

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
INSTITUTO BIOMÉDICO
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

ERIKA PEIXOTO FERREIRA

**OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DA INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS
MURINOS E CÉLULAS DA LINHAGEM J774 COM ISOLADOS DE *Paecilomyces*
*lilacinus***

NITERÓI

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ERIKA PEIXOTO FERREIRA

**OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DA INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS
MURINOS E CÉLULAS DA LINHAGEM J774 COM ISOLADOS DE *Paecilomyces
lilacinus***

Dissertação apresentação ao Curso de Pós-Graduação “Strictu Sensu” em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense. Área de Concentração: Micologia

Orientadores: Jeferson Carvalhaes de Oliveira

Paulo R. Zuquim Antas

Co-orientadora: Cintia de Moraes Borba

Niterói

2010

ERIKA PEIXOTO FERREIRA

**OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DA INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS
MURINOS E CÉLULAS DA LINHAGEM J774 COM ISOLADOS DE *Paecilomyces
lilacinus***

Dissertação apresentação ao Curso de Pós-
Graduação “Stricto Sensu” em Microbiologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal
Fluminense. Área de Concentração: Micologia

Aprovada em outubro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Diana Bridon da Graça Sgarbi - Presidente

UFF

Prof.^a Dr.^a Andrea Regina de Souza Baptista – Titular

UFF

Dra. SUZANA CORTE-REAL FARIA – Titular

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL – IOC/FIOCRUZ

Prof Dr. JEFERSON CARVALHAES DE OLIVEIRA – Suplente/Orientador

UFF

Dr. PAULO RENATO ZUQUIM ANTAS – Suplente/Orientador

LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CLÍNICA – IOC/FIOCRUZ

Niterói

2010

A todos aqueles que me ajudaram na
conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus orientadores Jeferson Carvalhaes de Oliveira, Cíntia de Moraes Borba e Paulo Zuquim Antas, por todo apoio necessário para a execução desta dissertação.

À Suzana Corte-Real e Vanessa Diniz, pelo apoio técnico nas minhas análises de microscopia eletrônica

À Rosa Pinho, Wellington Seguins da Silva, Dolores Pereira, Caio Simas, Anna Luiza Neurauter, Ivy Campos e os demais colegas do Laboratório de Imunologia Clínica da Fiocruz, pelo apoio técnico e moral para toda a execução do meu trabalho

À todos os professores que eu tive o privilégio de ser aluna neste curso de Mestrado, além de todos os colegas do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos da Fiocruz, todos os amigos e parentes que me ajudaram na conclusão deste trabalho.

EPÍGRAFE:

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final; eu
prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder; prefiro
ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."

Martin Luther King

RESUMO

Estudos sobre a interação parasito-hospedeiro em relação ao fungo *Paecilomyces lilacinus* carecem de informações, uma vez que essa espécie era reconhecida, até recentemente, como contaminante do ar, sem importância como agente causal da hialohifomicose. Atualmente, a partir de casos clínicos descritos, tanto em crianças como em adultos imunocompetentes e imunodeprimidos, tendo como agente etiológico *P. lilacinus*, este fungo passou a ser considerado como um importante oportunista humano emergente. Este estudo teve como objetivo desafiar macrófagos murinos e de células da linhagem J774 com conídios de *P. lilacinus* provenientes de distintas formas clínicas de hialohifomicose. Para isso, conídios foram isolados a partir do crescimento fúngico em meio BDA, à temperatura ambiente, por 10 a 12 dias. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e a linhagem celular J774 interagiram “in vitro” com os conídios na proporção de 2:1, respectivamente. Após a interação, em tempos diferentes de incubação, as células foram fixadas com metanol e coradas com “Wright-Giemsa” para análise por microscopia óptica, e processadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de tetróxido de ósmio em 0,1M para investigação por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em macrófagos peritoneais murinos e células J774 observou-se que, em 30 minutos de interação, os conídios já tinham sido internalizados. A infecção a partir daí prosseguiu, com um aumento do número de conídios dentro de macrófagos, confirmado pelo aumento do índice endocítico. Entre uma a quatro horas não houveram mudanças significativas na morfologia conidial. Em cinco horas, a microscopia eletrônica confirmou o aumento do volume conidial, presença de tubo germinativo em macrófagos peritoneais murinos, enquanto que neste mesmo tempo as células J774 apenas apresentaram conídios sem mudanças significantivas quanto à morfologia. Em 14 horas, em ambos os tipos celulares, foi observado um aumento do número de conídios internalizados e em processo de formação de tubos germinativos. Em 24 horas, na interação com macrófagos murinos, hifas de *P. lilacinus* foram observadas enquanto que, na mesma interação, com as células J774 não foram observadas tais estruturas, mas somente tubos germinativos. Em 48 horas, para ambos os tipos celulares, apenas o micélio é observado. Verificou-se que os três isolados de *P. lilacinus* foram capazes de sobreviver dentro de fagócitos e que os macrófagos peritoneais foram mais sensíveis ao fungo que as células da linhagem J774. Os resultados obtidos neste trabalho chamam a atenção de que estudos adicionais sobre a interação de conídios de *P. lilacinus* e células fagocíticas devem ser intensificados, na esperança de que os dados gerados ajudem a elucidar os complexos e críticos mecanismos envolvidos na patogênese deste microrganismo oportunista

Palavras-chave: *Paecilomyces lilacinus*, hialohifomicose, macrófagos.

ABSTRACT

There is a lack of information concerning parasite-host interaction in relation to the fungus *Paecilomyces lilacinus*, since this species has been known until recently as a air contaminant. Currently, from clinical cases described in both children and adults, immunocompetent and immunocompromised, have as the etiologic agent *P. lilacinus*. Therefore, this fungus has been considered as an important emerging opportunistic in humans. This study aimed to challenge murine macrophages and J774 cell-line with conidia of *P. lilacinus* obtained from different clinical forms of hialohyphomycosis. For this, conidia were isolated from the fungal grown on PDA at room temperature for 10-12 days. Peritoneal macrophages from C57BL/6 and J774 cell-lines interacted *in vitro* with conidia at a ratio of 2:1, respectively. After the interaction, at different time points of incubation, cells were fixed with methanol and stained with Wright-Giemsa for analysis by optical microscopy, and processed with 2.5% glutaraldehyde and 1% osmium tetroxide in 0.1 M for investigation by transmission electron microscopy (TEM). The murine peritoneal macrophages and J774 cells showed that in 30 minutes of infection conidia had already been internalized. From this point on the infection continues, with an increase in the number of conidia within macrophages, confirmed by increased endocytic index. In the 1-4 hours period there was no significant change in conidial morphology. However, in five hours, electron microscopy confirmed the increase in conidia, germ tube presence inside murine peritoneal macrophages whereas, in this time, the J774 cells showed only conidia without significant changes on the morphology. In 14 hours, for both cell types, we observed an increase in the number of conidia internalized and in the process of germ tube formation. In 24 hours of incubation with murine macrophages, hyphae of *P. lilacinus* was observed, while at the same time of interaction with the J774 cells such structures were not observed, but only germ tubes. At 48 hours in both cell types, only the mycelium was observed, while few macrophages were present. It was detected that the three isolates of *P. lilacinus* were able to survive within phagocytes and peritoneal macrophages were more susceptible to this fungus than the J774 cell-line. The results of this work focus the attention that more studies on the interaction of conidia of *P. lilacinus* and phagocytic cells should be intensified in the hope that the data generated will help to elucidate the complex and critical mechanisms involved in the pathogenesis of this opportunistic microorganism

Key words: *Paecilomyces lilacinus*, hialohyphomycosis, macrophages

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig.1	Microscopia eletrônica de varredura de conídios aéreos de <i>P. lilacinus</i>	16
Fig. 2	Microscopia eletrônica de varredura de conídios submersos de <i>P. lilacinus</i>	17
Fig. 3	Macromorfologia da cultura de <i>P. lilacinus</i> em meio batata, dextrose, ágar (BDA).....	29
Fig. 4	Macromorfologia do reverso da colônia de <i>P. lilacinus</i> em meio batata, dextrose, ágar (BDA).....	30
Fig.5	Microcultura de <i>P. lilacinus</i> em meio extrato de malte ágar (MEA).....	30
Fig. 6	Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de <i>P. lilacinus</i> do isolado proveniente de biópsia de pele.....	31
Fig. 7	Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de <i>P. lilacinus</i> do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 1 hora.....	32
Fig. 8	Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de <i>P. lilacinus</i> do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 2 horas (MO).....	32
Fig.9	Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de <i>P. lilacinus</i> do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 4 horas (MO).....	33
Fig.10	Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de <i>P. lilacinus</i> do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 6 horas (MO).....	33
Fig.11	Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de <i>P. lilacinus</i> do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 14 horas (MO).....	34
Fig.12	Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de <i>P. lilacinus</i> do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 24 horas (MO).....	34

Fig.13	Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de <i>P. lilacinus</i> do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 48 horas (MO).....	35
Gráfico 1	Cinética da evolução da interação de macrófagos peritoneais murinos por conídios de <i>P. lilacinus</i> quanto ao índice endocítico	35
Gráfico 2	Cinética da evolução da interação de células da linhagem J774 por conídios de <i>P. lilacinus</i> quanto ao índice endocítico.....	36
Fig. 14	Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 30 minutos (MET).....	37
Fig. 15	Macrófago da linhagem J774 infectado com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação de 30 minutos. (MET).....	37
Fig. 16	Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 1 hora. (MET).....	38
Fig. 17	Macrófagos da linhagem J774 infectados com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação de 2 horas. (MET).....	38
Fig. 18	Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 5 horas. (MET).....	39
Fig. 19	Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 5 horas. (MET).....	39
Fig. 20	Macrófago da linhagem J774 infectado com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação de 5 horas. (MET).....	40
Fig 21	Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 14 horas. (MET).....	40
Fig 22	Macrófago da linhagem J774 infectado com conídio de <i>P. lilacinus</i> , isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação de 14 horas. (MET).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS:

BDA - Batata dextrose ágar

IE - Índice Endocítico

IFN- γ - Interferon gama

Linfócitos T_H - Linfócitos T helper ou linfócitos T CD4

MEA - Extrato de malte ágar

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MO - Microscopia Óptica

NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintetase

O₂⁻ - Ânion superóxido

PMNs - Polimorfonucleares

SDA - Sabouraud dextrose ágar

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1.	O GÊNERO <i>Paecilomyces</i>	14
1.2.	EPIDEMIOLOGIA E CLÍNICA	17
1.2.1.	ASPECTOS CLÍNICOS.....	18
1.3.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	21
1.4.	TRATAMENTO.....	21
1.5.	RESPOSTAS IMUNES AOS FUNGOS.....	22
2.	OBJETIVOS.....	25
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	ISOLADOS FÚNGICOS.....	26
3.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	26
3.3	OBTENÇÃO DE CONÍDIOS.....	26
3.4	OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS MURINOS E INTERAÇÃO COM CONÍDIOS.....	27
3.5.	ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS CONÍDIOS COM OS MACRÓFAGOS.....	28
3.5.1.	MICROSCOPIA ÓPTICA.....	28
3.5.2.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	28
4.	RESULTADOS.....	29
4.1.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	29
4.2.	ANÁLISE DA CINÉTICA DA INTERAÇÃO MACRÓFAGO-CONÍDIO POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	31
4.3.	ANÁLISE DA CINÉTICA DA INTERAÇÃO MACRÓFAGO-CONÍDIO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	36
5.	DISCUSSÃO.....	42
6.	CONCLUSÃO.....	50

7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
8.	ANEXO.....	62

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - O GÊNERO *Paecilomyces*

O gênero *Paecilomyces* foi descrito em 1907 por Bainier, que isolou e caracterizou a espécie *P. variotti* (CASTRO, SALEBIAN & SOTTO, 1990). Este gênero foi revisado por Brown e Smith (1957) e modificado por Samson (1974), que reconheceu e definiu 31 espécies e o dividiu em duas sessões. Desde então não houve revisão do gênero, porém, atualmente mais de quarenta espécies são reconhecidas (LUANGSA-ARD, HYWEL-JONES & SAMSON, 2004; INGLIS & TIGANO, 2006). A sessão *Paecilomyces* abriga membros que frequentemente são termofílicos, já a sessão *Isarioidea* é formada por fungos mesofílicos, que incluem várias espécies entomopatogênicas e nematófagas, incluindo *Paecilomyces lilacinus*. Estudos têm demonstrado que os estados perfeitos de ambas as sessões estão dentro do Filo Ascomycota, Ordens Eurotiales e Hypocreales (INGLIS & TIGANO, 2006).

As espécies do gênero *Paecilomyces* estão mundialmente distribuídas sendo encontradas, principalmente, como sapróbios no solo e de vegetais em decomposição. Também já foram descritas como parte da microbiota de pelos de ovelhas, em hamsters e cães (ALI-SHTAYEH et al, 1989; CABAÑES et al, 1996; BAGUY, SHANAWANY & ABDEL-MALLEK, 1998). Sua principal importância econômica refere-se ao dano causado a todos os tipos de materiais orgânicos, em particular enlatados e, menos frequentemente, frutas de mercado, sucos de fruta, manteiga, margarina e ovos de galinha. Afeta também o couro e a juta (HALDANE et al, 1974).

Dentro do gênero *Paecilomyces*, as espécies relacionadas a micoses humanas são *P. viridis*, *P. marquandii*, *P. javanicus*, *P. variotii* e *P. lilacinus* (TAN et al, 1992). As duas últimas são as de maior interesse médico.

Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson 1974 é um fungo filamentoso, assexuado e hialino. Essa espécie foi originalmente descrita em 1910 por Thom como *Penicillium*

lilacinum (TAN et al, 1992). Foi também denominado *Spicaria rubidopurpurea* por Aoki em 1941, cuja correção para *Penicillium lilacinum* foi realizada por Brown e Smith em 1957 (TAKAYASU, AKAGI & SHIMIZU, 1977). Em 1974, Samson transferiu a espécie *Penicillium lilacinum* para o gênero *Paecilomyces*, como *Paecilomyces lilacinus* devido às características morfológicas típicas desse gênero (TAN et al, 1992).

Essa espécie tem sido descrita como parasita de insetos e nematódeos, assim sendo, utilizada como agente biocontrolador ao redor do mundo (GARBINO et al, 2002; ZHU et al, 2006). Além disso, está sendo objeto de pesquisa para fins antipoluentes, como biodegradante de plástico e desintoxicante de poluente tóxico (ODA et al, 1997; GESELL et al, 2004). No entanto, por ser esse fungo agente causador de uma micose, tanto em humanos quanto em outros animais, sua utilização como biorremediador necessita de mais testes toxicológicos e ecológicos e isso vem sendo questionado na comunidade científica (ZHU et al, 2006).

P. lilacinus não requer nutrientes especiais e cresce rapidamente em meios rotineiros utilizados para cultura fúngica (KUNSTÝR et al, 1997; PASTOR & GUARRO, 2006). Nos meios Sabouraud dextrose ágar (SDA) e batata dextrose ágar (BDA), à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), esse fungo desenvolve uma colônia aveludada a flocosa com micélio aéreo, inicialmente, branca e gradualmente assume cor rosada à violeta após a esporulação (LACAZ et al 1998). Posteriormente, com o passar do tempo, adquire a coloração acinzentada ou marrom-acinzentada (KUNSTÝR et al, 1997). A produção de pigmento é aumentada quando o fungo é semeado em Czapek ágar e *potato flakes* ágar (WESTENFELD, ALSTON & WINN, 1996). O reverso pode ser incolor ou de coloração amarelo tornando-se acinzentado ou cinza escuro com o tempo, ou até púrpura dependendo do meio de cultivo (TAKAYASU, AKAGI & SHIMIZU, 1977; CASTRO, SALEBIAN & SOTTO, 1990; WESTENFELD, ALSTON & WINN, 1996; LACAZ et al 1998). Exsudatos e odor são ausentes (TAKAYASU, AKAGI & SHIMIZU, 1977). Possui crescimento a 37°C , embora lento (KUNSTÝR et al, 1997).

Ao exame microscópico, *P. lilacinus* apresenta hifas vegetativas hialinas de parede lisa. Os conidióforos possuem parede espessa e rugosa, pigmentados em amarelo ou púrpuro, consistindo de ramificações verticilidas com 2 a 4 fiálides terminais. Essas fiálides possuem uma porção basal dilatada e um distinto e fino pescoço. Sobre elas observam-se os conídios, dispostos em cadeias divergentes ou enovelados, de parede lisa a ligeiramente rugosa, hialinos ou na cor púrpura quando em massas, elípticos a fusiformes. Não são formados clamidosporos (SAMSON, 1974).

Quando observado à microscopia eletrônica, os conídios de *P. lilacinus* se diferenciam quanto a aéreos (obtidos em BDA) e submersos (obtidos em meio líquido conhecido por gerar a maior razão conídio/micélio, contendo KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, MgSO_4 , CaCl_2 e glicose). Os primeiros possuem um comprimento mediano de $2,56 \mu\text{m}$ (máximo: $3,16 \mu\text{m}$; mínimo: $2,0 \mu\text{m}$) e largura de $1,65 \mu\text{m}$ (máximo: $2,0 \mu\text{m}$; mínimo: $1,33 \mu\text{m}$). Já os restantes são significativamente maiores nestes aspectos, com $2,99 \mu\text{m}$ de comprimento mediano (máximo: $4,33 \mu\text{m}$; mínimo: $2,16 \mu\text{m}$) e largura de $2,17 \mu\text{m}$ (máximo: $3,33 \mu\text{m}$; mínimo: $1,66 \mu\text{m}$). Alguns dos conídios submersos são maiores que a maioria dos outros e possuem superfície enrugada (Figuras 1 e 2). Ambos os grupos possuem parede celular composta por uma camada externa mais elétron-densa e uma interna mais elétron-opaca. Essa última é mais espessa em conídios submersos (espessura destes: $106 \pm 12 \text{ nm}$, enquanto que a dos aéreos mede $58 \pm 14 \text{ nm}$). Além disso, em conídios aéreos esta camada parece ser dividida em 3 camadas de espessura similar (HOLLAND et al, 2002).

