definido foram individual e coletivamente acrescidos, e novo experimento de indução foi realizado.

### 3.9. Isolamento de DHN-Melanina de *Fonsecaea pedrosoi*

A cepa de *F. pedrosoi* foi cultivada, sob agitação, em dois litros de meio Czapeck-Dox (sacarose 30g, KCl 0,5g, NaNO<sub>3</sub>, 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, MgSO<sub>4</sub> 0,5g e FeSO<sub>4</sub> 0,01g) por um período de 15 dias para a obtenção de massa fúngica suficiente para a realização do experimento.

Após a obtenção da massa fúngica no meio de cultura líquido é alcalinizado para uma concentração de 0,5N, utilizando-se aproximadamente de 2 gramas de hidróxido de sódio (NaOH) por litro de meio de cultura utilizado, esta solução é colocada sob agitação *overnight*. Realiza-se então a precipitação, as moléculas de melanina pela reação de neutralização por ácido clorídrico (HCl) para um pH entre 2,5 e 3,0 e procede-se nova incubação a 4°C seguida por uma filtração em papel (Filtrak, Alemanha).

Após a filtração de todo o volume, o papel deve ser colocado em agitação em um volume de 2 litros de água destilada, permitindo assim a liberação da proteína. Esta solução deve ser deixada *overnight* para que ocorra a precipitação da melanina, descartando-se o sobrenadante e centrifugando-se a 7.000 rpm por 5 minutos o resto do material, permitindo assim a formação de um *pellet* que deve ser lavado em tampão PBS e liofilizado.

### 3.10. Isolamento do anticorpo anti-melanina humano

A melanina liofilizada obtida é bloqueada com albumina bovina (10mg/ml), e posteriormente colocada em contato, sob agitação a 4°C, com o soro de pacientes de cromoblastomicose diluído em 1:1 com PBS pH 7,2.

O pellet formado por uma centrifugação (5000 rpm por 5 minutos) do soro com a melanina foi eluído com soluções de Glicina 0,1M e Tris 01M e a quantificação realizada em espectrofotômetro com leitura em 280nm. A concentração da solução contendo o anticorpo anti-melanina foi realizada com a utilização de polietilenoglicol.

### 3.11. Imunomarcacão de melanossomos

Para o experimento de microscopia eletrônica de transmissão, os conídios de *F. pedrosoi* foram fixados, desidratados e incluídos em resina de unicryl. Realizou-se cortes ultrafinos que foram colocados em contato com o anticorpo anti-melanina diluídos em PBS em concentração final de 1:20, e com anticorpo-secundário anti-humano (1:100) acoplado a partículas de ouro-coloidal 10nm, com observação realizada no equipamento JEOL 1200 (Laboratório Herta-meyer – Instituto de Biofísica Carlos Chagas filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro).

#### 4. RESULTADOS

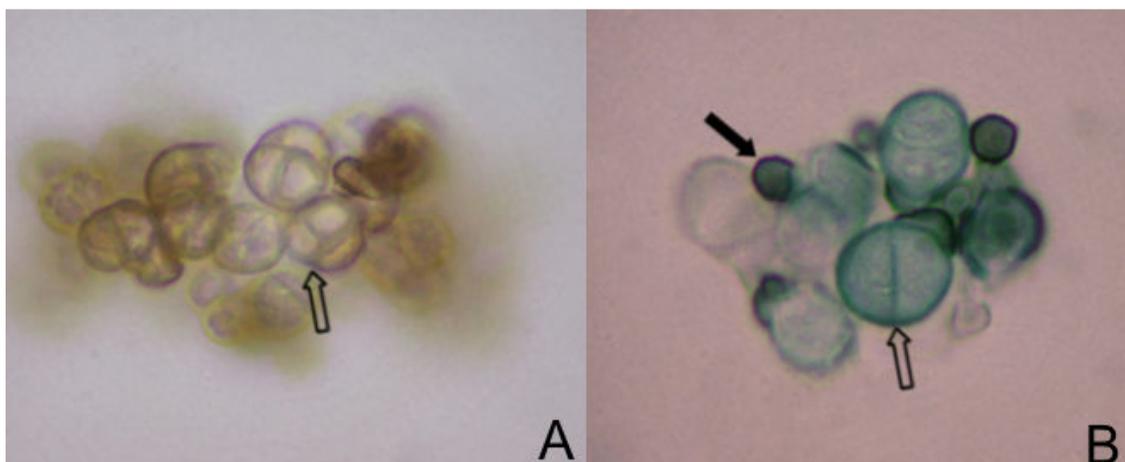
Para a seleção de quais fontes naturais seriam capazes de produzir a indução de células escleróticas, foram testados os mesocarpos das seguintes frutas: Açaí (*Euterpe oleracea*), Pupunha (*Bactris gasipaes*), Araçá-Boi (*Eugenia stipitata*), Acerola (*Malpigia glabra*), Limão (*Citrus limom*), Limão Galego (*Citrus aurantifolia*), e Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), gerando com a metodologia proposta (item 3.1.1) um caldo nutritivo e de transparência que permite o acompanhamento dos experimentos com a utilização de um microscópio invertido.

Os meios naturais obtidos com a metodologia proposta que tiveram como base as biomassas de *T. grandiflorum* e *B. gasipaes*, nas seguintes condições de cultura: 1) temperatura ambiente, 2) sem agitação e 3)  $3 \times 10^3$  conídios/ml promoveram a indução das células escleróticas a partir das formas filamentosas de *F. pedrosoi*

Nos meios de *T. grandiflorum*, após 48 horas de cultivo à temperatura ambiente, sem agitação, observou-se células escleróticas com coloração, septação e tamanhos similares às células observadas *in vivo*, conservando essa morfologia por aproximadamente 10 dias, sem haver a necessidade de renovação do meio (figura 07), iniciando após esse período a formação de hifas.

O meio natural que tem a base em biomassa de *B. gasipaes* apresentou a indução após 10 dias de cultivo, mantendo a morfologia clássica de célula escleróticas por 30 dias, sem haver necessidade de renovação do meio de cultura, iniciando-se após esse período a formação de hifas.

A coloração pelo Giemsa permitiu avaliar a similaridade morfológica existente entre as escleróticas obtidas *in vitro*, em todos os meios aqui apresentados, com as observadas *in vivo*, principalmente no que se refere ao modo de divisão e a formação da parede celular espessa, características dos agentes de cromoblastomicose (figura 07).



**Figura 07. Células escleróticas obtidas nos meios naturais.** As células escleróticas observadas a fresco, sem coloração (A), apresentam coloração acastanhada e septos multiplanários bem definidos (seta). A coloração pelo Giemsa (B) permite visualizar os restos de conídios (seta escura) que originaram as células escleróticas novas, onde evidenciam-se as septações clássicas (seta vazada). Barra 10µm.