As mitocôndrias podem ser observadas em ambos, embora em conídios submersos sejam menos distintas. Corpos lipídicos grandes são frequentemente observados em conídios submersos e ocasionalmente nos pertencentes ao outro grupo enquanto que os corpos multilamelares podem ser vistos apenas em conídios aéreos. Ocasionalmente pode se observar retículo endoplasmático nos conídios submersos. Os conídios, quando seccionados completamente, são largos, geralmente possuindo metade do diâmetro do conídio como um todo (HOLLAND et al, 2002).

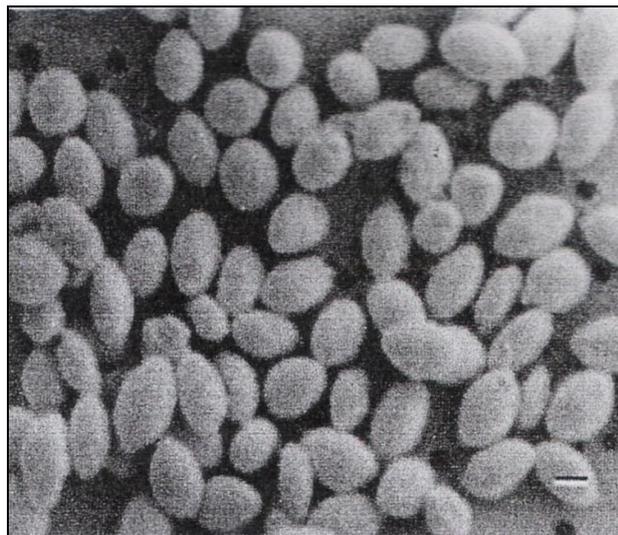


Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura de conídios aéreos de *P. lilacinus*. Nota-se uma homogeneidade no que se refere ao tamanho e textura dos conídios. Barra: $1 \mu\text{m}$. Fonte: HOLLAND et al, 2002.

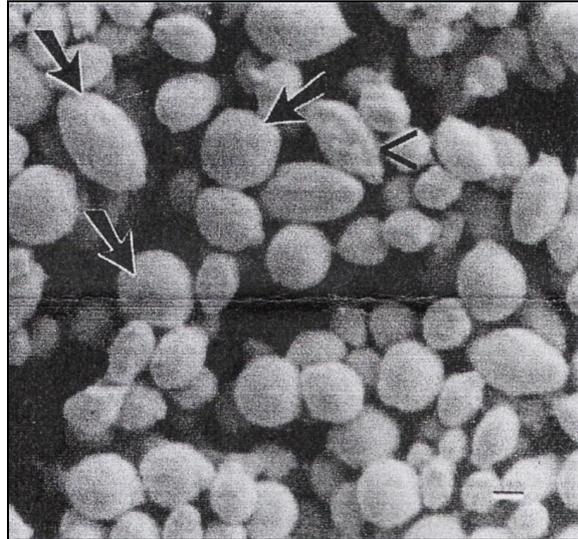


Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura de conídios submersos de *P. lilacinus*. Os conídios possuem diferenças expressivas de tamanho (setas) e alguns possuem superfície enrugada (ponta de seta). Barra: 1 μ m. Fonte: HOLLAND et al, 2002.

1.2 - EPIDEMIOLOGIA E CLÍNICA

Frequentemente, *P. lilacinus* aparece como contaminante proveniente do ar em espécimes clínicos e em soluções consideradas estéreis, tais como cremes antissépticos e loções para uso clínico. Por ser resistente à maioria das técnicas comerciais de esterilização, é capaz de resistir a 10 minutos de tratamento com 0,5% de ácido peracético, apenas se desvitalizando quando em contato com esta substância por 30 minutos. Diferentes espécies do gênero *Paecilomyces* já foram isoladas de água potável clorada com concentração fúngica nesta ainda maior do que na água não tratada (KUNSTÝR et al, 1997). *P. lilacinus* é capaz também de colonizar materiais tais como cateteres e implantes de dispositivos protéticos cirúrgicos (GUNASEKERA et al, 2000; ORTONEDA et al, 2004; WALSH et al, 2004).

A primeira descrição do gênero *Paecilomyces* como agente causal de infecção em humanos data do ano de 1963, em um caso de endocardite subsequente à substituição de válvula mitral, que levou o paciente à óbito (CASTRO, SALEBIAN & SOTTO, 1990). O primeiro relato de caso clínico em humanos por *P. lilacinus* (ainda *Penicillium lilacinum*) foi em 1972 por Fenech e Mallia, em um caso de efusão pleural (TAKAYASU, AKAGI & SHIMIZU, 1977).

A infecção por *P. lilacinus* é chamada de hialohifomicose, termo geral utilizado para agrupar as infecções causadas por diversos fungos que incluem espécies de *Acremonium* spp.,

Beauveria spp., *Fusarium* spp., *Scopulariopsis* spp., entre outros (MATSUMOTO et al 1994). Esta micose se caracteriza pela presença de hifas hialinas no tecido do hospedeiro (VARTIVARIAN et al, 1993).

Atualmente, *P. lilacinus* é considerado um importante patógeno oportunista humano, afetando indivíduos de todas as idades e ambos os sexos (TAN et al, 1992; PERFECT & SCHELL, 1996; WALSH & GROLL, 1999; WALSH et al, 2004; PASTOR & GUARRO, 2006). A porta de entrada deste microrganismo geralmente envolve alguma ruptura na barreira epidérmica, inserção de cateteres, inalação de conídios ou, em maior frequência, associada a cirurgias de implante de próteses (CASTRO, SALEBIAN & SOTTO, 1990; PASTOR & GUARRO, 2006).

1.2.1 - Aspectos Clínicos

Este fungo tem sido descrito como capaz de produzir doença principalmente em pacientes imunodeprimidos, normalmente causando infecções disseminadas (MURCIANO, DOMER & COHEN, 1990; GOTTLIEB & ATKINS, 2001; MARTIN, ROBERTS & GREENBERG, 2002; KURZAI et al, 2003; HALL et al, 2004; WALSH et al, 2004). Porém, esta infecção está emergindo em indivíduos imunocompetentes, que normalmente apresentam infecções localizadas, passando da média de um caso a cada 3-5 anos (1972 a 1984) a pouco mais de um caso por ano entre 1996 a 2002 (CAREY et al, 2003). Uma revisão de 49 casos por Chan-Tack et al, em 1999, demonstra claramente que a diferença percentual entre pacientes com ou sem supressão imunológica tem se tornado cada vez menor, com 54% e 46% de infectados, respectivamente. Porém a mortalidade em pacientes imunodeprimidos, nesta mesma pesquisa, foi de ~18,2%, e não houve morte entre as pessoas com o sistema imunológico competente.

Os fatores predisponentes para a hialohifomicose causada por *P. lilacinus*, incluem prolongada neutropenia, especialmente em pacientes com leucemia, transplantados ou em síndrome de imunodeficiência, quimioterapia citotóxica, além da terapia prolongada com corticosteróides (MOSIER et al, 1977; GUTIÉRREZ-RODERO et al, 1999; HALL et al, 2004; WALSH et al, 2004).

As principais manifestações clínicas em humanos incluem infecções oculares, cutâneas e subcutâneas, embora já tenha sido relatados também casos de onicomiose, vaginite, abscesso de pulmão, efusão pleural, sinusite, osteomielite, infecção disseminada e fungemia por *P. lilacinus* (PASTOR & GUARRO, 2006). Lesões granulomatosas são

comumente observadas, principalmente em infecções disseminadas (LIU et al, 1998). Entretanto, já foram relatados casos de infecção causada por *P. lilacinus* em pacientes sem fatores predisponentes (GUTIÉRREZ-RODERO et al, 1999), fato que o coloca atualmente como um fungo de grande significado médico. Além disso, o relato de casos de infecção nosocomial por *P. lilacinus* em pacientes após uso de loção dérmica (ITIN et al, 1998) aponta para o poder de invasão via cutânea desta espécie, principalmente em pacientes imunodeprimidos.

Em oculomicoses, as manifestações clínicas mais comuns incluem ceratite e endoftalmite, estando o implante de lentes intraoculares, o trauma não cirúrgico com ou sem um corpo estranho, a cirurgia oftálmica e o uso de lentes de contato na categoria dos fatores predisponentes mais comumente observados (PASTOR & GUARRO, 2006). Esses mesmos autores relataram que a enucleação e a perda da visão foram, na maioria dos casos, as consequências da infecção.

Infecções cutâneas e subcutâneas podem se manifestar de diversas formas, tais como erupções solitárias ou disseminadas com máculas eritematosas, pápulas, vesículas ou nódulos com um centro necrótico, além de celulite. Excluindo casos de infecções oculares, cutâneas ou subcutâneas, a sinusite e a fungemia estão entre as enfermidades mais comumente associadas à espécie em questão. Os casos de fungemia foram relacionados ao uso de cateteres venosos centrais. (PASTOR & GUARRO, 2006).

No Brasil há poucos relatos de infecção causada por este fungo (CASTRO, SALEBIAN & SOTTO, 1990; HOFLING-LIMA et al, 2005) devido ao desconhecimento do fungo. Hofling-Lima et al (2005) analisaram a frequência e a etiologia das doenças oculares micóticas diagnosticadas por cultura no Laboratório de Doenças Externas Oculares da UNIFESP/SP e os fatores associados às ceratites fúngicas, demonstrando o predomínio de infecções por fungos filamentosos, entre eles *P. lilacinus*, sobre as leveduras.

A patogênese desta micose ainda não foi totalmente esclarecida, mas toxinas da classe dos nonapeptídeos produzidas por *P. lilacinus*, denominadas leucinoestatinas ou paecilotoxinas, podem estar envolvidas neste processo (MASLEN et al, 1988; PARK et al, 2004). Essas substâncias derivadas de culturas são altamente tóxicas a animais de laboratório e parecem ter um impacto direto na resposta inflamatória tecidual. Possuem forte atividade contra mitocôndrias hepáticas de ratos e a inoculação de leucinoestatinas diretamente na córnea de coelhos resulta em formação de abscesso. Estes achados sugerem que a produção desta toxina pode ser um importante fator de virulência (WESTENFELD, ALSTON & WINN, 1996; PARK et al, 2004). A habilidade patogênica difere geneticamente entre as

cepas e há uma variação intraespecífica nas atividades biológicas entre os isolados de *P. lilacinus*, com consequente diferença entre a produção de leucinoestatinas (GUNASEKERA et al, 2000; KHAN, WILLIAMS & NEVALAINEN, 2003).

A hialohifomicose por *Paecilomyces* spp. já foi descrita em uma variedade de animais, tanto imunocompetentes quanto imunodeprimidos. A porta de entrada mais comum do microrganismo é a inoculação traumática intra dérmica e a disseminação da doença pode ocorrer do sítio de inoculação primária para vários tecidos (HOLAHAN et al, 2008). Em ovíparos foi sugerido que a contaminação pode ocorrer quando o ovo passa pela cloaca da mãe (JACOBSON et al., 1979) As manifestações clínicas em pacientes veterinários variam de doença localizada leve a infecções severas, porém localizadas, além de disseminação da enfermidade com fungemia (FOLEY, NORRIS & JANG, 2002). Já foram relatadas em cães: discospondilite, retinocoroidite, osteomielite, calcinosis cútis e pneumonia, sendo esta última também verificada em cavalos, répteis e camundogos (PATNAIK et al, 1972; GARCIA et al, 2000; FOLEY, NORRIS & JANG, 2002; HOLAHAN et al, 2008).

Assim como em humanos, duas espécies são de grande importância na medicina veterinária, *P. variotti* e *P. lilacinus*. *P. variotti* foi descrito causando doença em cães, gatos domésticos e animais de laboratório naturalmente infectados (PATNAIK et al, 1972; LITTMAN & GOLDSCHMIDT, 1987; KUNSTÝR et al., 1997; FRANCE & MUIR, 2000; BOOTH et al., 2001; HOLAHAN et al., 2008). *P. lilacinus* tem sido associado a doenças em gatos, tartarugas, crocodilos e tatus (GORDON, 1984; HEARD et al., 1986; MASLEN et al., 1988; ROSSER, Jr., 2003; LI et al., 2008).

As manifestações clínicas mais comuns da hialohifomicose por *P. lilacinus* em animais são pontos brancos e intumescimentos no corpo do animal, lesões de pele, depressão, anorexia e, eventualmente, morte. Li et al (2008) relataram que a principal causa de morte em tartarugas foi a doença “white-spot”, levando a severas perdas econômicas para a indústria chinesa que comercializava tais animais. Em répteis a supressão imunológica faz-se necessária para que haja infecção micótica (HEARD et al., 1986). A doença ocorre normalmente quando há flutuações de temperatura, ocasionando mudanças no tecido linfóide, como por exemplo, a produção de imunoglobulina que nestes animais é temperatura dependente (JACOBSON et al, 1979; LI et al, 2008). Esta situação é mais crítica quando os animais são mantidos em cativeiro (MASLEN et al., 1988).

1.3 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da infecção por *P. lilacinus* é baseado na descrição microscópica das lesões e na cultura do fungo (PASTOR & GUARRO, 2006). Entretanto, não é simples realizar o diagnóstico etiológico através de análise histopatológica, uma vez que os agentes da hialohifomicose se apresentam nos tecidos de forma similar. Durante o exame histopatológico é possível observar hifas hialinas, septadas com ramificações tanto em 45° quanto em 90°, conídios isolados ou presos a fiálides, além de células semelhantes a leveduras. Dessa forma, é extremamente importante a cultura para a visualização das estruturas morfológicas típicas do fungo (LIU et al, 1998; PERFECT & SCHELL, 1996; WESSOLOSSKY, HARAN & BAGCHI, 2008; YUAN et al, 2009).

Quanto à reação tecidual, os granulomas, a necrose, as inflamações aguda e crônica, a invasão vascular e a trombose já foram descritos, sendo os três primeiros mais comumente observados (MOSIER et al, 1977; LIU et al, 1998). As células frequentemente observadas neste exame associadas ao *P. lilacinus* são linfócitos, neutrófilos, macrófagos, células epiteliais e gigantes (TAKAYASU, AKAGI & SHIMIZU, 1977; AGRAWAL et al, 1979; CASTRO, SALEBIAN & SOTTO, 1990; WESTENFELD, ALSTON & WINN, 1996; GUTIÉRREZ-RODERO et al, 1999; YUAN et al, 2009)

1.4 - TRATAMENTO

Um tratamento considerado ótimo para a infecção por *P. lilacinus* ainda não foi estabelecido e, com isso, o prognóstico não é favorável. Além disso, existe a dificuldade em se obter uma padronização de testes *in vitro* de susceptibilidade a antifúngicos e sua correlação com as respostas terapêuticas dos pacientes. Em infecções localizadas, a remoção do foco de infecção e a eliminação de qualquer corpo estranho deve ser realizada na medida do possível (PASTOR & GUARRO, 2006). *P. lilacinus* é normalmente resistente a anfotericina B e 5-fluor-citosina, e sensível aos novos derivados azólicos. Posaconazol, ravuconazol e principalmente voriconazol têm demonstrado boa atividade *in vitro* contra o fungo ; SPONSEL et al., 2006; MULLANE et al., 2007; VAN SCHOONEVELD et al., 2008). Em muitos casos, a combinação de agentes antifúngicos ou a associação desses agentes e cirurgia foram necessárias para resolver a infecção (CHUNG et al., 2007; PASTOR & GUARRO, 2007; CHANG et al., 2008; FORD, AGEE & GREENHAW, 2008; YUAN et al.,

2009). O sucesso no tratamento apenas com antifúngicos orais sem cirurgia tem sido obtido somente em pacientes imunocompetentes (GOTTLIEB & ATKINS, 2001).

1.5 – RESPOSTAS IMUNES AOS FUNGOS

Em posição central em relação às defesas inata e adquirida está a população de fagócitos profissionais, consistindo de monócitos/macrófagos e neutrófilos. O sucesso do sistema imunológico inato no controle da infecção fúngica depende de vários fatores, incluindo rota de infecção, grandeza do inóculo e “status” de ativação do sistema imune do hospedeiro (MANSOUR & LEVITZ, 2002). A fagocitose profissional compreende uma série de eventos, começando com a ligação e reconhecimento de partículas por receptores de superfície celular, seguida da formação de extensões de membrana ricas em actina, que envolvem a partícula. A fusão destas extensões resulta na formação do fagossomo, no qual precede a sua maturação em fagolisossomo. Os patógenos dentro deste, normalmente, são destruídos por queda do pH, por hidrólise, e pelo ataque de radicais derivados de oxigênio e nitrogênio. Como resultado deste processo, moléculas derivadas de patógenos podem ser apresentadas na superfície celular (apresentação de antígeno), permitindo a indução da imunidade adquirida, formada por células T e B (HENNEKE & GOLENBOCK, 2004).

Estas defesas são tão bem sucedidas, que algumas infecções são raras na ausência de imunossupressão. Além disso, defeitos específicos no sistema imune predispoem pacientes a micoses específicas (MANSOUR & LEVITZ, 2002). Desordens qualitativas e quantitativas na função fagocítica do hospedeiro predispoem ao desenvolvimento da aspergilose e da candidíase invasivas. Problemas na imunidade mediada por células predispoem os pacientes a criptococose, histoplasmose, coccidioidomicose e candidíase mucocutânea. Por outro lado, uma resposta inflamatória exacerbada a antígenos fúngicos pode resultar em morbidade e mortalidade devido a danos ao tecido do hospedeiro (LEVITZ, 1992).

Os macrófagos são células oriundas de monócitos que migram até o tecido conjuntivo (histiócitos) ou ao parênquima de algum órgão, sendo de grande importância ao sistema imunológico inato. Este se apresenta à microscopia como uma célula grande, com núcleo em forma de rim, amebóide, possuindo retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos. São células de altíssimo poder fagocitário que possuem em seus lisossomos diversas enzimas hidrolíticas, como hidrolases ácidas e lisozima, além de radicais derivados de oxigênio, como o superóxido, radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O interferon gama (IFN- γ) produzido por linfócitos T helper (T_H) (também conhecidos como

linfócitos T CD4) estimula a fusão dos lisossomos com o fagossomo para que haja a digestão intracelular. Na inflamação crônica granulomatosa, os macrófagos possuem grande atividade secretora e pouca atividade fagocítica, secretando enzimas hidrolíticas com poder microbicida que podem causar necrose no centro desses granulomas, como por exemplo, a necrose caseosa encontrada na tuberculose (MAYER, 2009; JÚNIOR, 2010).

A atividade fagocítica antifúngica envolve mecanismos oxidativos e não oxidativos e pode ser aumentada por opsoninas e outras citocinas oriundas de células T. A via oxidativa, conhecida como “burst” respiratório, utiliza enzimas como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que ativada produz intermediários reativos de oxigênio com efeitos tóxicos para as células fúngicas, tais como ânion superóxido e H_2O_2 . O papel do ânion superóxido (O_2^-) na atividade fungicida de macrófagos murinos contra *Penicillium marneffei* tem sido estudado na tentativa de elucidar os mecanismos de defesa do hospedeiro contra este agente oportunista (KUDEKEN, KAWAKAMI & SAITO, 1999a). Um dos mecanismos de destruição destes fungos por polimorfonucleares (PMN) é mediado por intermediários reativos de oxigênio produzidos por fagócitos ativados (KUDEKEN, KAWAKAMI & SAITO, 1999b). No caso de aspergilose por *Aspergillus fumigatus*, por exemplo, PMNs são capazes de danificar as hifas por meio de superóxido, e espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos alveolares têm um importante papel na morte de conídios desta mesma espécie, sendo o O_2^- um bom indicador da atividade fungicida de PMNs (AKPOGHENETA et al, 2003; PHILIPPE et al, 2003).

A via não oxidativa consiste na degranulação e liberação de defensinas, peptídeos catiônicos e outras moléculas efetoras (ANTACHOPOULOS & ROILIDES, 2005; Mayer, 2009). Já na via do óxido nítrico, a ligação do microrganismo com os macrófagos, particularmente pela ligação via receptores do tipo Toll, resulta na produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que induz a expressão da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) resultando na produção de óxido nítrico (NO). Se a célula é também exposta ao IFN- γ é produzido NO adicional. O NO liberado pela célula é tóxico e pode matar microrganismos na vizinhança do macrófago (MAYER, 2009).

Considerando o papel central desenvolvido por macrófagos na maioria dos processos imunológicos, além da variedade de funções que estas células desempenham, é importante correlacionar as atividades biológicas destas com suas propriedades bioquímicas. O isolamento de linhagens contínuas de células murinas com propriedades comuns a macrófagos providenciam um modelo conveniente para o estudo da função macrofágica, devido a estas células serem homogêneas e poderem ser obtidas em grandes quantidades (SNYDERMAN et

al, 1977). A célula da linhagem J774 é oriunda de reticulossarcoma de camundongo BALB/c e foi descrita pela primeira vez em 1975 por Ralph, Prichard e Cohn. Ela apresenta propriedades citológicas, de aderência e fagocíticas comuns de macrófagos (RALPH, PRICHARD & COHN, 1975) e já foi descrita inúmeras vezes em interações com microrganismos. Já houve descrição da interação desta célula com vários fungos, tais como *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium marneffeii*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (TUCKER & CASADEVALL, 2002; ALVAREZ & CASADEVALL, 2007; NGUYEN et al, 2009; WELLINGTON, DOLAN & KRYSAN, 2009).

Alguns patógenos são conhecidos pela capacidade de escape do sistema imune. Conídios de *A. fumigatus*, por exemplo, resistem a fagocitose por monócitos e neutrófilos humanos oriundos de sangue periférico por 1,5 horas. (ROBERTSON et al, 1987). Ademais, microrganismos podem sobreviver dentro dos fagócitos, dependendo do uso seletivo de receptores fagocíticos particulares no qual medeiam a fagocitose sem induzirem funções bactericidas. Por exemplo, fagossomos contendo *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose, se fundem com lisossomos quando a bactéria é opsonizada por soro imune antes da infecção pelo macrófago, assim recrutando receptores opsônicos para fagocitose, mas não se fundem sob condições não opsônicas. Similarmente, a atividade de NADPH oxidase é estimulada somente quando a micobactéria entra em macrófagos humanos sob condições opsônicas (LE CABEC, COLS & MARIDONNEAU-PARINI, 2000).

Componentes fúngicos, como a parede celular, tem um papel fundamental nos processos inflamatórios observados durante infecções experimentais, levando a produção de mediadores como TNF- α , fragmentos de complemento e também propriedades imunológicas potentes relacionadas à ativação de células B não específicas (SILVA et al, 1997). Os mecanismos relacionados ao *P. lilacinus*, tanto no que diz respeito à produção de quimiocinas e citocinas, como os mecanismos envolvidos na fagocitose deste fungo, até o momento, são desconhecidos. A literatura descreve que as características clínicas e morfológicas e a resposta à terapia antifúngica em um caso descrito de um paciente com AIDS e infecção disseminada por este fungo foram similares aos casos registrados de infecção devido ao *P. manerffei*, outro fungo oportunista (LOVELL et al 2002).

Sendo assim, visando a ampliação dos conhecimentos sobre a patogênese deste fungo, foi objetivado o estudo *in vitro* da infecção de macrófagos murinos competentes por três diferentes isolados de *P. lilacinus* oriundos de casos humanos com distintas formas clínicas de hialohifomicose.

2 – OBJETIVOS:

2.1 - OBJETIVO GERAL

Analisar comparativamente a interação entre macrófagos murinos e células da linhagem J774 e três diferentes isolados de *Paecilomyces lilacinus*.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver a metodologia de obtenção de conídios de *P. lilacinus*;
- Padronizar a técnica para a pesquisa da interação de macrófagos peritoneais murinos com *P. lilacinus*;
- Analisar a interação de macrófagos murinos com três isolados de *P. lilacinus* por observação em microscopia óptica e eletrônica.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- ISOLADOS FÚNGICOS

Foram utilizados três isolados de *P. lilacinus* provenientes de casos clínicos humanos com diferentes apresentações clínicas: um isolado de lesão tibial (KURZAI et al, 2003); um isolado de seio nasal e um isolado de biópsia de pele, gentilmente cedidos pela Dra. Annette W. Fothergill do Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX.

3.2 - ANÁLISE MORFOLÓGICA

A caracterização macromorfológica dos isolados foi realizada cultivando-os em placas de Petri contendo meio de batata, dextrose, ágar (BDA) para a análise das colônias. Para a observação das delicadas estruturas morfológicas do fungo, microculturas foram realizadas (RIDDEL, 1950), utilizando o meio extrato de malte ágar (MEA).

Todas as etapas do crescimento fúngico foram acompanhadas pelo preparo de lâminas, coradas com lactofenol de Amann acrescido de azul de algodão (fenol 20g, ácido láctico 20mL, glicerol 40mL, água destilada 20 mL, azul de algodão 0,05g/100mL). Posteriormente, as estruturas fúngicas foram visualizadas por meio de microscópio óptico Zeiss modelo Axiophot do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos da Fiocruz.

3.3- OBTENÇÃO DOS CONÍDIOS

Os conídios de *P. lilacinus* foram obtidos pelo crescimento dos isolados em meio BDA (batata, dextrose, ágar), à temperatura ambiente, por 10 a 12 dias. Os conídios produzidos foram ressuspensos em 5 mL de salina tamponada com fosfato (PBS 50 mM, pH

7,2). Em seguida o tubo foi homogeneizado com pipeta de 1 mL, colocado em gelo por 5 minutos, passado em vórtex por 3 minutos, colocado em água morna na estufa à 37°C por mais 5 minutos e centrifugado por 30 minutos a 500 rpm. O sobrenadante foi então transportado para outro tubo e os conídios foram contados na câmara de Neubauer. Após, centrifugou-se o tubo por 10 minutos a 4000 rpm, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se os conídios em 1 mL de meio RPMI-1640 estéril com 10% de soro fetal bovino.

3.4 - OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS MURINOS E INTERAÇÃO COM CONÍDIOS

Camundongos machos C57BL/6, pesando 21 gramas foram submetidos à eutanásia por inalação de CO₂. Após, a pele abdominal dos animais foi rompida pela ajuda de 2 pinças dente de rato, no interior de cabine de segurança biológica, e em seguida injetou-se no interior do peritônio 3 mL de meio RPMI-1640 estéril (SIGMA®). Cuidadosamente, massageou-se o peritônio, para em seguida todo o material ser aspirado e transferido para tubo cônico estéril (Corning®) em banho de gelo. As células, tanto os macrófagos murinos quanto as células da linhagem J774 (ATCC, Rockville, MD), foram contadas em hemocítmetro (5×10^5 células/mL) e transportadas para LAB-TEK® e garrafas de 25 cm² (Corning®) para futuras análises por microscopia óptica e eletrônica de transmissão, respectivamente, acrescidas de meio RPMI-1640 estéril (SIGMA®) com 10% de soro fetal bovino e incubadas em estufa (Thermo Electron Corporation Revco®) a 37°C com atmosfera úmida de 5% de CO₂ “overnight”. As lâminas e garrafas foram então lavadas com PBS estéril, à temperatura ambiente, para retirar as células não aderentes e adicionou-se meio de cultura RPMI 1640 com glutamina (SIGMA®) e 10% de soro fetal bovino. A interação foi então realizada na proporção 2:1 (conídio:macrófago). Após interação, as células foram lavadas com PBS estéril, à temperatura ambiente. Macrófagos de murinos (C57BL/6) e células da linhagem J774 sem que fossem introduzidos conídios foram utilizados como grupo controle. A fixação foi realizada de acordo com a técnica empregada para cada análise, descrita a seguir. Este experimento está licenciado pelo Comitê de Ética Animal, sob o número L-047/08, até 9 de junho de 2012.

3.5 – ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS CONÍDIOS COM OS MACRÓFAGOS

3.5.1 - Microscopia óptica

Para microscopia óptica, as células foram fixadas com metanol (Isofar®) por 3 minutos e coradas com May–Grunwald–Giemsa (MERCK®), durante 15 minutos e uma cinética foi realizada avaliando-se os seguintes tempos: 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 14, 24 e 48h de interação. As células foram então observadas e foi realizada uma contagem do número de conídios por célula infectada, número de células infectadas e não infectadas. O número de macrófagos infectados foi determinado pela observação de pelo menos 100 células selecionadas aleatoriamente em um aumento de 1000x utilizando o microscópio óptico Zeiss, modelo Axiostar Plus do Laboratório de Imunologia da Fiocruz. O índice endocítico foi calculado, segundo Bourguignon et al (2009) da seguinte forma:

$$\text{Índice Endocítico (IE)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de conídios}}{100} \times \text{n}^\circ \text{ de células infectadas}$$

3.5.2 – Microscopia eletrônica de transmissão

Os macrófagos interagindo com os conídios, nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 5 e 14 horas e o grupo controle foram fixados por 1 hora a 4°C com 2,5% de glutaraldeído (SIGMA®) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 com 3,5% de sacarose. Em seguida, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio em 0,1M de tampão cacodilato de sódio. Após estes procedimentos, foram lavadas em tampão cacodilato e as células desidratadas por 10 minutos em concentrações crescentes de 30, 50, 70, 90 e 100% de acetona (MERCK®) para logo após serem infiltradas e incluídas em resina PolyBed 812 e polimerizados à 60°C por 3 dias. Os blocos foram cortados em ultramicrotomo (ultramicrotomo Reichert OmU3) e a contrastação dos cortes feita com acetato de uranila (electron microscopy sciences) e citrato de chumbo (MERCK®) e as análises realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol modelo JEM-1011, Plataforma de Multiusuário de Microscopia Eletrônica IOC/Fiocruz.

4 – RESULTADOS

4.1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Na análise da macromorfologia, os isolados de *P. lilacinus* estudados apresentaram colônias, inicialmente, brancas tornando-se de coloração rósea à violeta (figura 3). O reverso destas colônias apresentou coloração amarelo-acinzentado (figura 4). As características dos três isolados são compatíveis com a descrição da espécie (SAMSON, 1974).

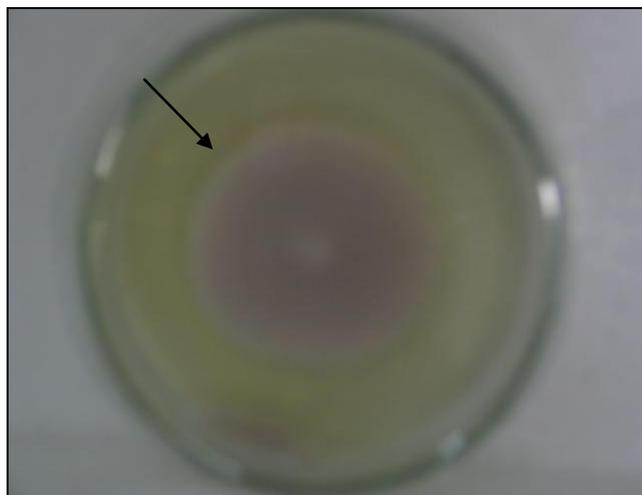


Figura 3 – Macromorfologia de cultura de *P. lilacinus* em meio batata, dextrose, ágar (BDA), após 12 dias de crescimento (seta). Isolado proveniente de seio nasal. Observa-se colônia de coloração rósea à violeta.

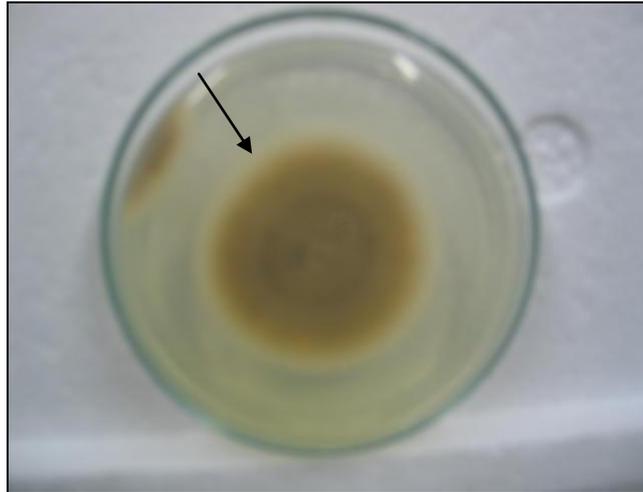


Figura 4 – Macromorfologia da cultura de *P. lilacinus* em meio batata, dextrose, ágar (BDA), após 12 dias de crescimento (seta). Isolado proveniente de seio nasal. Observa-se reverso da colônia de coloração amarelo acinzentado.

No estudo da micromorfologia, observou-se hifas vegetativas de parede lisa e conidióforos sustentando fiálides em forma de garrafa com delicado pescoço em número de 2 a 4. Sobre as fiálides foram visualizados conídios elípticos à fusiformes, hialinos. Clamidosporos ausentes (figura 5).