Os meios naturais de *T. grandiflorum* (cupuaçu), *G. speciosa* (pupunha) e *C. limon* (limão) promoveram a indução das células escleróticas de *F. pedrosoi* em um período de tempo muito inferior (a indução ocorre após 48 horas) às técnicas hoje disponíveis, o processo de indução agora pode ser realizado em apenas dois dias, reduzindo a 5% o tempo exigido pelos meios convencionais. Outro benefício destes meios de cultura está na independência do processo de indução dos indutores como o DL-Propranolol e o PAF ou quelantes de  $Ca^{+2}$  como o EGTA.

O desenvolvimento do meio de cultura quimicamente definido para a indução das células escleróticas teve início a partir da realização de um levantamento dos principais meios de cultura quimicamente definidos, com maior relevância para aqueles relacionados com o dimorfismo dos agentes de cromoblastomicose, quando foram selecionados os seguintes compostos: Sódio (fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bi-básico, citrato de sódio e cloreto de sódio), Potássio (fosfato de potássio bi-básico, nitrato de potássio e cloreto de potássio), Cálcio (carbonato de cálcio e cloreto de cálcio), Magnésio (sulfato de magnésio e carbonato de magnésio), Manganês (sulfato de manganês), ferro (sulfato de ferro), Carbono (dextrose, maltose, glicose e lactose) e Nitrogênio (extrato de levedura, extrato de carne e peptona bacteriológica).

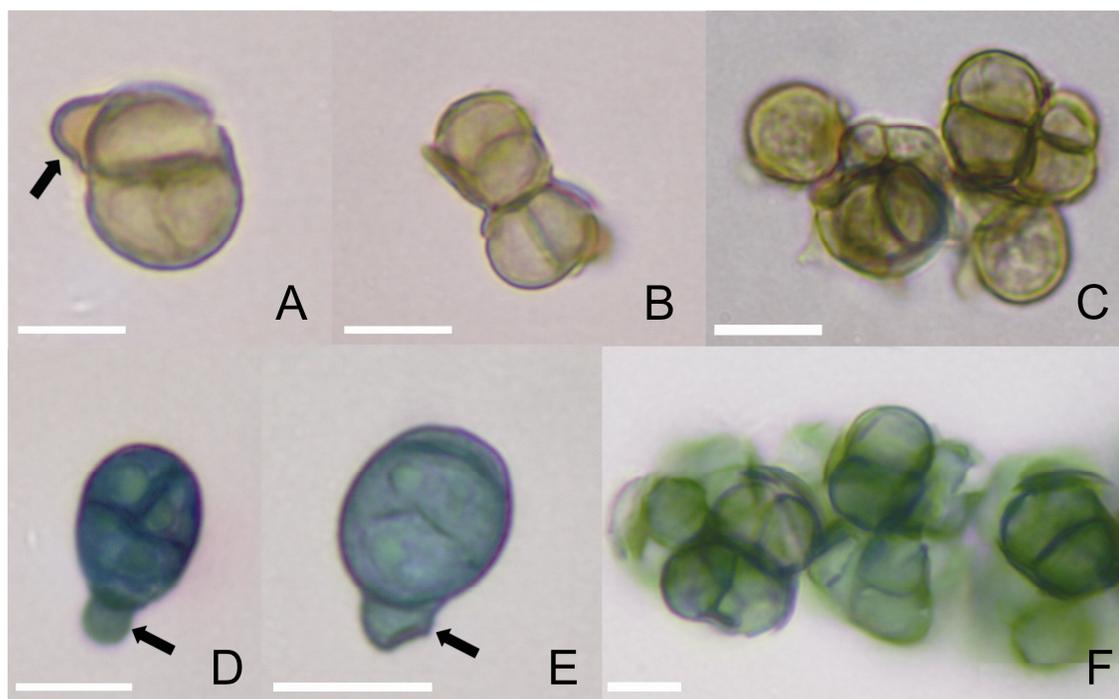
Cada um destes compostos foram testados individualmente e em grupos de 2, 3, 4, 5, 6 e 7 elementos de cada um dos principais elementos químicos. Foram ainda testados o pHs (iniciando em 5,0 e gradualmente decrescendo até 1,5) e diferentes temperaturas de cultivo (37°C e ambiente) para a determinação dos parâmetros de cultivo.

Inicialmente foram testadas diferentes fontes de aminoácidos, contudo mudanças nas fontes e concentrações não mostrou qualquer influência no processo de indução ou de manutenção das células escleróticas, diferentemente dos resultados observados nos testes com as fontes de carbono, onde diferentes fontes apresentaram o mesmo comportamento, a ausência inibia o processo de indução, enquanto a diminuição da concentração dos açúcares revelou baixas no período de manutenção das células escleróticas, produzindo rapidamente a reversão do processo pela formação de hifas. Nossos resultados revelaram também a independência do processo de indução da presença ou ausência dos íons  $Mn^{+}$  e  $Ca^{+}$ .

Após a observação da ação dos diferentes elementos testados sobre os conídios, isoladamente ou em conjunto, definiu-se um meio mínimo para diferenciação de conídios em células escleróticas constituído unicamente por 1000ml de água bidestilada, acrescida de 40,0g de Dextrose, 19g de Nitrato de Potássio, 40g de Fosfato de Sódio Monobásico e 9g de Sulfato de Magnésio, com o pH ajustado para 2.7 (quadro 01). Assim como nos meios naturais, a indução das células escleróticas ocorreu após 48 horas de cultivo em temperatura ambiente e sem agitação (figura 08). O modo de processamento de novos meios de cultura, bem como a descrição do meio de cultura quimicamente definido gerou uma solicitação de patente ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI), e encontra-se atualmente aguardando a chancela do órgão (Processo número 000385/05).

**Quadro 01: Comparativo das composições iônicas testadas.** Desconsiderando as diferentes concentrações e fontes testadas, em destaque o meio mínimo quimicamente definido que induz a diferenciação de conídios em células escleróticas clássicas.