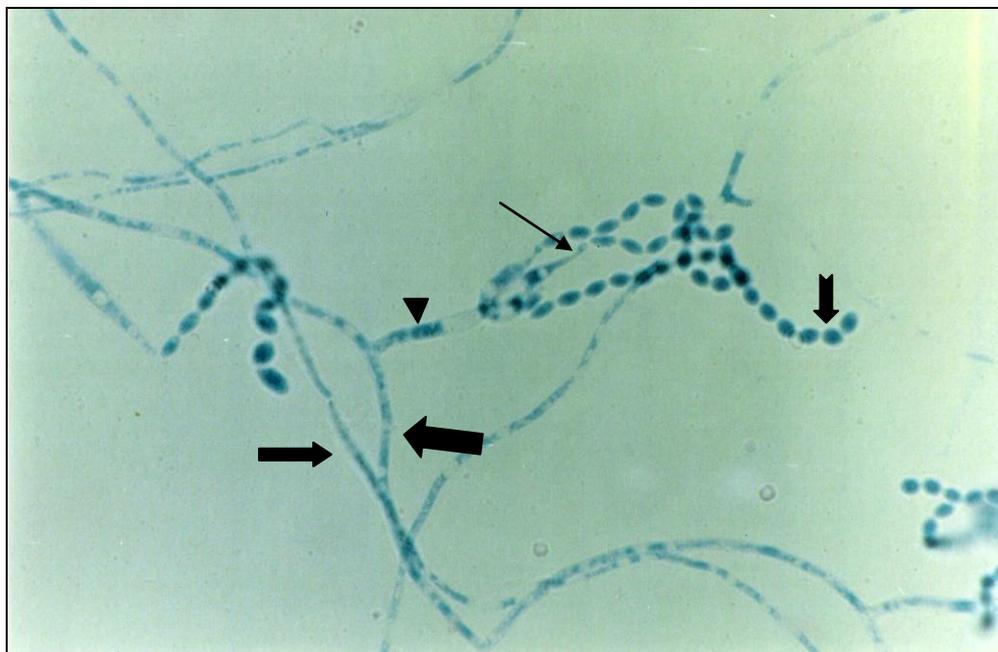


Figura 5 – Microcultura de *P. lilacinus* em meio extrato de malte ágar (MEA), à temperatura ambiente, após 14 dias de crescimento. Isolado proveniente de seio nasal. Observam-se hifas vegetativas hialinas (➡), conidióforo (▶), sustentando três fiálides em delicado pescoço (➔) e sobre elas conídios elípticos à fusiformes (➞). Coloração: lactofenol de Amann com azul de algodão. Aumento igual a 1000 x.

4.2 – ANÁLISE DA CINÉTICA DE INTERAÇÃO MACRÓFAGO-CONÍDIO POR MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

Foi observado que em 30 minutos de interação ambos os macrófagos, peritoneais e da linhagem J774, encontravam-se associados aos conídios (figura 6). Não foi possível distinguir adesão de internalização neste tempo. Entre 1 e 6 horas de interação, a internalização dos conídios aumentou gradualmente (figuras 7 a 10) e foi confirmada pela presença de estruturas semelhantes a fagossomos contendo conídios. Após 14 horas, houve um aumento perceptível do volume conidial, com a formação de tubos germinativos, que provavelmente resultou no rompimento das membranas dos macrófagos (figura 11). Em 24 horas, houve formação de micélio nas culturas de macrófagos peritoneais murinos, porém em culturas de J774 infectadas com *P. lilacinus* ainda eram vistos muitos conídios formando tubo germinativo (figura 12). Em 48 horas, apenas hifas foram observadas em ambos os tipos celulares (figura 13). Em geral, comparadas aos macrófagos peritoneais murinos, as células da linhagem J774 apresentaram menor susceptibilidade aos conídios de *P. lilacinus*, associadas ao surgimento, relativamente mais lento das hifas a partir dos conídios. Todos os três isolados de *P. lilacinus* apresentaram o mesmo comportamento frente aos fagócitos.

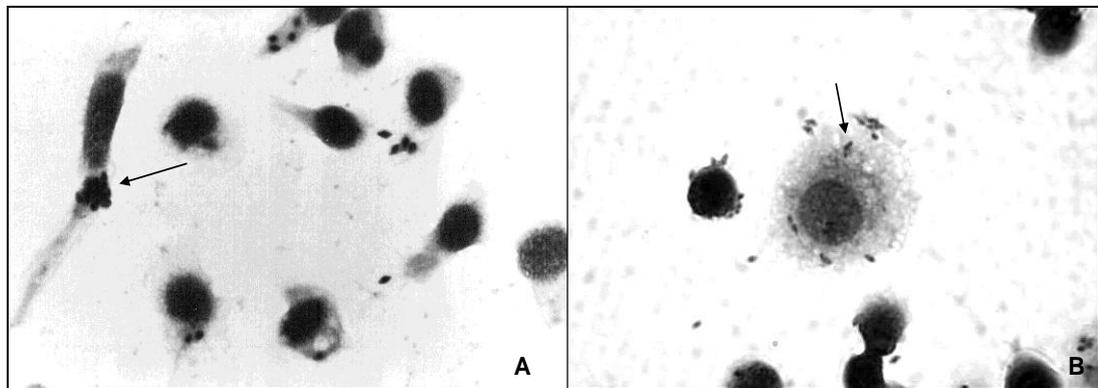


Figura 6 : Microfotografia da interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de *P. lilacinus* do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 30 minutos. Notar associação dos conídios com os macrófagos (setas) Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x

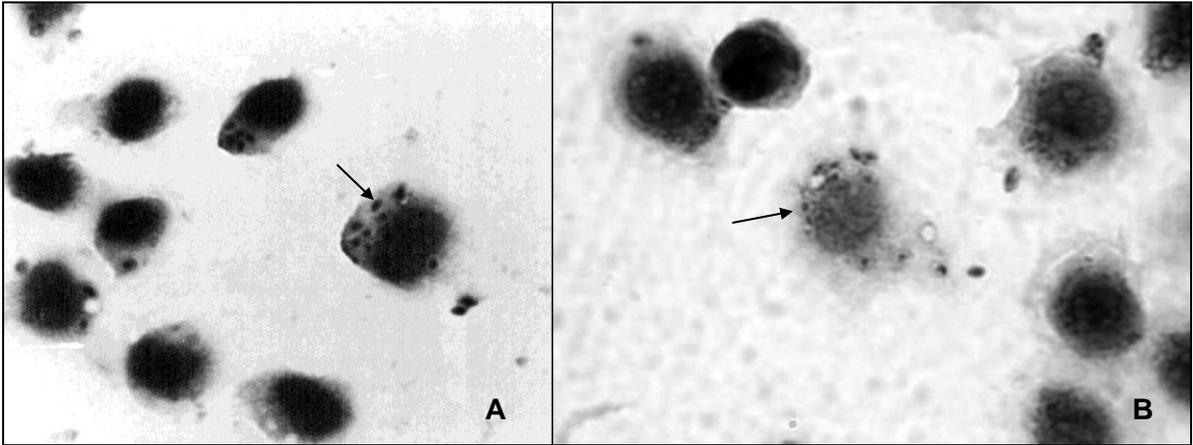


Figura 7 : Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de *P. lilacinus* do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 1 hora. Notar internalização de conídios (setas). Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x

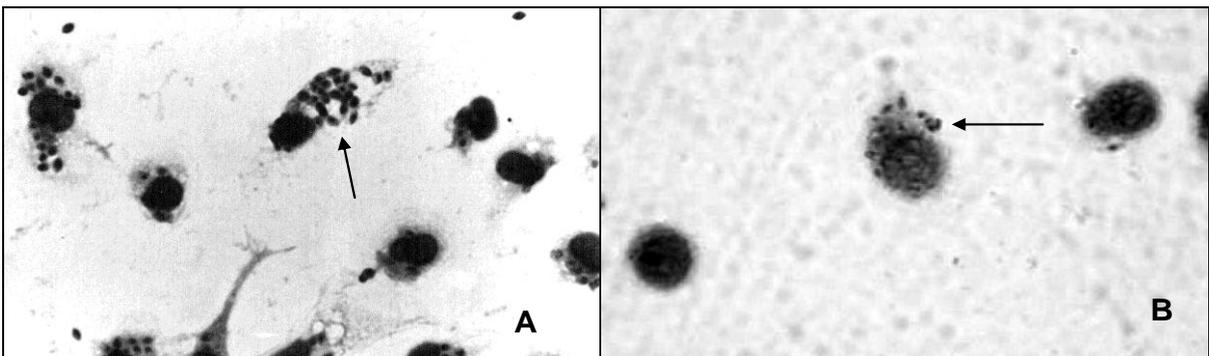


Figura 8: Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de *P. lilacinus* do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 2 horas. Notar aumento do número de conídios por macrófago (setas). Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x

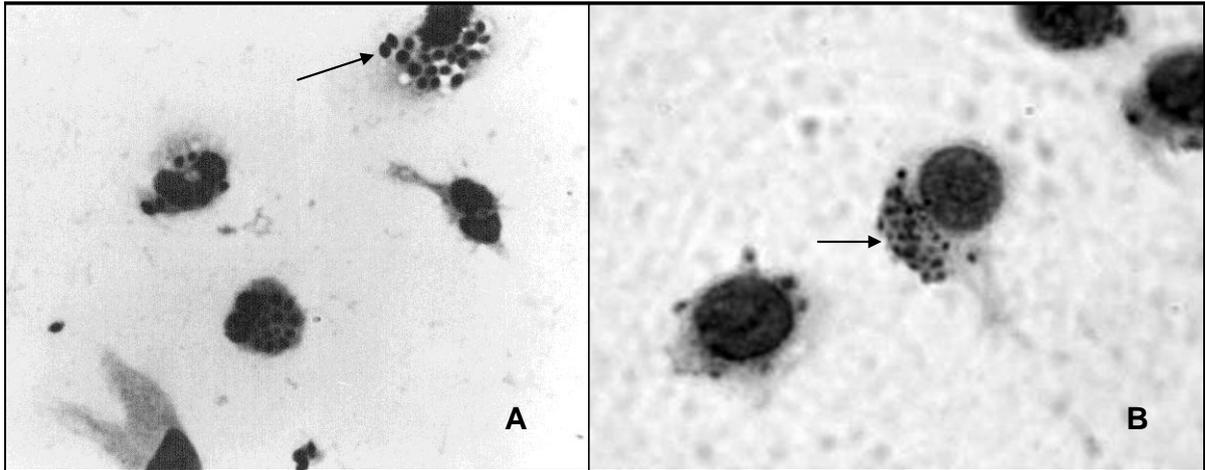


Figura 9: Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de *P. lilacinus* do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 4 horas. Notar aumento do número de conídios por macrófago (setas). Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x

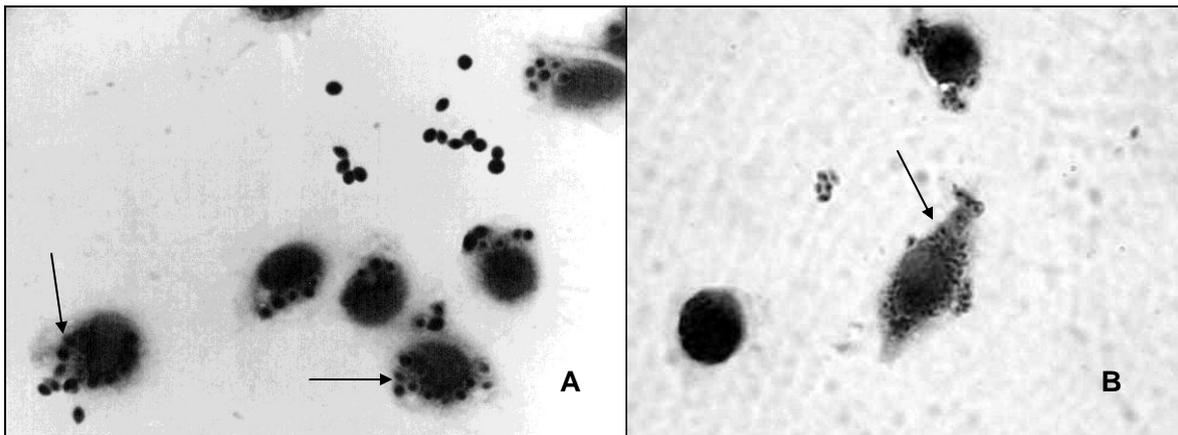


Figura 10: Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de *P. lilacinus* do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 6 horas. Notar aumento do número de conídios por macrófago (setas). Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x

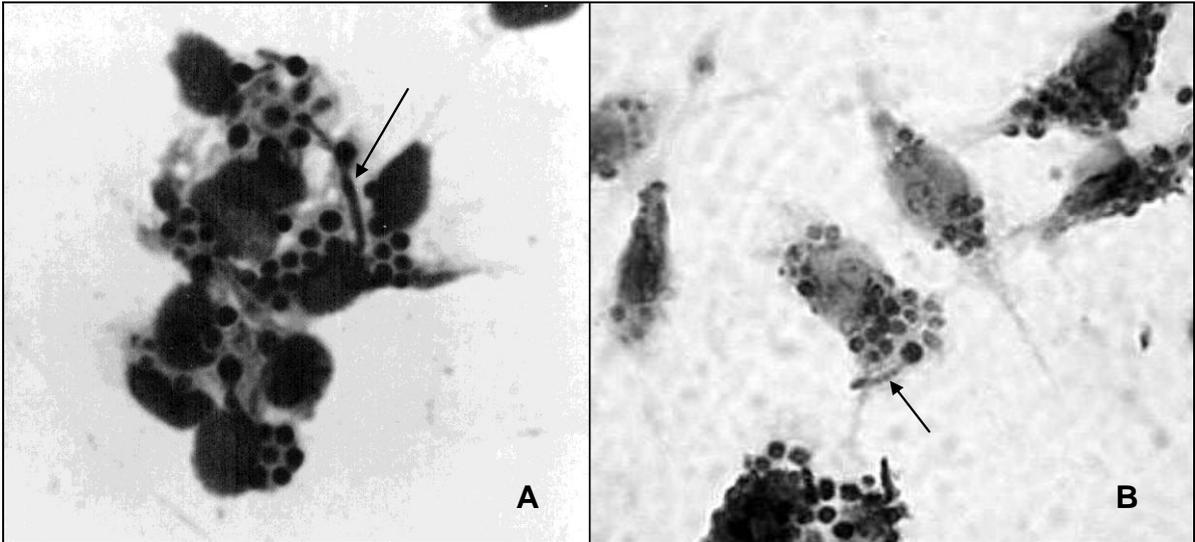


Figura 11: Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de *P. lilacinus* do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 14 horas. Notar formação de tubo germinativo (setas). Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x

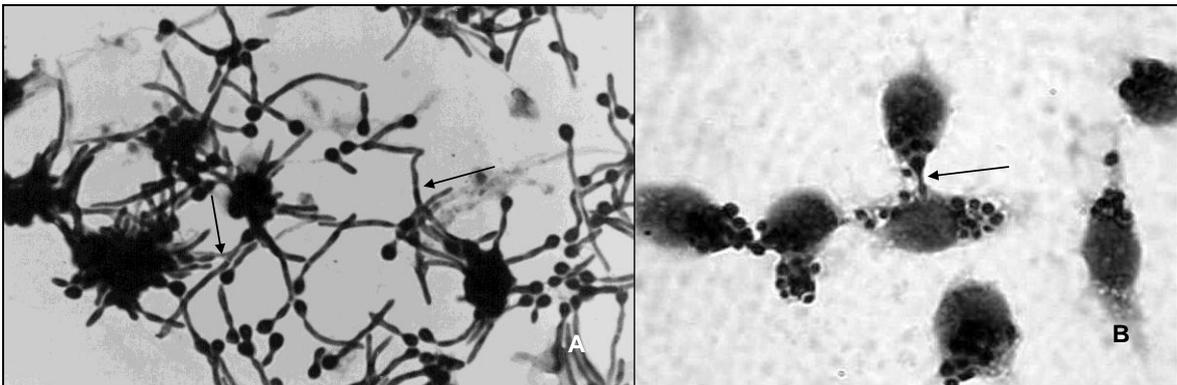


Figura 12: Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de *P. lilacinus* do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 24 horas. A partir de tubos germinativos, há produção de hifas septadas em macrófagos murinos (seta) (A). Note um atraso no tempo da J774. Ainda há formação de tubos germinativos nesta fase (seta) (B). Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x

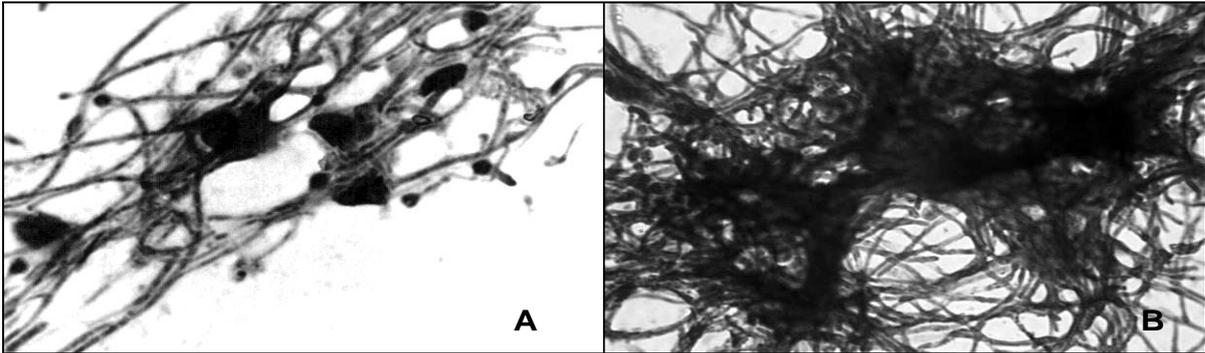


Figura 13: Interação de macrófagos peritoneais murinos (A) e células da linhagem J774 (B) com conídios de *P. lilacinus* do isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação: 48 horas. Apenas hifas são observadas, com raros macrófagos. Coloração com Wright-Giemsa. Aumento original: 1000x.

Em relação ao índice endocítico calculado foi verificado que em 30 minutos de interação 36% (IE = 33,3) e 35% (IE = 44,8) dos macrófagos peritoneais murinos e células J774, respectivamente, encontravam-se infectados pelos conídios de *P. lilacinus*. Após 4 horas de interação, as células da linhagem J774 apresentaram índices endocíticos, aproximadamente, duas vezes maiores que àqueles encontrados para os macrófagos peritoneais murinos. Os gráficos 1 e 2 demonstram os índices endocíticos de ambos os tipos celulares.

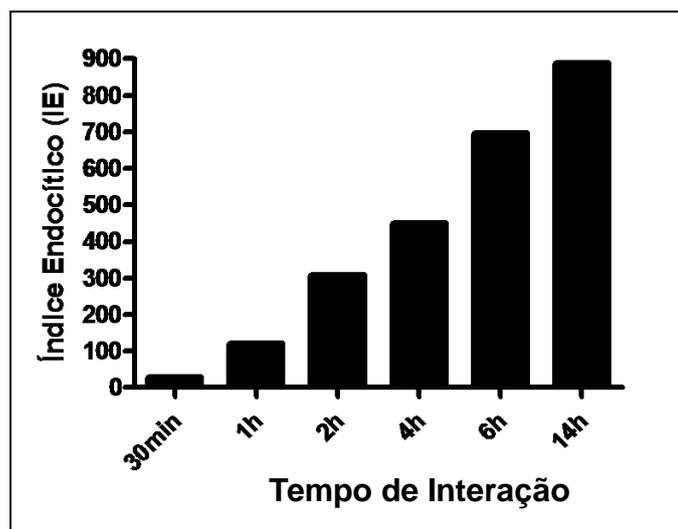


Gráfico 1 – Cinética da interação de macrófagos peritoneais murinos por conídios de *P. lilacinus* quanto ao índice endocítico. Os resultados representam uma média dos três isolados testados. A contagem dos conídios foi realizada em microscópio óptico, aumento de 1000x.

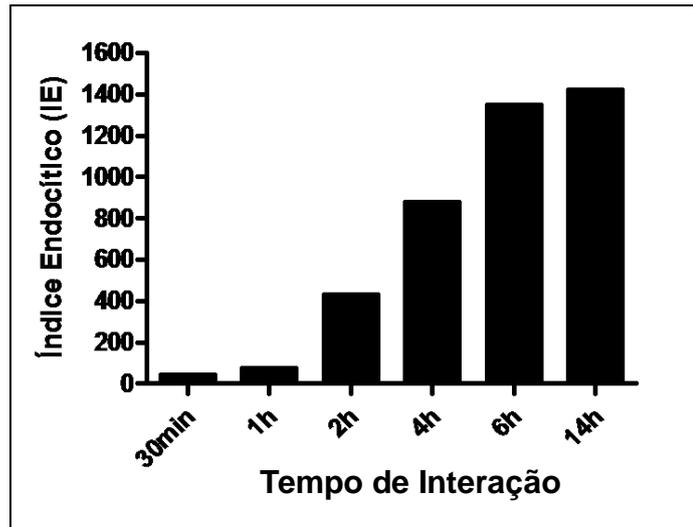


Gráfico 2 - Cinética da interação de células da linhagem J774 por conídios de *P. lilacinus* quanto ao índice endocítico. Os resultados representam uma média dos três isolados testados. A contagem dos conídios foi realizada em microscópio óptico, aumento de 1000x.

4.3 – CINÉTICA DA INTERAÇÃO MACRÓFAGO-CONÍDIO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Os tempos de 30 minutos, 1, 2, 5 e 14 horas de incubação foram escolhidos por considerarmos os mesmos pontos-chave na interação macrófago-fungo, como determinado pela MO.

Em 30 minutos de interação os macrófagos peritoneais murinos e as células da linhagem J774 já apresentavam conídios internalizados firmemente associados ao fagossomo, porém ainda havia vários conídios aderidos à superfície dos fagócitos (Figuras 14 e 15). Em 1 e 2 horas de interação somente conídios internalizados foram vistos (Figuras 16 e 17). Em 5 horas de interação com macrófagos peritoneais murinos foram observados aumento do volume conidial, tubos germinativos com presença ou não de septo (Figuras 18 e 19). Interessante notar que na interação de conídios com células da linhagem J774, neste mesmo tempo, não foram visualizados conídios internalizados formando tubos germinativos (Figura 20). Em 14 horas de interação dos macrófagos peritoneais e conídios, pode-se verificar um aumento do número de conídios em fase de germinação, indicando intensa atividade metabólica dos conídios dentro dos macrófagos (Figura 21). Entretanto, para as células J774, somente neste tempo de incubação é que foram observados os tubos germinativos, demonstrando menor susceptibilidade desta linhagem, como observado pela MO (figura 22).

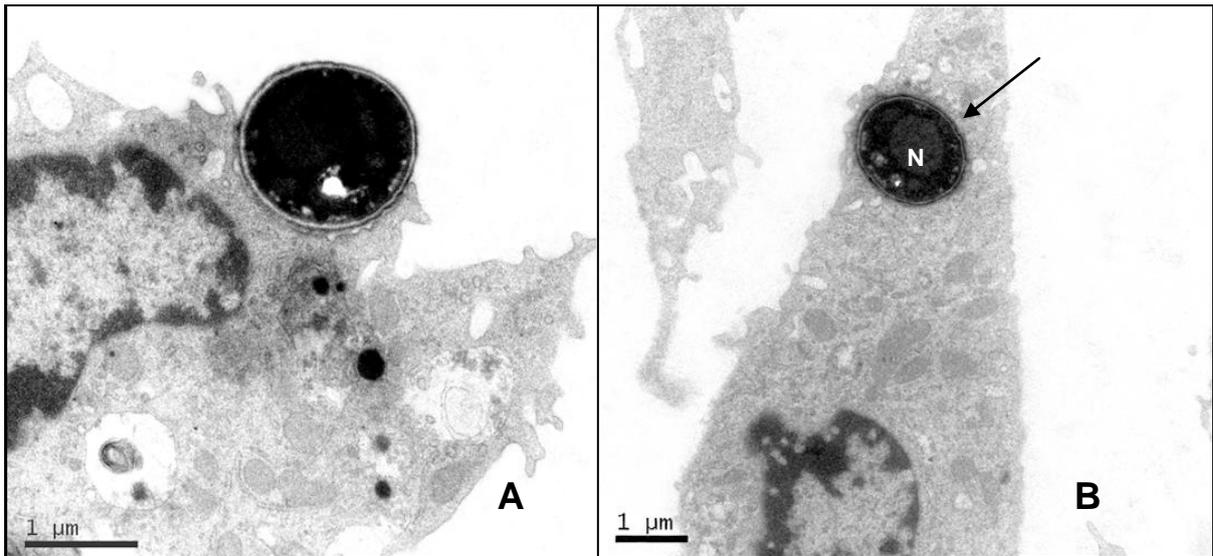


Figura 14 – Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de *P. lilacinus*, isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 30 minutos. A: Notar adesão conidial (Aumento: x 25.000). B: Observa-se conídio internalizado (seta) com núcleo evidente (N) (Aumento: x 15.000).

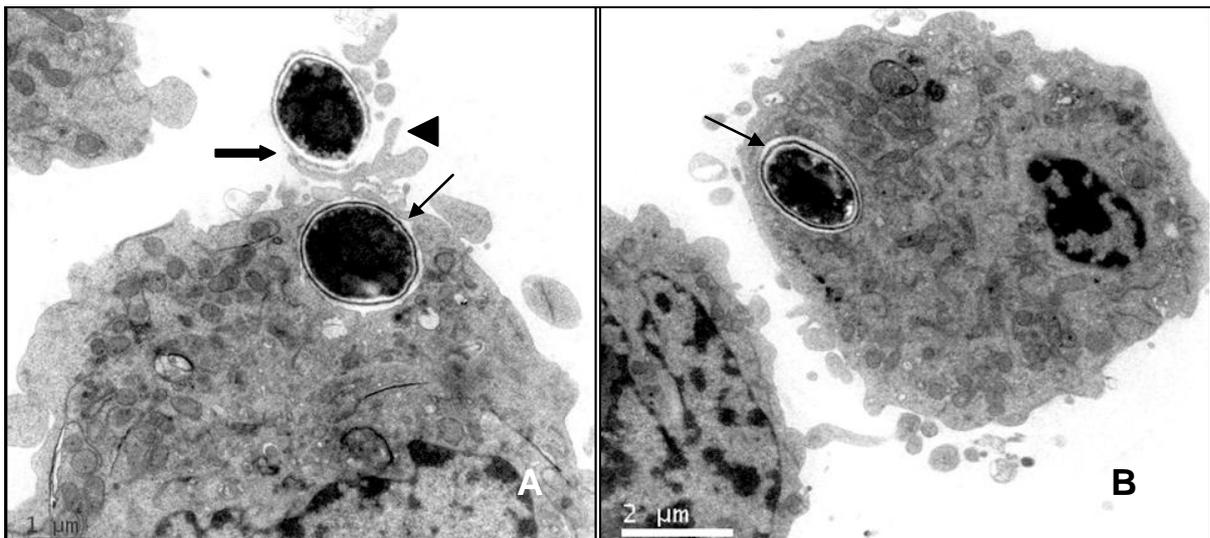


Figura 15 – Macrófago da linhagem J774 infectado com conídio de *P. lilacinus*, isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação de 30 minutos. A: Esta figura demonstra a adesão do conídio à célula (seta larga) e um conídio já internalizado (seta). Notar os pseudópodos sendo emitidos do fagócito (ponta de seta) (Aumento: x 15.000). B: Esta figura demonstra um conídio internalizado, com fagossomo firmemente associado ao conídio (seta) (Aumento: X 10.000).

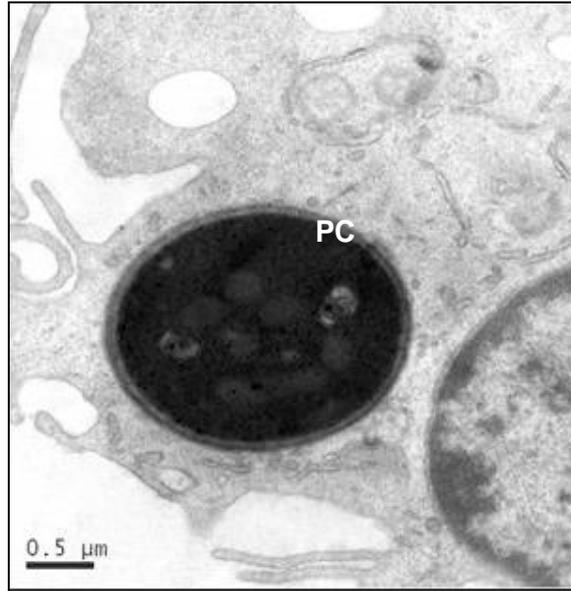


Figura 16 – Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de *P. lilacinus*, isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 1 hora. Observa-se conídio, com parede celular evidente (PC), internalizado (Aumento: x 30.000).

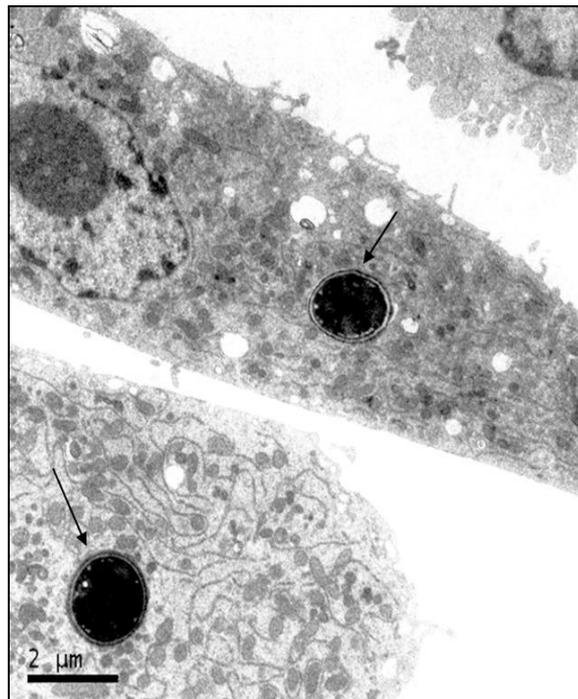


Figura 17 – Macrófagos da linhagem J774 infectados com conídio de *P. lilacinus*, isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação de 2 horas. Esta figura demonstra duas células com 1 conídio internalizado cada (setas)(Aumento: x 10.000).

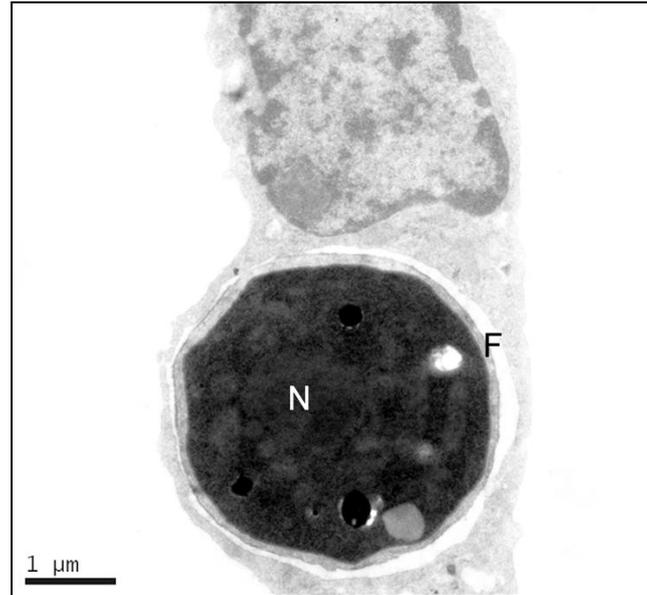


Figura 18 – Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de *P lilacinus*, isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 5 horas. Observa-se conídio apresentando um aumento de volume, com núcleo aparente (N), internalizado e firmemente aderido ao fagossomo (F) (Aumento: x 20.000).

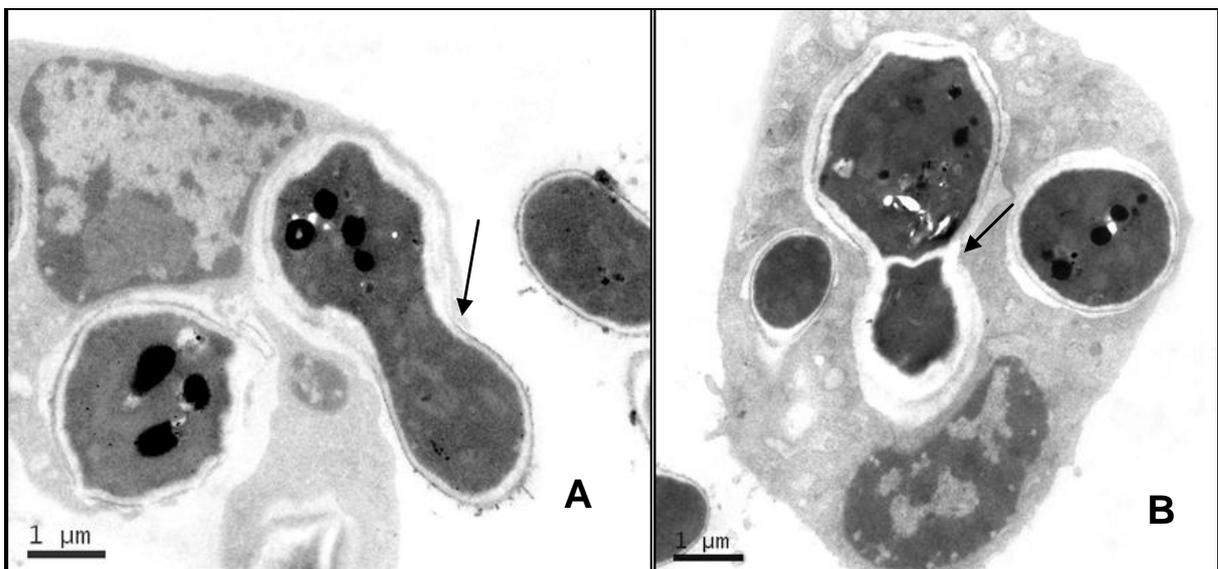


Figura 19 - Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de *P lilacinus*, isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 5 horas. A: Observa-se formação de tubo germinativo, rompendo a membrana plasmática (seta)(Aumento: x 15.000). B: Formação de tubo germinativo com septo (seta) (Aumento: X 15.000).

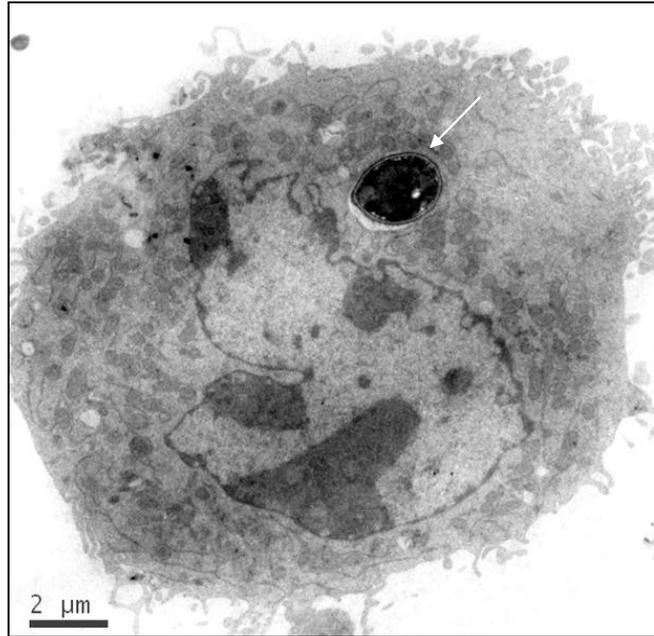


Figura 20 – Macrófago da linhagem J774 infectado com conídio de *P. lilacinus*, isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação de 5 horas. Apenas observa-se o conídio internalizado (seta) (Aumento: x 8.000).