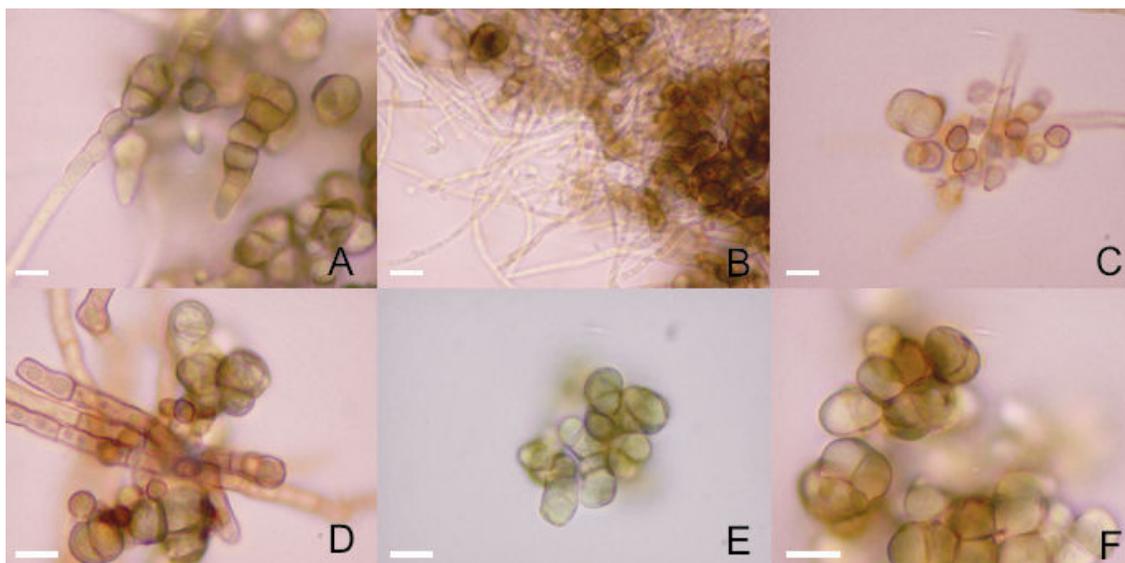
Componentes do meio								Tipos Celulares Obtidos
pH	Na	Mg	K	Glicose	Ca	Mn	Fe	
2,68	+	+	+	+	+	+	+	Células escleróticas clássicas
2,68	+	+	+	+	-	+	+	Células escleróticas clássicas
2,68	+	+	+	+	+	-	+	Células escleróticas clássicas
2,68	+	+	+	+	+	+	-	Células escleróticas clássicas
2,68	+	+	+	+	-	-	-	Células escleróticas clássicas
2,68	-	+	+	+	+	+	+	Manutenção de conídios
2,68	+	-	+	+	+	+	+	Células Escleróticas reduzidas
2,68	+	+	-	+	+	+	+	Manutenção de conídios
2,68	+	+	+	-	+	+	+	Manutenção de conídios
4,00	+	+	+	+	+	+	+	Formação de hifas em 24 horas
4,00	+	+	+	+	-	+	+	Formação de hifas em 24 horas
4,00	+	+	+	+	+	-	+	Formação de hifas em 24 horas
4,00	+	+	+	+	+	+	-	Formação de hifas em 24 horas
4,00	+	+	+	+	-	-	-	Formação de hifas em 24 horas
4,00	-	+	+	+	+	+	+	Formação de hifas em 24 horas
4,00	+	-	+	+	+	+	+	Formação de hifas em 24 horas
4,00	+	+	-	+	+	+	+	Formação de hifas em 24 horas
4,00	+	+	+	-	+	+	+	Formação de hifas em 24 horas



**Figura 08: Células escleróticas induzidas em meio quimicamente definido, não coradas (A,B e C) ou coradas pelo Giemsa (D,E e F).** Em A, D e E observa-se a células esclerótica clássica, isolada, originária de apenas um conídio (setas). Em B, C e F, verifica-se a presença de grupos de

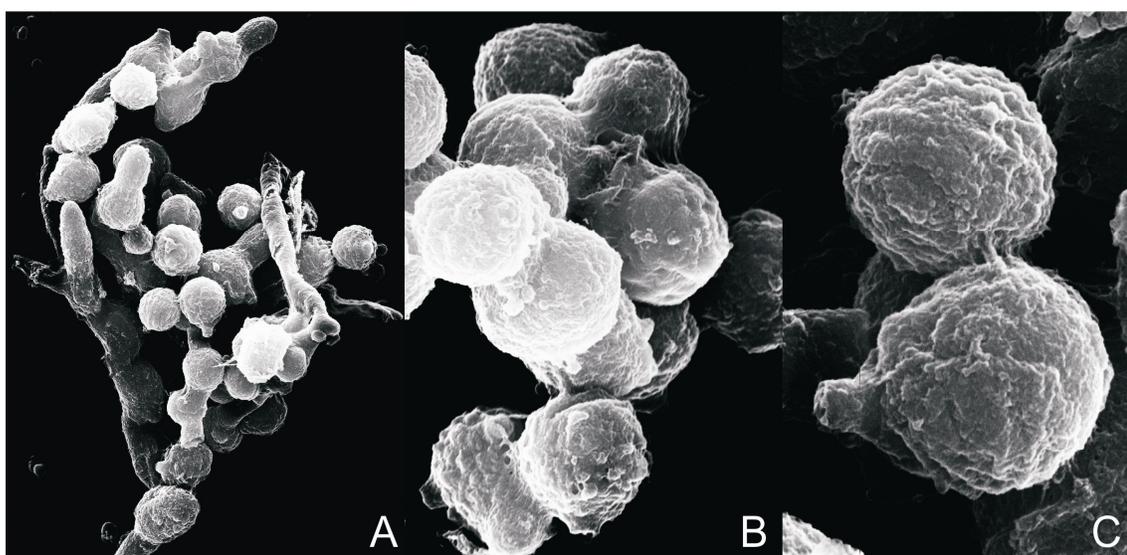
células escleróticas pigmentadas, com parede espessa e septação multiplanária, idênticas às células encontradas no tecido lesionado, *in vivo*. Barra 10µm.

Os experimentos de esgotamento revelaram que quando novos conídios são colocados em meio já exaurido, a formação de células escleróticas também se processa em 48 horas. No entanto, transcorridas 72 horas de cultivo, estas células iniciam a diferenciação para hifas. Quando o meio exaurido é complementado unicamente com dextrose a indução gera células escleróticas clássicas que se mantém por um período médio de 13 dias. A complementação com sulfato de magnésio também é capaz de gerar células escleróticas, contudo são observadas conídios sem alteração morfológica, enquanto que na complementação com nitrato de potássio o processo de indução ocorre de forma bastante irregular, com a presença de conídios aumentados de volume e poucas escleróticas. Na complementação com todos componentes, a indução é restabelecida, a complementação com fosfato de sódio monobásico leva ao surgimento de hifas a partir das células escleróticas em 48 horas, quando não se processa a suplementação os conídios colocados no meio são induzidos a células escleróticas de forma normal, contudo o processo de reversão ocorre em 72 horas. (figura 09).