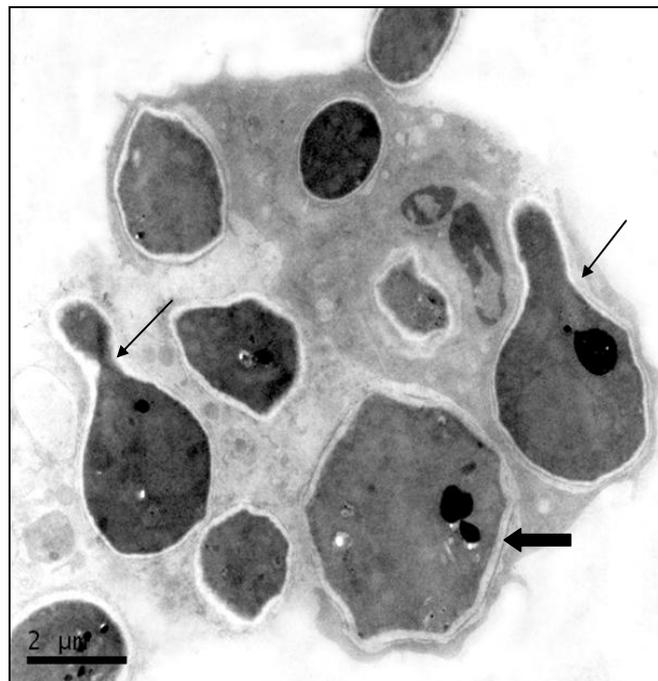


Figura 21 – Macrófago peritoneal murino (C57BL/6) infectado com conídio de *P. lilacinus*, isolado proveniente de seio nasal. Tempo de incubação de 14 horas. Observa-se uma intensa atividade dos conídios internalizados, demonstrada pelo aumento do volume conidial (seta grossa) e a formação de tubos germinativos (setas finas)(Aumento: x 10.000).

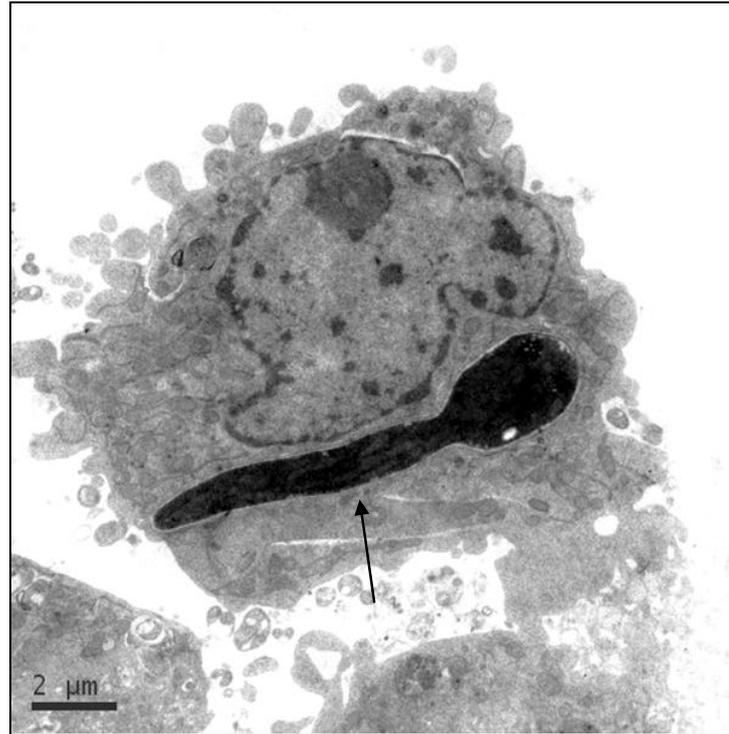


Figura 22 - Macrófago da linhagem J774 infectado com conídio de *P. lilacinus*, isolado proveniente de biópsia de pele. Tempo de incubação de 14 horas. Tubos germinativos são agora observados (seta) (Aumento: x 8.000).

5 – DISCUSSÃO:

Um grande número de microrganismos patogênicos pode invadir células eucarióticas e utilizar este microambiente para se multiplicar ou mesmo escapar da resposta imune do hospedeiro. Os fagócitos profissionais assim como células normalmente não fagocíticas podem ser invadidos (FINLAY & FALKOW, 1997). O estabelecimento da infecção por um microrganismo e consequente colonização de órgãos é um processo complexo que envolve etapas que vão desde a adesão às células do hospedeiro até a penetração da matriz extracelular. Sabe-se que várias espécies fúngicas são capazes de invadir células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*, porém são poucos os trabalhos que descrevem o processo de interação/invasão (MONTEIRO DA SILVA; ANDREOTTI & MENDES-GIANNINI, 2005).

Por meio da análise da interação de macrófagos peritoneais murinos com conídios de *P. lilacinus* ao microscópio óptico verificou-se que os conídios aderiram aos macrófagos dando início ao processo fagocítico, já nos primeiros 30 minutos de interação, embora a microscopia óptica (MO) seja, às vezes, insuficiente para distinguir adesão de internalização. Semelhante resultado foi obtido *in vitro*, sobre a associação de conídios de *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium ochrochloron* com células fagocíticas, onde Robertson et al (1987) encontraram dificuldades em distinguir adesão e ingestão de células fúngicas, após 1 hora de incubação, usando a MO como ferramenta. Uma vez internalizados, os conídios de *P. lilacinus* começaram a produzir tubos germinativos na tentativa de produzir o micélio para em seguida destruir o macrófago invadido – a habilidade de esporular em tecidos infectados é uma característica de *P. lilacinus*, conforme descrito por Liu et al, 1998.

P. lilacinus é descrito como um fungo de baixa virulência, geralmente necessitando de um grande inóculo e um hospedeiro imunodeprimido para o estabelecimento de uma infecção em um modelo experimental em mamíferos (PASTOR & GUARRO, 2006). A proporção de conídios para macrófagos (2:1), usada neste trabalho, foi escolhida porque acreditávamos, empiricamente, que os macrófagos murinos seriam capazes de impedir a germinação e

facilmente matariam o fungo após a realização do processo fagocítico. Esta hipótese também foi baseada em resultados anteriores obtidos por Schaffner et al (1982), que usando culturas celulares, similares as estudadas aqui, adicionaram conídios de *A. fumigatus* na proporção de 2 macrófagos para 1 conídio, portanto o inverso da nossa abordagem. Os resultados destes autores demonstraram que as células fagocíticas impediram a germinação e mataram todos os conídios em 48 horas de incubação. Assim, nos pareceu razoável, no presente estudo, aumentar a concentração de conídios em relação à de macrófagos. As observações subsequentes, da rápida germinação dos conídios de *P. lilacinus* e a completa destruição dos macrófagos, aqui verificadas, contrastam com o descrito por Schaffner et al (1982). *P. lilacinus* foi capaz de permanecer viável e ativo no interior dos fagócitos, evadindo os mecanismos de defesa inata dos macrófagos por mecanismos que ainda não estão totalmente esclarecidos.

Quando macrófagos são expostos a vários patógenos potenciais, começam a fagocitá-los, compartimentando-os em fagossomos, em um processo que envolve eventos de projeção e fusão de membranas, assim como o recrutamento de fatores, tais como, enzimas hidrolíticas e GTPases (IBRAHIM-GRANET et al, 2003). Infelizmente, entretanto, alguns microrganismos são capazes de se evadir desses mecanismos. Quando conídios de *Trichophyton rubrum* foram fagocitados, *in vitro*, por macrófagos peritoneais murinos, por exemplo, formaram hifas dentro dos macrófagos e romperam a membrana celular dos fagócitos infectados (CAMPOS et al, 2006). Fato este, demonstrado no presente estudo, onde conídios de *P. lilacinus* mostraram comportamento similar *in vitro*.

Por outro lado, células de levedura de *Paracoccidioides brasiliensis* são capazes de se multiplicar dentro de macrófagos peritoneais não ativados e foram inibidos, mortos e digeridos por macrófagos ativados com IFN- γ (BRUMMER et al, 1990). Não sabemos ainda, tema que necessita ser abordado, se os macrófagos murinos, utilizados neste estudo, seriam capazes de eliminar os conídios de *P. lilacinus* quando ativados.

Os macrófagos têm um papel muito importante na resistência contra patógenos intracelulares. Estudos *in vitro* têm demonstrado a proteção oferecida pelas várias substâncias produzidas pela célula hospedeira, tais como intermediários reativos de oxigênio, hidrolases, proteínas catiônicas e defensinas, contra as infecções fúngicas (ROMANI, 2006), mas são poucas e inconclusivas as pesquisas sobre os mecanismos envolvendo o desenvolvimento e a maturação dos fagossomos contendo patógenos fúngicos.

Em relação ao gênero *Paecilomyces*, um estudo conduzido por Mazet et al (1994), analisou, detalhadamente, os mecanismos da fagocitose de *Paecilomyces farinosus* por

neutrófilos de equino e hemócitos de inseto na proporção de 1:1. Naquele estudo foi demonstrada internalização das células fúngicas após 1 hora de interação fungo-neutrófilo, culminando em um limitado micélio sobre uma monocamada de neutrófilos após 16 horas. Os autores concluíram que o reconhecimento e a internalização das células fúngicas requereram o envolvimento de opsoninas de soro equino. Em *P. lilacinus*, não foi necessária a opsonização para que a fagocitose por macrófagos ocorra rapidamente (30 min) na proporção conídio:macrófago 2:1.

Muitos estudos têm focado o gênero *Aspergillus* quanto à interação com fagócitos. Segundo Robertson et al (1987), provavelmente existe uma resistência da espécie *Aspergillus fumigatus*, devido à produção de uma ou mais substâncias com efeito inibitório à fagocitose, pois os autores verificaram, *in vitro*, por microscopias óptica e eletrônica de transmissão, que os conídios (relação conídio: fagócito – 1:1 e 2:1) permaneceram aderidos por 1,5 hora em monócitos e leucócitos polimorfonucleares humanos e macrófagos peritoneais murinos (C57BL/6). Os mesmos autores também relataram resultados similares encontrados em experimentos, *in vivo*, com camundongos C57BL/6 inoculados com 10^8 conídios por via intraperitoneal.

Em outro estudo, Robertson et al (1989) avaliaram a interação do *A. fumigatus* e *Penicillium ochrochloron* com macrófagos alveolares humanos na proporção de 1:1. Foi observado que em 1 hora de incubação a 37°C, mais de 60% dos conídios fúngicos estavam associados com os macrófagos humanos, não especificando se os mesmos estavam aderidos ou internalizados. Quando da opsonização prévia dos conídios com soro humano em diferentes concentrações, os mesmos autores verificaram que em concentrações mais baixas do soro a mortalidade dos conídios aumentou, porém os resultados variaram em relação às espécies estudadas. Quando esse soro foi incubado a 56°C por 30 minutos, a habilidade dos macrófagos pulmonares em matar os conídios de *A. fumigatus* aumentou em aproximadamente 80%, ao passo que não houve diferença significativa quando o mesmo fenômeno foi estudado em *P. ochrochloron*. Os autores sugeriram que *A. fumigatus* utiliza a fração C3b do complemento para se ligar ao macrófago e paralisar a função do mesmo, o que não ocorre com a ausência do complemento desencadeada pelo aquecimento. No trabalho desenvolvido aqui, em *P. lilacinus* tal resistência à fagocitose não foi observada e ainda não foram estudados quais mecanismos este fungo se utiliza para sua sobrevivência dentro do fagócito.

Segundo Schaffner et al, nos anos de 1982 e 1983, a resistência do gênero *Aspergillus* aos fagócitos, provavelmente, depende do tipo celular e sítio anatômico onde o fungo se

encontra. Em 1982, estes pesquisadores observaram um comportamento defensivo diferencial no que tange aos tipos de fagócitos. Neste experimento, eles delinearão duas linhas de defesa: a primeira, formada por macrófagos peritoneais murinos que previnem a germinação e matam esporos *in vitro* e *in vivo* de *A. flavus*, mesmo em camundongos neutropênicos e atímicos, e a segunda, por neutrófilos, que matam o micélio do mesmo fungo *in vitro*. Já em 1983, o mesmo grupo demonstrou uma maior eficiência dos macrófagos alveolares em diminuir a taxa de germinação de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, quando comparados aos macrófagos peritoneais de camundongos CF1. Após 12 horas de fagocitose por macrófagos peritoneais, a taxa de germinação dos conídios de todas as espécies fúngicas testadas foi de, aproximadamente, 30%. Sob as mesmas condições, diferindo-se apenas a localização dos macrófagos (pulmonares), esta taxa não alcançou 10%. Naquele trabalho também foram testados macrófagos de ambos os sítios anatômicos de coelhos da raça Nova Zelândia, com um declínio também significativo na taxa de germinação dos conídios no interior dos macrófagos alveolares quando comparados aos peritoneais.

Entretanto, Phillippe et al (2003) não observaram qualquer resistência, *in vitro*, de conídios de *A. fumigatus* à fagocitose. Ao contrário, houve internalização de 30% dos conídios por macrófagos alveolares de camundongos em apenas 15 minutos de incubação (proporção macrófago:conídio 1:1). Em 2 horas, 85% dos conídios já tinham sido fagocitados, e em 4 horas, esse índice subiu para 90%. Três horas após a fagocitose, os autores observaram um aumento do volume conidial. Em 6 horas, todos os conídios apresentavam-se com diâmetro significativamente maior. Não houve germinação dos conídios, e 6,6% dos conídios fagocitados morreram. Esses resultados foram obtidos quando uma proporção macrófago:conídio de 1:1 foi utilizada. Quando esta razão foi aumentada para 10:1, a taxa de mortalidade chegou a 22%. Os autores, concomitantemente, realizaram um estudo *in vivo* com camundongos de mesma linhagem genética que os macrófagos utilizados e observaram que, em 15 minutos, os conídios já tinham sido fagocitados; uma taxa de 90% de mortalidade para um inóculo de 10^5 conídios, administrados intranasalmente, foi registrada. Semelhantes resultados *in vitro*, em relação a não resistência à fagocitose de conídios frente a macrófagos alveolares humanos (proporção conídio: macrófago 2:1) foram registrados por Ibrahim-Granet et al, em 2003.

Candida albicans também já foi objeto de estudo com relação à interação de leveduras com macrófagos peritoneais murinos (C57BL/6) (KÁPOSZTA et al, 1999). Os autores demonstraram que durante interação celular, numa proporção que variou de 10 a 20 conídios para cada macrófago, $66,4 \pm 5,6\%$ de leveduras associadas aos macrófagos já tinham sido

internalizadas em 10 minutos de incubação. Em 60 minutos, esta taxa aumentou para $98,1 \pm 1,6\%$, porém a mortalidade do fungo não chegou a 5% em 2 horas de infecção. Foi demonstrado que em 1 hora de incubação houve a formação de tubos germinativos. Os autores argumentaram que esta estrutura é mais frequentemente observada em condições ácidas, e comprovaram que os tubos germinativos se tornavam mais alongados em pH variando de 5,0 a 6,5. Os autores sugerem ainda que o recrutamento de endossomos tardios/lisossomos e consequente fusão com fagossomos seja provocado pelo patógeno em questão, para a futura formação do tubo germinativo dentro do fagolisossomo. Ainda naquele experimento, os autores afirmaram que a formação do tubo germinativo é necessária para o escape do microrganismo. Este, então, penetra em outra célula intacta, por meio do tubo germinativo, mesmo na presença de vários inibidores da fagocitose, como a citocalasina, que inibe a polimerização da actina.

Além da importância dos macrófagos peritoneais e alveolares no processo de eliminação de conídios fúngicos, Bozza et al, em 2002, salientaram a importância das células dendríticas pulmonares no que tange a degradação de hifas de *A.fumigatus*. Porém, quanto aos conídios desta mesma espécie, esse tipo celular não conseguiu causar dano em até 3 horas de interação. No presente trabalho, não nos pareceu que conídios de *P. lilacinus* apresentaram qualquer resistência à fagocitose por macrófagos peritoneais murinos, assim como para as células da linhagem murina J774. Também observamos aumento do volume conidial após a fagocitose, e atividade metabólica resultando na formação de tubo germinativo e hifas, assim como descrito para outros fungos (PHILLIPE et al, 2003; CAMPOS et al, 2006). Entretanto, com relação aos vários fatores envolvidos na relação fungo-hospedeiro e os resultados divergentes entre as espécies fúngicas oportunistas estudadas até o momento por diferentes autores, pesquisas adicionais envolvendo *P. lilacinus* deverão ser realizadas.

Em relação à porcentagem de macrófagos peritoneais murinos infectados com conídios de *P. lilacinus*, verificamos, neste trabalho, que em 30 minutos de interação conídio-macrófago, 36% e 35% dos macrófagos murinos e células J774, respectivamente, já tinham sido infectados pelos conídios. Semelhantes resultados foram descritos por Kurup (1984), onde 20 a 30% de macrófagos alveolares de coelhos apresentavam conídios de *A. fumigatus* não opsonizados em seu interior em apenas 1 hora de interação. Em 2 horas esse índice aumentou para 30 a 40%, enquanto que em 4 horas, a taxa de fagocitose foi de aproximadamente 40%. Neste último tempo, os conídios que sobreviveram dentro dos macrófagos começaram a germinar e antes disto houve o aumento no volume conidial. A

germinação deu origem a hifas que romperam a membrana do macrófago causando sua completa destruição.

Quanto ao Índice Endocítico (IE), observamos que há um aumento progressivo em ambos os tipos celulares. Porém, após o tempo de 4 horas, os IE da célula da linhagem J774 dobraram quando comparados àqueles referentes aos macrófagos peritoneais murinos. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Snyderman et al (1977), os quais afirmaram que no tempo de 3 horas, as células da linhagem J774 possuem atividade fagocítica de 2 a 4 vezes maior que macrófagos peritoneais murinos de camundongos C3HeB/FeJ.

Neste trabalho, verificamos que todos os três isolados de *P. lilacinus* estudados apresentaram um padrão similar de aderência, internalização e destruição da célula hospedeira, quando visualizados por MO. A linhagem celular macrofágica J774 foi menos susceptível, para todos os isolados, do que as culturas primárias de macrófagos murinos C57BL/6. A J774 é uma célula de linhagem murina de reticulossarcoma, imortalizada, contínua que possui muitas características de macrófagos de camundongo (SNYDERMAN et al, 1977).

Comparada a macrófagos peritoneais de camundongos, as células J774 apresentam maior expressão de receptores e glicocálix em sua superfície (BABER et al, 2009). O glicocálix é composto de muitas estruturas tipo hidrato de carbono, incluindo glicoproteína, glicolípídeos e proteoglicanas, cujos terminais de glicosaminoglicanos podem conter sulfato de queratina (VARSANO et al, 1987), sulfato de condroitina (BHASKAR et al, 1986), e heparan-sulfato (YANAGISHITA & HASCALL, 1992). Entretanto, na maioria das circunstâncias, a superfície apical de uma linhagem celular, tal qual a linhagem J774, é protegida por um glicocálix denso e grosso, composto na maior parte por mucinas. Algumas proteínas pesadamente glicosiladas da superfície das linhagens celulares, tais como a mucina MUC-1, projetam-se distante e acima da membrana plasmática (BRAMWELL, WISEMAN & SHOTTON, 1986) e podem eficazmente proteger receptores na superfície da célula durante a interação com microrganismos. A carga pesadamente negativa fornecida pelo ácido siálico e as glicoproteínas sulfatadas presentes no glicocálix podem igualmente impedir um eventual acesso de patógenos. Alternativamente, um patógeno pode fixar-se não especificamente ao glicocálix e assim não alcançar os receptores que permitem sua internalização (captura). Outros pesquisadores perceberam que o rompimento do glicocálix aumenta a susceptibilidade de determinadas células à entrada de vírus (ARCASOY et al, 1997; BALS et al, 1999). Ao se tratar de uma cinética em paralelo e comparativa, tal qual o trabalho descrito aqui, quaisquer eventos que sofram atraso desde o seu início, como um glicocálix mais denso em células de

linhagem J774, ocasionalmente poderá ter em seu desdobramento etapas retardadas em relação a outra célula estudada, no caso macrófagos peritoneais murinos, o que poderia certamente explicar a menor susceptibilidade da linhagem celular em questão.

É interessante verificar que, quando conídios de *Penicillium marneffe* foram expostos a células J774 na proporção de 2 conídios para cada macrófago, a internalização dos mesmos se fez após 2 horas de interação, podendo este fenômeno ter hipoteticamente ocorrido antes, pois não houve observação em tempos anteriores. Após 24 horas, os conídios transformaram-se em células leveduriformes que se reproduziram por fissão celular, subsequentemente, causando danos críticos aos fagócitos (COGLIATI et al, 1997).

A análise da interação macrófago-conídio, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), neste estudo, demonstrou que em 30 minutos de incubação, em ambos os tipos celulares, já havia conídios internalizados, resultado difícil de comprovar quando da análise por microscopia óptica (MO). Os demais tempos analisados de uma maneira geral, comprovaram o que foi descrito na avaliação por MO. Foi verificado que no tempo de incubação de 5 horas, na avaliação por MET, conídios dilatados, com tubos germinativos com a presença ou não de septo foram vistos no interior de macrófagos peritoneais murinos. Na avaliação pela MO o aumento do volume conidial foi observado apenas no tempo de 14 horas além de conídios com formação de tubo germinativo. É possível que este processo tenha ocorrido logo após as 6 horas de incubação. O que parece ser uma ligeira discordância, nos resultados das análises por MO e MET, em relação ao comportamento do conídio no interior do macrófago, é por nós desprezível, pois devemos levar em consideração que o ambiente no qual os macrófagos foram expostos ao fungo pode exercer influência no processo de infecção. Os macrófagos que interagiram com os conídios para a avaliação pela MO foram incubados em microcâmaras, enquanto que para a avaliação pela MET os mesmos foram incubados em garrafas. Apesar da tentativa de eliminar todas as variáveis inerentes aos experimentos, principalmente, experimentos independentes, acreditamos que estes fatores (tempo e ambiente de incubação diferentes) possam influenciar ligeiramente os resultados. Também, através da MET, comprovamos a menor susceptibilidade das células J774 aos conídios do fungo, quando comparadas aos macrófagos peritoneais murinos.

A MET demonstrou que durante o processo de interação dos conídios com os macrófagos, estudados aqui, houve a formação de pseudópodos, semelhantes ao observado para macrófagos alveolares humanos durante o processo de fagocitose de conídios de *A. fumigatus* (IBRAHIM-GRANET et al, 2003). Este tipo de fagocitose, denominada “trigger” envolve a polimerização de actina, e já foi observado na interação de macrófagos peritoneais

de camundongos C57BL/6 e células epiteliais com *Candida albicans* (KAPOSZTA et al, 1999; TSARFATY et al, 2000). Também foi observada, no presente estudo, a presença de um fagossomo envolvendo os conídios, e aparentemente, bem aderido aos mesmos, durante o processo de internalização do fungo. Estes dados são corroborados por resultados de outros autores na interação de macrófagos alveolares humanos e *A.fumigatus*, assim como de células da linhagem J774 com *Penicillium marneffei* (COGLIATI et al, 1997; IBRAHIM-GRANET et al, 2003). Este processo foi visto tanto para macrófagos peritoneais murinos, quanto para as células da linhagem J774.

Os resultados obtidos neste trabalho chamam a atenção de que estudos adicionais sobre a interação de conídios de *P. lilacinus* e células fagocíticas devem ser intensificados, na esperança de que os dados gerados ajudem a elucidar os complexos e críticos mecanismos envolvidos na patogênese deste microrganismo oportunista.

6 – CONCLUSÃO:

Os resultados da análise, *in vitro*, da interação de macrófagos peritoneais murinos e células da linhagem J774 por conídios de *P. lilacinus* permitem concluir:

a) A metodologia de obtenção de conídios de *P. lilacinus* é factível, com resultados satisfatórios em termos de quantidade e pureza da suspensão conidial. A técnica da interação entre macrófagos peritoneais murinos com *P. lilacinus* foi padronizada com sucesso, servindo a estudos posteriores.

b) Os diferentes isolados de *P. lilacinus* testados apresentam comportamento semelhante quando observados pela MO e MET, tanto em macrófagos peritoneais murinos, quanto em células J774.

c) Os conídios são capazes de permanecerem ativos no interior de células fagocíticas, produzindo tubos germinativos e romper a membrana dos fagócitos com a formação de hifas verdadeiras.

d) As células da linhagem J774 são menos susceptíveis ao fungo, uma vez que os conídios necessitaram de mais tempo para produzir o micélio.

e) Quanto ao Índice Endocítico (IE), há um aumento progressivo em ambos os tipos celulares, porém as células da linhagem J774 apresentam IE maior a partir de 4 horas de interação.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGRAWAL, P.K.; LAL,B.; WAHAB,S.; SRIVASTAVA, O.P.; MISRA,S.C. Orbital Paecilomycosis due to *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. **Sabouraudia**. V. 17, p. 363-370, dez. 1979.

AKPOGHENETA, O.; GIL-LAMAIGNERE, C.; MALOUKOU, A.; ROILIDES, E.; EUROFUNG network. Antifungal activity of human polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against non-fumigatus *Aspergillus* species. **Mycoses**. V. 46, n. 3-4, p. 77-83, abr. 2003.

ALI-SHTAYEH, M.S.; ARDA, H.M.; HASSOUNA,M.; SHAHEEN, S.F. Keratinophilic fungi on sheep hairs from the West Bank of Jordan. **Mycopathologia**. V. 106, p. 95-101, 1989.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC Immunology**. V. 8, n.16, 2007.

ARCASOY, S. M., LATOCHE, J.; GONDOR, M.; WATKINS, S. C.; . HENDERSON, R. A; HUGHEY,R.; FINN, O. J.; PILEWSKI, J. M. MUC1 and other sialoglycoconjugates inhibit adenovirus-mediated gene transfer to epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. V. 17, n. 4, p. 422-435, 1997.

ANTACHOPOULOS, C.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **British Journal of Haematology**. V. 129, n.5, p. 583-96, jun. 2005.

BABER, K.; MOSTHAF, K.; ERBERTSEDER, K.; FLEMISCH, B.; HELMIG, R. **Modeling the Transfer of Therapeutic Agents from the Vascular Space to the Tissue Compartment (a Continuum Approach)**. 2009. Disponível em: http://www.nupus.uni-stuttgart.de/media/publications/NUPUS_2009-06_online.pdf. Acessado em: 2010

BALS, R., XIAO, W.; SANG, N.; WEINER, D. J.; MEEGALLA, R. L.; WILSON, J. M. Transduction of well-differentiated airway epithelium by recombinant adeno-associated virus is limited by vector entry. **Journal of Virology**. V. 73, n. 7, p. 6085-6088, 1999.

BHASKAR, K.; O'SULLIVAN, D.; OPASKAR-HINCMAN, H.; REID, L.; COLES, S. Density gradient analysis of secretions produced in vitro by human and canine airway mucosa: identification of lipids and proteoglycans in such secretions. **Experimental Lung Research**. V. 10, n. 4, p. 401-422, 1986.

BRAMWELL, M. E.; WISEMAN, G.; SHOTTON, D. M. Electron-microscopic studies of the CA antigen, epitectin. **Journal of Cell Science**. V. 86, p. 249-261, 1986.

BOOTH, M.J.; VAND DER LUGT, J.J.; VAN HEERDEN, A.; PICARD, J.A. Temporary remission of disseminated paecilomycosis in a German shepherd dog treated with ketoconazole. **Journal of South African Veterinary Association**. V. 72, n.2, p. 99-104, jun. 2001.

BOURGUIGNON, S.C.; CASTRO, H.C.; SANTOS, D.O.; ALVES, C.R.; FERREIRA, V.F. GAMAC, I.L.; SILVA, F.C.; SEGUINS, W.S.; PINHO, R.T. Trypanosoma cruzi: *in vitro* activity of Epoxy- α -Lap, a derivative of α -lapachone, on trypomastigote and amastigote forms. **Experimental Parasitology**. V. 122, p. 91-96, 2009.

BOZZA, S.; GAZIANO, R.; SPRECA, A.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; DI FRANCESCO, P.; ROMANI, L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. **Journal of Immunology**. V. 168, n.3, p. 1362-71, fev. 2002.

BRUMMER, E.; SUN, S.H.; HARRISON, J.L.; PERLMAN, A.M.; PHILPOTT, D.E.; STEVENS, D. A. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. **Infection and Immunity**. V. 58, p. 2628-36, 1990.

CABAÑES, F.J.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G. Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. **Mycopathologia**. V. 133, p. 1-7, 1996.

CAMPOS, M.R.M.; RUSSO, M.; GOMES, E.; ALMEIDA, S.R. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. **Microbes and Infection**. V. 8, p. 372-79, 2006.

CAREY, J.; D'AMICO, R.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G. *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. **Emerging Infectious Diseases**. V. 9, p. 1155-1158, 2003

CASTRO, L.G.M.; SALEBIAN, A.; SOTTO, M.N.. Hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in renal transplant patient and a review of human *Paecilomyces* species infections. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. V. 28, n.1, p. 15-26, 1990.

CHANG, B.P.; SUN, P.L.; HUANG, F.Y.; TSAI, T.C.; LIN, C.C.; LEE, M.D.; CHEN, Y.C.; SHEU, J.C.; TSAI, J.D. *Paecilomyces lilacinus* peritonitis complicating peritoneal dialysis cured by oral voriconazole and terbinafine combination therapy. **Journal of Medical Microbiology**. V. 57(Pt 12), p. 1581-4, dez, 2008.

CHAN-TACK, K.M.; THIO, C.L.; MILLER, N.S.; KARP, C.L.; HO, C.; MERZ, W.G. *Paecilomyces lilacinus* fungemia in an adult bone marrow transplant recipient. **Medical Mycology**. V. 37, p. 57-60, 1999.

CHUNG, P.C.; LIN, H.C.; HWANG, Y.S.; TSAI, Y.J.; NGAN, K.W.; HUANG, S.C.; HSIAO, C.H. *Paecilomyces lilacinus* scleritis with secondary keratitis. **Cornea**. V. 26, n.2, p. 232-4, fev. 2007.

COGLIATI, M.; ROVERSELLI, A.; BOELAERT, J. R.; TARAMELLI, D.; LOMBARDI, L.; VIVIANI, M. A. Development of an *In Vitro* Macrophage System To Assess *Penicillium marneffei* Growth and Susceptibility to Nitric Oxide. **Infection And Immunity**. V. 65, n.1, p.279-84, jan. 1997.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and Molecular Biology reviews**. V. 61, n. 2, p. 136-139, jun. 1997.

FOLEY, J.E., NORRIS, C.R.; JANG, S.S. Paecilomycosis in dogs and horses and a review of literature. **Journal of Veterinarian Internal Medicine**. V. 16, n. 3, p. 238-43, mai-jun. 2002.

FORD, J.G.; AGEE, S.; GREENHAW, S.T. Successful medical treatment of a case of *Paecilomyces lilacinus* keratitis. **Cornea**. V. 27, n.9, p.1077-9, out. 2008.

FRANCE, M.P.; MUIR, D. An Outbreak of Pulmonary Mycosis in Respiratory Burst-deficient (gp91^{phox}^{-/-}) Mice with Concurrent Acidophilic Macrophage Pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**. V. 123, n.2-3, p. 190-4, ago-out. 2000.

GARBINO J, ONDRUSOVA A, BALIGVO E, LEW D, BOUCHUIGUIR-WAFA K, ROHNER P. Successful Treatment of *Paecilomyces lilacinus* Endophthalmitis with Voriconazole **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. V. 34, n. 9, p. 701-703, 2002.

GARCIA, M.E.; CABALLERO, J.; TONI, P.; GARCIA, I.; MERLO, E.M.; ROLLAN, E.; GONZALEZ, M.; BLANCO, J.L. Disseminated mycoses in a dog by *Paecilomyces* sp. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**. V. 47, n. 4, p. 243-9, mai. 2000.

GESELL, M.; HAMMER, E.; MIKOLASCH, A.; SCHAUER, F. Oxidation and ring cleavage of dibenzofuran by the filamentous fungus *Paecilomyces lilacinus*. **Archives of Microbiology**. V. 182, n. 1, p. 51-9, set. 2004.

GORDON, M.A. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, from systemic infection in an armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. V. 22, p. 109-116, 1984.

GOTTLIEB, T.; ATKINS, B.L. Case report. Successful treatment of cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infection with oral itraconazole in an immune competent host. **Mycoses**. V. 44, n. 11-12, p. 513-515, dez. 2001.

GUNASEKERA, T.S.; HOLLAND, R.J.; GILLINGS, M.R.; BRISCOE, D.A.; NEETHLING, D.C.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, K.M.H. Phenotypic and genetic characterization of *Paecilomyces lilacinus* strains with biocontrol activity against root-knot nematodes. **Canadian Journal of Microbiology**. V. 46, n. 9, p. 775-83, set. 2000.

GUTIÉRREZ-RODERO, F.; MORAGON, M.; ORTIZ DE LA TABLA, V.; MAYOL, M.J.; MARTÍN, C. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host successfully treated with itraconazole: case report and review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**. V. 18, n. 11, p. 814-818, nov. 1999.

HALDANE, E.V.; MACDONALD, J.L.; GITTENS, W.O.; YUCE, K.; VAN ROOYEN, C.E.; Prosthetic valvular endocarditis due to the fungus *Paecilomyces*. **Canadian Medical Association Journal**. V. 111, n.9, p. 963-68, nov. 1974.

HALL, V.C.; GOYAL, S.; DAVIS, M.D.P.; WALSH, J.S. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*: report of three cases and review of literature. **International Journal of Dermatology**. V. 43, n. 9, p. 648-653, set. 2004.

HEARD, D.J.; CANTOR, G.H.; JACOBSON, E.R.; PURICH, B.; AJELLO, L.; PADHYE, A.A. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in na Aldabra tortoise. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 189, n. 9, p. 1143-1145, nov. 1986.

HENNEKE, P.; GOLENBOCK, D.T. Phagocytosis, innate immunity, and host-pathogen specificity. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 199, n.1, p. 1-4, jan. 2004.