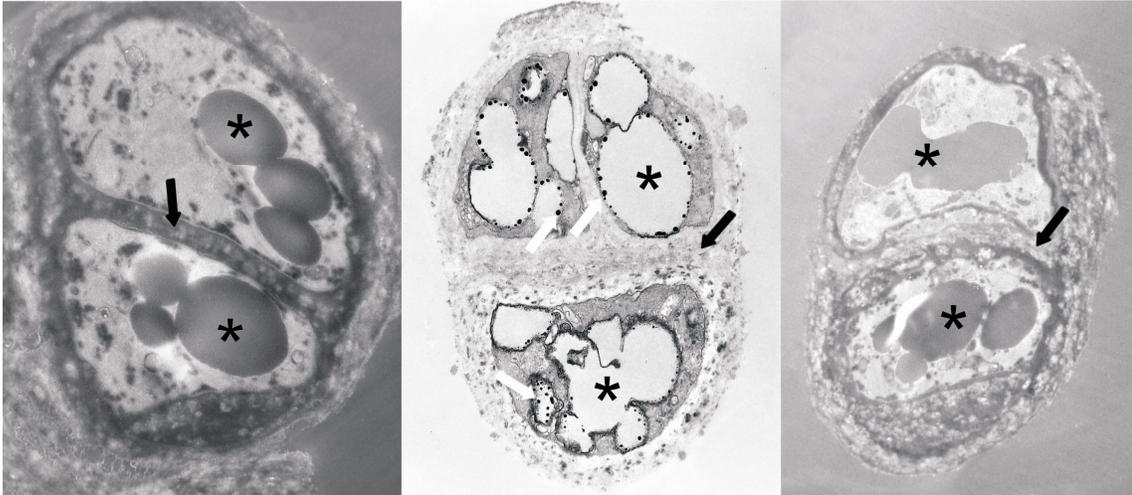
**Figura 09. Resultados dos experimentos de exaustão.** A) Meio sem suplementação. Após 72 horas observa-se a formação de hifas a partir das células escleróticas; B) a suplementação com fosfato de sódio monobásico leva ao surgimento de grande número de hifas em 48 horas; C) Meio suplementado apenas com nitrato de potássio gera poucas células escleróticas e são observados conídios com o volume aumentado; D) A suplementação com sulfato de magnésio gera células escleróticas normais, mas observa-se um grande número de conídios sem alterações morfológicas; E) Na suplementação com dextrose células escleróticas clássicas são observadas e F) células escleróticas clássicas em meio totalmente suplementado.

A MEV revelou a similaridade ultraestrutural entre as células escleróticas produzidas *in vitro* com os meios naturais ou o meio de cultura quimicamente definido, com células oriundas do meio Butterfield acrescido de DL-Propanolol, o nas formas isoladas de lesões de pacientes, através da comparação com registros analisados em trabalhos científicos publicados. As células escleróticas aqui apresentadas demonstram uma plena conservação da divisão planária e septos bem evidentes (figura 10), assim como as formas *in vivo*.



**Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura de células escleróticas induzidas *in vitro*.** Células escleróticas induzidas, em magnetizações crescentes, evidenciando o alto poder de indução do meio quimicamente definido, (A) Ausência de conídios no menor aumento, (B) Grupos de células escleróticas e (C) células escleróticas apresentando a septação planária.

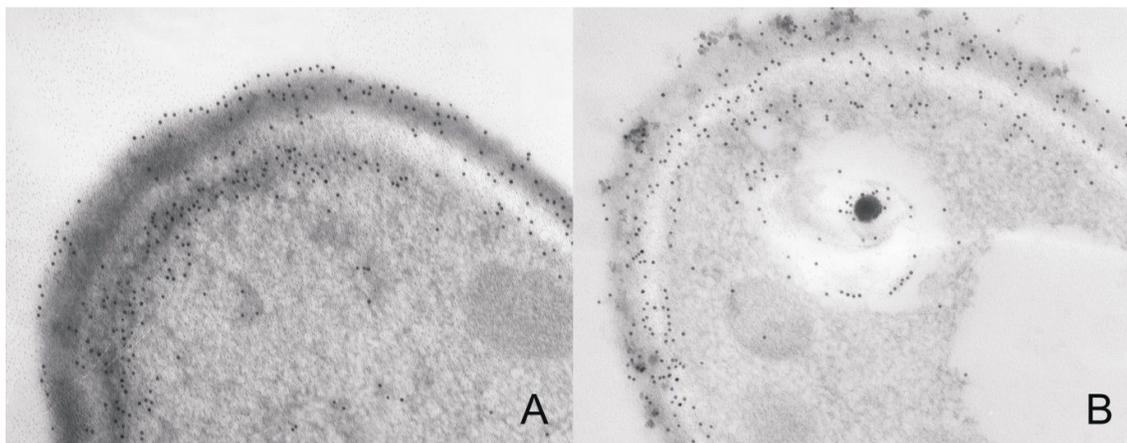
Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão (figura 11) revelaram a presença de parede celular espessa e bem delimitada, assim como septação multiplanária bem definida e um grande número de vesículas com material eletrondenso.



**Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão das células escleróticas induzidas *in vitro*.** Podemos observar a presença de grânulos eletrondensos (setas claras), parede bem definida (setas escuras) e vesículas (asterístico). Barra 1 $\mu$ m.

No isolamento da DHN-melanina obteve-se um volume total de correspondente a 0,5 ml, que após a liofilização realizada no Laboratório de Estruturas de Superfícies de Microorganismos (IPPG-UFRJ) apresentou um volume correspondente a 0,4 ml. A proteína liofilizada foi colocada em incubação em 20ml de soro de pacientes diluídos em 1:1 em tampão PBS, de onde isolou-se o anticorpo anti-melanina em uma concentração de 1mg/ml, com um volume total de 2ml.

Com os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão de conídios marcados com o anticorpo anti-melanina, notou-se uma distribuição homogênea na marcação entre as diferentes porções da parede celular dos conídios de *F. pedrosoi* (figura 12), além da marcação em organelas citoplasmáticas com formato e tamanho similar aos melanossomos de melanócitos humanos.



**Figura 12. Imunomarcção em microscopia eletrônica de transmissão da melanina em conídios de *Fonsecaea pedrosoi*.** A) Marcação homogênea em toda a extensão da parede celular, B) Primeira observação do melanossomo em *Fonsecaea pedrosoi*.

## 5. DISCUSSÃO

A obtenção das formas teciduais de *F. pedrosoi in vitro* é fundamental para o maior conhecimento sobre a relação parasita-hospedeiro, ou seja da biologia dos agentes da cromoblastomicose, aumentando assim o conhecimento dos processos intrínsecos ao patógeno, possibilitando o estudo de novas metodologias terapêuticas.

As tentativas de indução das células escleróticas têm hoje como maior preocupação mimetizar o modo mais natural da diferenciação, como é visto na tentativa de substituição do DL-Propranolol, pelo PAF (ALVIANO *et al.*, 2003b), possibilitando assim a obtenção de células com similaridade morfológica e imunogênica com as formas teciduais, o que possibilitaria estudos sobre a relação parasito-hospedeiro *in vitro* mais próximo das reações orgânicas *in vivo*.

Como as células escleróticas são observadas tanto em tecido animal como vegetal (ZEPPENFELDT *et al.*, 1994), é de se esperar que em meios de cultura que tenham como base extratos vegetais, o mecanismo de indução seja muito mais próximo ao ocorrido *in vivo*, conferindo então uma maior significância aos resultados obtidos com estudos realizados utilizando estes meios de cultura.

A metodologia aplicada na produção dos meios naturais nos leva a supor que eles contêm apenas substâncias hidrossolúveis, íons e aminoácidos, já que as proteínas e vitaminas existentes nas fontes são desnaturadas durante o processo de esterilização por autoclave, além de açúcares, o que aproxima muito das condições existentes *in vivo*, e que a indução das células escleróticas provavelmente ocorre na natureza de forma mais comum a que possamos supor.

Estes novos processos de obtenção das células escleróticas utilizando meios naturais ou um meio mínimo, quimicamente definido, são um avanço em razão do curto espaço de tempo com que estas células são obtidas quando comparado com os meios quimicamente definidos atualmente utilizados, *Butterfield* acrescido de DL-Propranolol ou PAF (ALVIANO *et al.*, 1992a;ALVIANO *et al.*, 2003a), que requerem um período longo e seqüências de mudanças da material

fúngico para diferentes frascos, o que eleva a possibilidade de contaminação, e requer recursos estruturais e pessoal qualificado para a funcionalidade da operação.

A principal desvantagem da utilização de meios naturais é o desconhecimento preciso de quais substâncias estão presentes e em que concentrações são encontradas na solução, e qual ou quais moléculas realmente promovem o processo de indução das células escleróticas a partir das formas filamentosas ou conídios do fungo melânico *F. pedrosoi*. Duas maneiras de se elucidar este processo poderiam ser utilizadas. A primeira seria caracterizar qualitativamente e quantitativamente toda a composição química dos meios naturais indutores, e a partir deste conhecimento, elaborar um meio quimicamente definido para indução. Este procedimento, apesar de aparentemente mais técnico, seria altamente dispendioso em custo financeiro e em tempo, com as técnicas que dispomos atualmente. A segunda maneira, seria elaborar meios de cultura quimicamente definidos a partir de informações prévias, tanto dos meios disponíveis para indução, como da composição química dos mesocarpos escolhidos para processamento, o que foi realizado com sucesso.

O meio quimicamente definido, composto por dextrose, nitrato de potássio, fosfato de sódio monobásico e sulfato de magnésio, pH 2,7, promove a diferenciação em 48 horas, sendo que os resultados com as diferentes fontes de aminoácido e carbono, nos levam a supor que os conídios apresentam um grande estoque de aminoácidos e baixa quantidade de reserva de carboidratos, possivelmente localizadas nas vesículas observadas em microscopia eletrônica de transmissão, que apresentam seu conteúdo extraído.

Em trabalhos anteriores, a composição de açúcares e ácidos graxos já foi descrita para as formas miceliais de *F. pedrosoi*, sendo que glicose, manose, furanose, ramnose e glicosaminas são os polissacarídeos encontrados, e os ácidos graxos são os ácidos palmítico, esteárico, oléico, liminoléico e aracdônico (SOARES RM *et al.*, 1995b).

No processo de formação de conídios ocorrem significantes mudanças na composição de polissacarídeos e lipídeos, onde a ramnose é o principal açúcar em

substituição a grande quantidade de galactose observadas em hifas, e o ácido aracdônico é o componente lipidico exclusivo desta forma (SOARES RM *et al.*, 1995a), sendo então conhecido que as reservas encontradas nos conídios são a ramnose e o ácido aracdônico.

O consumo total das reservas deverá promover a reversão do processo de indução e manutenção de células escleróticas, como observado nos experimentos de esgotamento. Este consumo leva a um desequilíbrio iônico que nos remete a idéia de existir uma íntima regulação entre as concentrações iônicas, como é observado para os íons sódio e potássio, pois sutis alterações entre as proporções promovem relevantes mudanças na morfologia das células, como por exemplo quando a concentração do fosfato de sódio monobásico é elevada resulta na formação imediata de hifas a partir de conídios, sem a formação de células escleróticas e quando a concentração de nitrato de potássio é elevada resulta em severa diminuição no período de manutenção das células escleróticas diferenciadas.

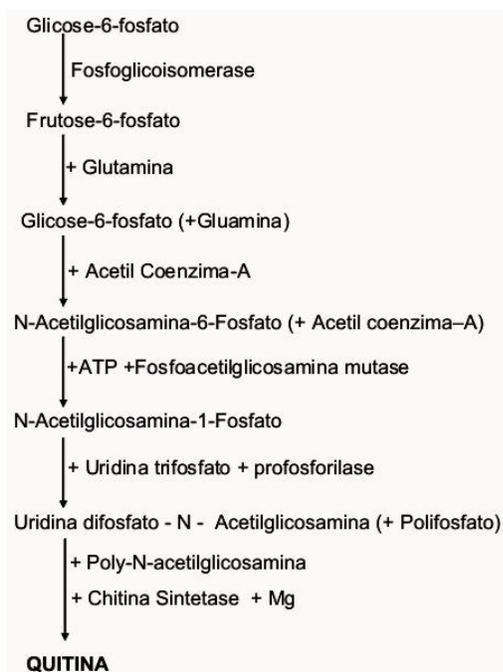
Existe um estrito equilíbrio entre sódio e potássio no meio apresentado, pois quando este equilíbrio é alterado com a disponibilidade ou consumo, seja por aumento ou diminuição das concentrações de sódio ou potássio, hifas são formadas a partir das células escleróticas. A afirmação de que o composto que realmente interfere na formação de hifas é o íon sódio, baseia-se em experimentos com outras fontes deste componente, como: fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bibásico, citrato de sódio e cloreto de sódio, sem a alteração dos resultados, mas o aumento da concentração de sódio em qualquer um destes compostos leva a formação das hifas, com a interessante constatação de que a redução do tempo de indução de 48 horas para 24 horas, pode ser alcançada quando substituímos fosfato de sódio por citrato de sódio. Esta redução no tempo de indução pode ser devida a incorporação do citrato, que poderia desta forma entrar diretamente no ciclo de krebs, evitando assim o processo de formação de acetil-CoA a partir de piruvato, e deste a partir de glicose-6-fosfato.

A obtenção de energia ocorre pela respiração celular que se processa nas mitocôndrias, iniciando-se com a glicólise para a formação de piruvato, e desenvolvendo-se em duas vias possíveis, a via hexosemonofosfato (HMP) e a via

Embden-Meyerhof (EM), sendo esta a principal. O equilíbrio entre as vias é regulada de acordo com a aeração do meio, onde a HMP é predominante em situações de baixa aeração (ELIZABETH MOORE-LANDECKER, 1996). O ácido pirúvico, molécula base do ciclo de krebs da respiração celular, é convertido em acetil coenzima-A, dentro das mitocôndrias, pela piruvato descarboxilase, transformando-se em citrato que entra no ciclo de Krebs para o fornecimento de 12 *ATPs* que serão utilizados durante a biossíntese das moléculas e na manutenção do ciclo celular.

Em experimentos com *Fusarium solani* retirando isoladamente potássio e magnésio do meio comercial, foi formulada a hipótese de que o potássio seria importante na formação de hifas, e o magnésio na formação de conídios (DAS, 1991), o que apresenta similaridade com os resultados apresentados aqui, pois quando o equilíbrio entre sódio e potássio foi alterado a diferenciação celular das hifas e conídios foi comprometida.

Quando o magnésio foi omitido do meio de cultura de Joachin Das, observou-se a diminuição da conidiogênese, e em nosso meio quimicamente definido a alteração restringiu-se a diminuição do tamanho das células escleróticas. Uma possibilidade de justificativa baseia-se na operacionalidade da quitina sintetase, responsável pela biossíntese da quitina, componente estrutural da parede celular de fungos (figura 14) (BURNET J.H., 1976), que para seu pleno funcionamento é dependente de magnésio, e como este fora omitido, em ambos os casos as novas células apresentaram as alterações morfológicas registradas.



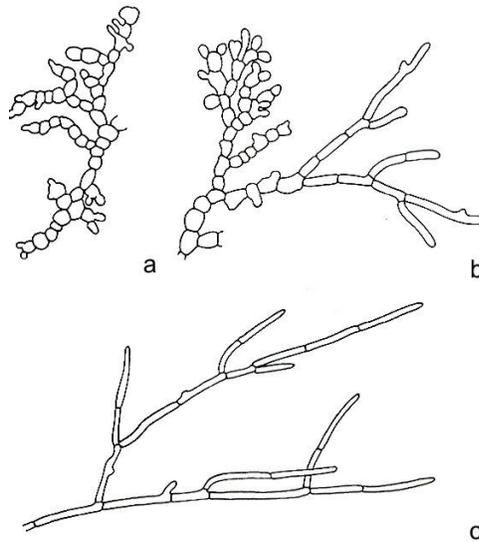
**Figura 14. Esquema de formação da quitina, dependente da presença de quitina sintetase e magnésio.**

Fonte: (BURNET J.H., 1976)

O pH da mistura dos componentes do meio quimicamente definido é igual a 4,0, e nesta condição os conídios em 24 horas iniciam a formação de hifas. Assim como no meio natural, se o pH não estiver próximo de 2,7 a diferenciação em células escleróticas não ocorre, e o aumento deste para um valor igual ou superior a 3,5 resulta na imediata formação de hifas. Deste modo, fica evidente que o processo de transformação *in vitro* dos conídios de *F. pedrosoi* em células escleróticas é dependente do pH ácido, sendo este resultado corroborado por todos os outros trabalhos de indução de células escleróticas existentes, onde a acidificação do meio é indispensável no processo. Este pH ácido do meio de cultura ativa os canais dependentes de pH existentes na membrana celular, como os canais de potássio (ROBERTS & TYERMAN, 2002), e a diminuição do pH gera um rápido aumento da concentração do magnésio no citoplasma (HONG-YING LI, 1994), permitindo o influxo destes íons.

Os íons magnésio ( $Mg^{+}$ ) e fosfato ( $PO_3^{-}$ ) em pH ácido são encontrados em suas formas livres e este magnésio livre tem papel fundamental na produção de quitina, componente estrutural da parede celular de fungos (ELIZABETH MOORE-

LANDECKER, 1996). Sem a presença deste íon, a formação de parede celular é comprometida, provocando sérias alterações na morfologia das células (figura 15) (BURNET J.H., 1976), o que poderia, de modo análogo, explicar a diminuição do volume celular das células escleróticas quando cultivadas no meio quimicamente definido de onde retirou-se o sulfato de magnésio.



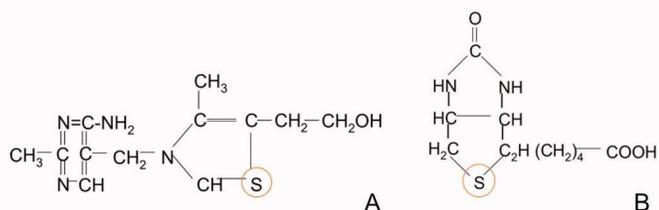
**Figura 15. Esquema das alterações provocadas pela diminuição da concentração de magnésio em meio de cultura: (a) e (b) severa deficiência de magnésio em *Chaetomiun globosum* demonstrando a diminuição da elongação das hifas com a formação de células globosas e (c) crescimento normal de *Chaetomiun globosum* em meio com 0,5ppm de sulfato de magnésio.**  
Fonte: (BURNET J.H., 1976)

Quando novos conídios são colocados em meio reutilizado, ainda assim são formadas células escleróticas, contudo, o tempo em que a célula esclerótica se mantém nesta forma reduz-se para apenas um dia, diferenciando-se em seguida para hifas. A hipótese formulada para esta situação está na manutenção de íons como magnésio e sódio, além de dextrose, como reserva nos conídios (ELIZABETH MOORE-LANDECKER, 1996), o que possibilitaria a sua transformação para a forma de esclerótica.

Os experimentos de exaustão revelaram que durante o processo de indução de células escleróticas, sendo consumidos a dextrose e o fosfato de sódio monobásico, visto que a complementação com estes compostos leva a formação de células escleróticas, mesmo que com algumas alterações morfológicas e menor tempo de durabilidade. Assim como o consumo de magnésio, que quando complementado isoladamente também é capaz de gerar células escleróticas clássicas por um curto espaço de tempo, diferente do potássio, que quando suplementado não é capaz de gerar as formas teciduais.

Os fungos, diferentemente dos animais, parecem não necessitar de fontes de vitaminas como C, D, E e K, mas as vitaminas hidrossolúveis como as pertencentes ao complexo-B (biotina, piridoxina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, riboflavina e cianocobalamina), na maior parte dos fungos é sintetizada (ELIZABETH MOORE-LANDECKER, 1996).

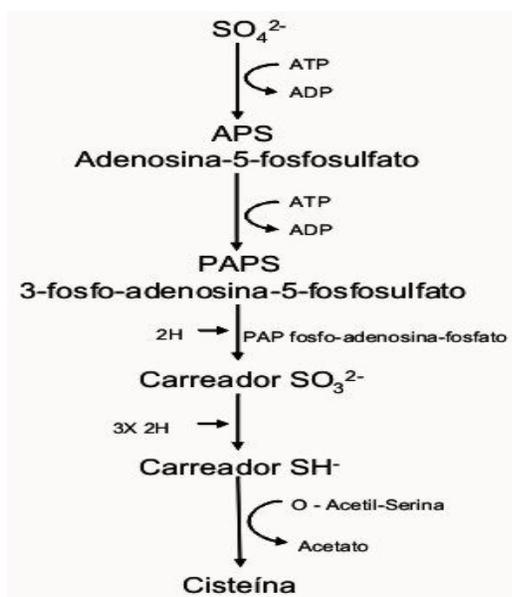
Durante o processo de indução de células escleróticas no meio Butterfield acrescido de propanolol ou PAF, as vitaminas tiamina e biotina são requeridas, pois a vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) (figura 16) ativa a tiamina pirofosfatase, que age na regulação do metabolismo de carboidratos, e em fungos deficientes desta vitamina o metabólito intermediário ácido piruvico tende a ser depositado no meio de cultura, enquanto isso a vitamina B<sub>7</sub> (biotina) (figura 16) regula a ação de moléculas como a acetil-coenzima-A na produção de ácidos graxos e sua falta provoca o aumento da permeabilidade da membrana celular (ELIZABETH MOORE-LANDECKER, 1996), contudo estas vitaminas são, por sua importância metabólica, sintetizadas na maioria dos fungos micelianos (ELIZABETH MOORE-LANDECKER, 1996).



**Figura 16: Vitaminas dependentes da presença de enxofre. A) Tiamina B) Biotina**

Com a simples comparação do meio quimicamente definido aqui apresentado com o meio Butterfield, verifica-se a ausência das vitaminas biotina e tiamina, e como o processo de indução é obtido nas duas situações, sugerimos que

*F. pedrosoi*, assim como um grande número de fungos filamentosos, é capaz de sintetizá-las, sendo para isso necessário o fornecimento de enxofre. Como no meio Butterfield a concentração de compostos sulfurados na composição do meio é baixa (0,1g/L), estas vitaminas são exigidas no processo, enquanto isso no meio aqui apresentado, a concentração do ânion sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) é 48 vezes maior e aparentemente suficiente para a síntese das vitaminas (figura 17), assim como é também utilizado na formulação de diversos aminoácidos como a cisteína, cistina e metionina (ELIZABETH MOORE-LANDECKER, 1996).



**Figura 17. Esquema da utilização do ânion sulfato para a formação de aminoácidos** (ELIZABETH MOORE-LANDECKER, 1996)

A forma mais comum de suprir a necessidade fisiológica do ânion sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) é a administração de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) no meio de cultura, e sua incorporação pela célula se processa por transporte ativo (GARRAWAY M.O., 1984). Para isso, o suprimento de compostos que serão utilizados para a produção de energia é fundamental no processo de indução.

O conhecimento da composição e estrutura da parede celular fúngica de patógenos permite o estudo de novos alvos para a ação de drogas anti-fúngicas. Como já foi demonstrado que a melanina é um dos componentes da parede celular de *F. pedrosoi*, faltava caracterizar a biossíntese da molécula e a organela

responsável por este processo, sendo o melanossomo uma organela especializada na biosíntese e armazenamento de pigmentos melânicos (DELL'ANGELICA, 2003) até então não descrita na espécie.

O melanossomo é uma especialização do lisossomo e o processo de formação da organela está dividido em quatro estágios, sendo a caracterização somente possível através da microscopia eletrônica de transmissão, onde o primeiro estágio é marcado por uma estrutura amorfa eletróluscente, e os três seguintes por organização de estruturas fibrilares que aumentam em espessura até provocar a total eletrondensidade da organela (RAPOSO & MARKS, 2002). A imunomarcagem de conídios apresentou o anticorpo anti-melanina em organelas citoplasmáticas com formato e tamanho similar aos melanossomos de quarto estágio de melanócitos humanos o que corrobora com a idéia de *F. pedrosoi* apresentar os melanossomos como sítio de síntese da melanina, que seria segundo alguns autores um componente estrutural da parede celular deste fungo (CUNHA *et al.*, 2005), sendo pela primeira vez evidenciada esta organela em *F. pedrosoi*, tornando necessária a confirmação desta organela nas formas teciduais.

## 6. Conclusões

Os meios naturais obtidos a partir de *Euterpe oleracea*, *Bactris gasipaes*, *Eugenia stipitata*, *Malpigia glabra*, *Citrus limom*, *Citrus aurantifolia* e *Theobroma grandiflorum* são capazes de realizar a indução de células escleróticas a partir de conídios de *Fonsecaea pedrosoi*, em diferentes tempos.

O meio quimicamente definido com 40g de Dextrose, 19g de Nitrato de Potássio, 40g de Fosfato de Sódio Monobásico e 9g de Sulfato de Magnésio, diluídos em 1000ml de água bidestilada e deionizada com o pH ajustado para 2,7 realiza a indução de células escleróticas a partir de conídios de *Fonsecaea pedrosoi* em 24 horas.

As células escleróticas induzidas com as metodologias propostas são morfológica e ultraestruturalmente similares às observadas *in vivo* e induzidas em outros meios já descritos.

Os meios propostos induzem células escleróticas de forma mais rápida a observada nos meios hoje disponíveis.

A existência de agentes indutores de células escleróticas, como propanolol ou fator agregador plaquetário, não são obrigatórios para o processo.

A indução e manutenção *in vitro* das formas teciduais depende diretamente do equilíbrio iônico do meio utilizado.

A obtenção rápida de células escleróticas permite estudos sistemáticos acerca da biologia, metabolismo celular do principal agente da cromoblastomicose, além da interação patógeno-hospedeiro.

Demonstramos pela primeira vez a presença de uma organela especializada na sintetização da melanina, o melanosomo, isso possibilita estudos sobre a síntese desta molécula no organismo, devendo ainda ser estudada a sua presença nas demais formas celulares.

## 7. Referência Bibliográfica

ALVIANO, C. S., FARBIARZ, S. R., TRAVASSOS, L. R. et al. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathologia* v.119, p.17-23, 1992.

ALVIANO, D. S., KNEIPP, L. F., LOPES, A. H. et al. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res.Microbiol.* v.154, p.689-695, 2003a.

ANDRADE, T. S., CASTRO, L. G., NUNES, R. S. et al. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* v.47, p.216-221, 2004.

ARANGO, M., JARAMILLO, C., CORTES, A. et al. Auricular chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med.Mycol.* v.36, p.43-45, 1998.

BANSAL A.S. & PRABHAKAR P. *Tropical Geographi Medicine* v.41, p.222-226, 1989.

BARBA-GOMEZ, J. F., MAYORGA, J., MCGINNIS, M. R. et al. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.26, p.367-370, 1992.

BONIFAZ, A., CARRASCO-GERARD, E., SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* v.44, p.1-7, 2001.

BONIFAZ, A., MARTINEZ-SOTO, E., CARRASCO-GERARD, E. et al. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int.J.Dermatol.* v.36, p.542-547, 1997.

BURNET J.H. Fundamentals of mycology. NY, v.2, p.-673, 1976.

CUNHA, M. M., FRANZEN, A. J., ALVIANO, D. S. et al. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc.Res.Tech.* v.68, p.377-384, 2005.

DA SILVA, J. P., ALVIANO, D. S., ALVIANO, C. S. et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.33, p.63-69, 2002.

DAS, J. Influence of Potassium in the Agar Medium on the Growth Pattern of the Filamentous Fungus *Fusarium solani*. *Appl.Environ.Microbiol.* v.57, p.3033-3036, 1991.

DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ J. et al. Atlas of clinical fungi. v.2, 2001.

DE HOOG, G. S., QUEIROZ-TELLES, F., HAASE, G. et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med.Mycol.* v.38 Suppl 1, p.243-250, 2000.

DELL'ANGELICA, E. C. Melanosome biogenesis: shedding light on the origin of an obscure organelle. *Trends Cell Biol.* v.13, p.503-506, 2003.

ELIZABETH MOORE-LANDECKER. Fundamentals of the fungi. v.4, 1996.

ESTERRE, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., RAHARISOLO, C. [Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean] [Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean]. *Bull.Soc.Pathol.Exot.* v.90, p.312-317, 1997.

ESTERRE, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., RAMARCEL, E. R. et al. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.55, p.45-47, 1996a.

ESTERRE, P., INZAN, C. K., RAMARCEL, E. R. et al. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br.J.Dermatol.* v.134 Suppl 46, p.33-36, 1996b.

GARRAWAY M.O., E. R. C. Fungal nutrition and physiology. NY, p.-401, 1984.

GEZUELE, E., MACKINNON, J. E., CONTI-DIAZ, I. A. The frequent isolation of *Phialophora verrucosa* and *Phialophora pedrosoi* from natural sources. *Sabouraudia.* v.10, p.266-273, 1972.

HONG-YING LI, G. A. Q. Effect of pH on intracellular free Mg<sup>2+</sup> in isolated adult rat cardiomyocytes. *Biochimica et biophysica Acta* v.1222, p.164-170, 1994.

IBRAIN-GRANET O., E. G. A. C. B. Induction of yeast-like cells in a strain of *Fonsecaea pedrosoi* cultured under very acidic conditions. *Mycopathologia* v.90, p.35-39, 1985.

LACAZ C.S., P. E. & MARTINS E.J. Cromomicose. São Paulo, v.8, 1991.

MATSUMOTO, T. Critical review of human isolated of *Wangiella dermatidis*. *Mycologia* v.76, p.232-249, 1984.

MATTE, S. M., LOPES, J. O., MELO, I. S. et al. [Chromoblastomycosis in Rio Grande do Sul: a report of 12 cases]. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* v.30, p.309-311, 1997.

MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.8, p.1-16, 1983.

MCGINNIS, M. R. & HILGER, A. E. Infections caused by black fungi. *Arch.Dermatol.* v.123, p.1300-1302, 1987.

MENDOZA, L., KARUPPAYIL, S. M., SZANISZLO, P. J. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses* v.36, p.157-164, 1993.

MINOTTO, R., BERNARDI, C. D. V., MALLMANN, L. F. et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal of the American Academy of Dermatology* v.44, p.585-592, 2001.

NIMRICHTER, L., CERQUEIRA, M. D., LEITAO, E. A. et al. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. *Infect.Immun.* v.73, p.7860-7868, 2005.

POIRRIEZ, J., BREUILLARD, F., FRANCOIS, N. et al. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.63, p.61-63, 2000.

QUEIROZ-TELLES, F., PURIM, K. S., FILLUS, J. N. et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int.J.Dermatol.* v.31, p.805-812, 1992.

RAPOSO, G. & MARKS, M. S. The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic.* v.3, p.237-248, 2002.

RESTREPO, A., GONZALEZ, A., GOMEZ, I. et al. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* v.544, p.504-516, 1988.

RIOS-FABRA, A., MORENO, A. R., ISTURIZ, R. E. Fungal infection in Latin American countries. *Infect.Dis.Clin.North Am.* v.8, p.129-154, 1994.

RIPPON J.W. Chromoblastomycosis. Philadelphia, v.Saunders, p.276-296, 1988.

ROBERTS, D. M. & TYERMAN, S. D. Voltage-dependent cation channels permeable to NH<sup>(+)</sup>(4), K<sup>(+)</sup>, and Ca<sup>(2+)</sup> in the symbiosome membrane of the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* v.128, p.370-378, 2002.

RUBIN, H. A., BRUCE, S., ROSEN, T. et al. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.25, p.951-954, 1991.

SALGADO, C. G., DA SILVA, J. P., DA SILVA, M. B. et al. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. *Lancet Infect.Dis.* v.5, p.528, 2005.

SALGADO, C. G., DA SILVA, J. P., DINIZ, J. A. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* v.46, p.33-36, 2004.

SEVIGNY, G. M. & RAMOS-CARO, F. A. Treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* with low-dose terbinafine. *Cutis* v.66, p.45-46, 2000.

SILVA, C. M., DA ROCHA, R. M., MORENO, J. S. et al. [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.* v.28, p.49-52, 1995.

SILVA, J. P., DE SOUZA, W., ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* v.143, p.171-175, 1998.

SILVA, M. The Parasitic phase of the fungi os chromoblastomycosis: Development of sclerotic cells in vitro and in vivo. *Mycologia* v.49, p.318-331, 1957.

SOARES RM, ANGLUSTER, J., DE SOUZA, W. et al. Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia* v.132, p.71-77, 1995a.

TANUMA, H., HIRAMATSU, M., MUKAI, H. et al. Case report. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. Characteristics of chromoblastomycosis in the Kitasato region, Japan. *Mycoses* v.43, p.79-83, 2000.

UNGPAKORN, R. & REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clin.Exp.Dermatol.* v.31, p.245-247, 2006.

VITALE, R. G., DE HOOG, G. S., VERWEIJ, P. E. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, terbinafine and 5-fluocytosine against *Exophiala spinifera* and evaluation of post-antifungal effects. *Med.Mycol.* v.41, p.301-307, 2003.

WALTER, P., GARIN, Y., RICHARD-LENOBLE, D. Chromoblastomycosis. A morphological investigation of the host-parasite interaction. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histol.* v.397, p.203-214, 1982.

ZEPPENFELDT, G., RICHARD-YEGRES, N., YEGRES, F. Cladosporium carrionii: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. *Rev.Iberoam.Micol.* v.11, p.61-63, 1994.

# 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](#)