HOFLING-LIMA, A.L.; FORSETO, A.; DUPRAT, J.P.; ANDRADE, A.; SOUZA, L.B.; GODOY, P.; FREITAS, D. Laboratory study of the mycotic infectious eye diseases and factors associated with keratitis. **Arquivos. Brasileiros de Oftalmologia**. V. 68, n. 1, p. 21-27, jan-fev. 2005.

HOLAHAN, M.L.; LOFT, K.E.; SWENSON, C.L.; MARTINEZ-RUZAFI, I. Generalized calcinosis cutis associated with disseminated paecilomycosis in a dog. **Veterinary Dermatology**. V. 19, n. 6, p. 368-72, dez. 2008.

HOLLAND, R.J.; GUNASEKERA, T.S.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, K.M.H. Ultrastructure and properties of *Paecilomyces lilacinus* spores. **Canadian Journal of Microbiology**. V.48, n.10, 879-85, 2002.

IBRAHIM-GRANET, O.; PHILIPPE, B.; BOLETI, H.; BOISVIEUX-ULRICH, E.; GRENET, D.; STERN, M.; LATGÉ, J.P. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. **Infection and Immunity**. V. 71, n. 2, p. 891-903, fev. 2003.

INGLIS, P. W.; TIGANO, M.S. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. **Genetics and Molecular Biology**. V.29, n. 1, p. 132-6, 2006.

ITIN, P.H.; FREI, R.; LAUTENSCHLAGER, S.; BUECHNER, S.A.; SURBER, C.; GRATWOHL, A.; WIDMER, A.F. Cutaneous manifestations of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. **Journal of the American Academy of Dermatology**. V. 39, n. 3, p. 401-9, set.1998.

JACOBSON, E.R.; GASKIN, J.M.; SHIELDS, R.P.; WHITE, F.H. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 175, n. 9, p. 929-33, nov. 1979.

JUNIOR, M. C. M. M. **Células Do Sistema Imune**. Disponível em: <http://ioh.medstudents.com.br>. Acessado em 2010.

KÁPOSZTA, R.; MARÓDI, L.; HOLLINSHEAD, M.; GORDON, S.; DA SILVA, R.P. Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*. **Journal of Cell Science**. V. 112, Pt 19, p. 3237-48, out. 1999.

KUDEKEN, N.; KAWAKAMI, K.; SAITO, A. Role of superoxide anion in the fungicidal activity of murine peritoneal exudate macrophages against *Penicillium marneffei*. **Microbiology and Immunology**. V. 43, n. 4, p. 323-30, 1999 (a).

KUDEKEN, N.; KAWAKAMI, K.; SAITO, A. Cytokine-induced fungicidal activity of human polymorphonuclear leukocytes against *Penicillium marneffei*. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. V. 26, n.2, p. 115-24, nov. 1999 (b)

KHAN, A.; WILLIAMS, K.; NEVALAINEN, H. Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. **FEMS Microbiology Letters**. V. 227, n. 1, p. 107-11, out. 2003.

KUNSTÝR, I.; JELÍNEK, F.; BITZENHOFER, U.; PITTERMANN, W. Fungus *Paecilomyces*: a new agent in laboratory animals. **Laboratory animals**. V. 31, p. 45-51, 1997.

KURUP, V.P. Interaction of *Aspergillus Fumigatus* spores and Pulmonary Alveolar Macrophages of Rabbits. **Immunobiology**. V. 166, p.53-61, 1984.

KURZAI, O.; VAETH, T.; HAMELMANN, W.; MÜLLER, F.M.C.; KLINKER, H.; LANGMANN, P.; FROSCH, M.; MÜHLSCHLEGEL, F. Combined surgical and antifungal treatment of a subcutaneous infection due to *Paecilomyces lilacinus*. **Medical Mycology**. V. 41, n. 3, p. 253-258, jun. 2003.

LACAZ C.S.; PORTO E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. In: -. **Guia de identificação de Fungos, Actinomicetos, Algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998, 445 p.

LE CABEC, V.; COLS, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. **Infection and Immunity**. V. 68, n.8, p. 4736-45, ago. 2000.

LEVITZ, S.M. Overview of host defenses in fungal infections. **Clinical Infections and Diseases**. V. 14 (Suppl 1S), p. 37-42, mar. 1992

LI, X.; ZHANG, C.; FANG, W.; LIN, F. White-spot disease of Chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*) caused by *Paecilomyces lilacinus*. **Journal of Zhejiang University Science B**. V.9, n. 7, p. 578-581, mai. 2008.

LITTMAN, M.P.; GOLDSCHMIDT, M.H. Systemic paecilomycosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 191, n. 4, p. 445-7, ago. 1987.

LIU, K.; HOWELL, D.N.; PERFECT, J.R.; SCHELL, W.A. Morphologic Criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* Species by histopathology. **American Journal of Clinical Pathology**. V. 109, n. 1, p. 45-54, jan. 1998.

LOVELL, R.D.; MOLL, M.; ALLEN, J.; CICCI, L.G. Disseminated *Paecilomyces lilacinus* infection a patient with AIDS. **AIDS Read**. V. 12, n. 5, p. 212-21, mai. 2002.

LUANGSA-ARD, J.J.; HYWEL-JONES, N.L.; SAMSON, R.A. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. **Mycologia**. V. 96, n. 4, p. 773-80, 2004.

MANSOUR, M.K.; LEVITZ, S.M. Interactions of fungi with phagocytes. **Current opinion in microbiology**. V. 5, n.4, p. 359-65, ago.2002.

MARTIN, C.A.; ROBERTS, S.; GREENBERG, R.N. Voriconazole treatment of disseminated *Paecilomyces* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Clinical Infectious Diseases**. V. 35, n. 7, p. e78-e81, 2002.

MASLEN, M.; WHITEHEAD, J.; FORSYTH, W.M.; MCCRACKEN, H.; HOCKING, A.D. Systemic mycotic disease of captive crocodile hatchling (*Crocodylus porosus*) caused by *Paecilomyces lilacinus*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. V.26, p. 219-225, abr. 1988.

MATSUMOTO, T.; AJELLO, L.; MATSUDA, T.; SZANISZLO, P.J.; WALSH, T.J. Developments in hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. V. 32 Suppl 1, p. 329-49, 1994.

MAYER, G. Capítulo 1. In: **Microbiology and Immunology On-line**, Hunt, R.C. editor. University of South Carolina School of Medicine, 2009. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/Portuguese/immuno-port-chapter1.htm>. Acessado em 2010.

MAZET, I.; PENDLAND, J.; BOUCIAS, D. Comparative analysis of phagocytosis of fungal cells by insect hemocytes versus horse neutrophils. **Developmental and Comparative Immunology**. V. 18, n. 6, p. 455-66, nov-dez, 1994.

MONTEIRO DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células endoteliais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V.26, n.2, p.149-156, 2005.

MOSIER, M.A.; LUSK, B.; PETTIT, T.H.; HOWARD, D.H.; RHODES, J. Fungal endophthalmitis following intraocular lens implantation. **American Journal of Ophthalmology**. V.83, n.1, p. 1-8, jan. 1977.

MULLANE, K.; TOOR, A.A.; KALNICKY, C.; RODRIGUEZ, T.; KLEIN, J.; STIFF, P. Posaconazole salvage therapy allows successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory invasive mold infections. **Transplant Infectious Disease**. V. 9, n. 2, p. 89-96, jun. 2007.

MURCIANO, A.; DOMER, J.; COHEN, I. *Paecilomyces lilacinus* infection in an immunocompromised patient. **Journal La State Med Society**. V. 142, n. 12, p. 35-7, dez. 1990.

NGUYEN, K. T.; TA P.; HOANG, B. T.; CHENG, S.; HAO, B.; NGUYEN, M. H.; CLANCY, C. J. Anidulafungin Is Fungicidal and Exerts a Variety of Postantifungal Effects against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. V. 53, n. 8, p.3347-52, ago. 2009.

ODA, Y.; OSAKA, H.; URAKAMI, T.; TONOMURA, K. Purification and properties of Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from the fungus *Paecilomyces lilacinus* D218. **Current Microbiology**. V. 34, n. 4, p. 230-2, abr. 1997.

ORTONEDA, M.; CAPILLA, J.; PASTOR, F.J.; PUJOL, IL; YUSTES, C.; SERENA C.; GUARRO, J. *In vitro* Interactions of Approved and Novel Drugs against *Paecilomyces* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 48, n. 7, p. 2727-9, jul, 2004.

PARK, J.O.; HARGREAVES, J.R.; McCONVILLE, E.J.; STIRLING, G.R.; GHISALBERTI, E.L.; SIVASITHAMPARAM, K. Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. **Letters in Applied Microbiology**. V. 38, n. 4, p. 271-6, 2004.

PASTOR, F.J.; GUARRO, J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. **Clinical Microbiology and Infection**. V. 12, n. 10, p. 948-60, 2006.

PATNAIK, A.K.; LIU, S.; WILKINS, R.J.; JOHNSON, G.F.; SEITZ, P. E. Paecilomycosis in a Dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V.161, n. 7, p. 806-13, 1972.

PERFECT, J.R.; SCHELL, W.A. The new fungal opportunists are coming. **Clinical Infectious Diseases**. 22(Suppl 2): S112-8., mai. 1996.

PHILIPPE, B.; IBRAHIM-GRANET, O.; PRÉVOST, M.C.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; SANCHEZ PEREZ, M.; VAN DER MEEREN, A.; LATGÉ, J.P. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infection and Immunity**. V. 71, n. 6, p. 3034-42, jun. 2003.

RALPH, P.; PRICHARD, J.; COHN, M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. **The Journal of Immunology**. V. 114, n. 2, pt. 2, p. 898-905, fev. 1975

RIDDEL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**. V. 42, p. 265-70, 1950.

ROBERTSON, M.D.; SEATON, A.; MILNE, L.J.R.; RAEBURN, J.A. Resistance of spores of *Aspergillus fumigatus* to ingestion by phagocytic cells. **Thorax**. V. 42, n. 6, p. 466-472, jun. 1987.

ROBERTSON, M.D.; KERR, K.M.; SEATON, A. Killing of *Aspergillus fumigatus* spores by human lung macrophages: a paradoxical effect of heat-labile serum components. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. V. 27, p. 295-302, 1989.

ROMANI, L. Innate and acquired cellular immunity to fungi. In: HEITMAN, J.; FILLER, S.G.; EDWARDS Jr, J.E.; MITCHELL, A.P. **Molecular principles of fungal pathogenesis**. Washington: ASM Press, 2006, p. 471-86.

ROSSER, E.J Jr. Cutaneous Paecilomycosis in a cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**. V. 39, n. 6, p. 543-6, nov-dez, 2003.

SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. **Study of Mycology**. V.6, p. 59-62, 1974.

SCHAFFNER, A.; DOUGLAS, H.; BRAUDE, A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. **The Journal of Clinical Investigation**. V. 69, n. 3, p. 617-631, mar. 1982.

SCHAFFNER, A.; DOUGLAS, H.; BRAUDE, A. I.; DAVIS, C.E.; Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. **Infection and Immunity**. V.42,n. 3, p. 1109-1115, dez, 1983.

SILVA, M.F.; BOCCA, A.L.; FERRACINI, R. JR.; FIGUEIREDO, F.; SILVA, C.L. Cellular requirements for immunomodulatory effects caused by cell wall components of *Paracoccidioides brasiliensis* on antibody production. **Clinical Experimental Immunology**. V. 109, n. 2, p. 261-71, ago. 1997.

SNYDERMAN, R.; PIKE, M.C.; FISCHER, D.G.; KOREN, H.S. Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. **The Journal of Immunology**. V. 119, n.6, p. 2060-6, dez. 1977.

SPONSEL, W.; CHEN, N.; DANG, D.; PARIS,G.; GRAYBILL, J.; NAJVAR, L.K.; ZHOU, L.; LAN, K.; GLICKMAN, R.; SCRIBBICK, F. Topical Voriconazole as a Novel Treatment for Fungal Keratitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V50, n.1, p. 262-68. Jan, 2006.

TAN T.Q.; OGDEN A.K.; TILLMAN J.; DEMMLER G.J.; RINALDI M.G.. *Paecilomyces lilacinus* catheter-related fungemia in an immunocompromised pediatric patient. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 30, n. 9, p. 2479-2483, set.1992.

TAKAYASU, S.; AKAGI, M.; SHIMIZU, Y. Cutaneous Mycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*. **Archives of dermatology**. V. 113, n. 12, p. 1687-1690, dez. 1977.

TSARFATY, I.; SANDOVSKY-LOSICA, H.; MITTELMAN, L.; BERDICEVSKY, I.; SEGAL, E. Cellular actin is affected by interaction with *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**. V. 189, n.2, p. 225-32, ago.2000.

TUCKER, S.C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 99, n.5, p. 3165-70, mar. 2002.

VAN SCHOONEVELD, T.; FREIFELD, A.; LESIAK, B.; KALIL, A.; SUTTON, D.A.; IWEN, P.C. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. **Transplant Infectious Disease**. V. 10, n. 2, p. 117-22, abr. 2008.

VARSANO, S.; BASBAUM C. B.; FORSBERG, L. S.; BORSON, D. B.; CAUGHEY, G.; NADEL, J. A. Dog tracheal epithelial cells in culture synthesize sulfated macromolecular glycoconjugates and release them from the cell surface upon exposure to extracellular proteinases. *Experimental Lung Research*. V. 13, n. 2, p. 157-84, 1987.

VARTIVARIAN, S.E.; ANASSIE, E.J.; BODEY, G.P. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis and management. **Clinical Infectious Diseases**. V. 17(Suppl 2), p. 487-91, nov. 1993.

WALSH, T.J.; GROLL, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. **Transplant Infectious Disease**. V. 1, n. 4, p. 247-261, dez. 1999.

WALSH T.J.; GROLL A.; HIEMENZ J.; FLEMING R.; ROILIDES E.; ANAISSIE E.. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology Infectious**. V. 10(Suppl. 1), p. 48-66, mar. 2004.

WELLINGTON, M.; DOLAN, K.; KRYSAN, D. J. Live *Candida albicans* Suppresses Production of Reactive Oxygen Species in Phagocytes. **Infection And Immunity**. V.77, n.1, p. 405-13, jan. 2009.

WESSOLOSSKY, M.; HARAN, J.P.; BAGCHI, K. *Paecilomyces lilacinus* olecranon bursitis in an immunocompromised host: case report and review. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. V. 61, n. 3, p. 354-57, jul, 2008.

WESTENFELD F.; ALSTON W.K.; WINN W.C. Complicated soft tissue infection with prepatellar bursitis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host: case report and review. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 34, n. 6, p. 1559-1562, jun. 1996.

YANAGISHITA, M.; HASCALL, V. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 267, 14, p. 9451-9454, 1992.

YUAN, X.; WILHELMUS, K.R.; MATOBA, A.Y.; ALEXANDRAKIS, G.; MILLER, D.; HUANG, A.J.W. Pathogenesis and Outcome of *Paecilomyces* Keratitis. **American Journal of Ophthalmology**. V. 147, n. 4, p. 691-6, fev. 2009.

ZHU, M.L.; MO, M.H.; XIA, Z.Y.; LI, Y.H.; YANG, S.J.; LI, T.F.; ZHANG, K.Q. Detection of two fungal biocontrol agents against root-knot nematodes by RAPD markers. **Mycopathologia**. V. 161, n. 5, p. 307-16, mai. 2006.

Trabalho referente a esta dissertação aceito para publicação

Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Vol. 000, No. 000, 1–7 (2010)

SHORT COMMUNICATION

In-vitro study of the host–parasite interactions between mouse macrophages and the opportunistic fungus *Paecilomyces lilacinus*

Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson 1974 is a cosmopolitan, filamentous, asexual and hyaline fungus. Although detected mainly as a saprophyte, in soil and decaying vegetables, it has also been found parasitising insects and nematodes — sparking interest in its potential use as a biocontrol agent (Garbino *et al.*, 2002) — and, increasingly, infecting humans (Motswaledi *et al.*, 2009).

In culture at 25°C, *Pae. lilacinus* grows fast, producing a colony, consisting of a basal felt with a floccose over-growth of aerial mycelium, that is initially white but becoming vinaceous as the fungus sporulates (Samson, 1974). The vegetative hyphae, which are smooth-walled, hyaline and with conidiophores, occasionally form loose, thick-walled yellow or purple synnemata (Samson, 1974). Each synnema consists of verticillate branches with whorls of two, three or four phialides. Each phialide has a swollen basal part that tapers into a thin distinct neck, which is about 1 µm wide. Conidia, which form divergent, sometimes tangled chains, are ellipsoidal to fusiform, smooth-walled to slightly roughened, hyaline and purple in mass, differing from those of the genus *Penicillium*; chlamydospores are absent (Samson, 1974).

Because a hyaline mycelium develops in

or oculomycosis, onychomycosis, vaginitis, osteomyelitis, generalized infection, fungaemia, and respiratory-tract infections have also been described (Pastor and Guarro, 2006). Localized infections of the skin and subcutaneous nodules tend to develop in immunocompetent individuals whereas disseminated lesions occur in the immunocompromised (Walsh *et al.*, 2004). The main routes of fungal entrance are the respiratory tract, the skin and surgical implants, such as prosthetic devices.

Although there are very few reports of human infection with *Pae. lilacinus* in Brazil, this may simply reflect a lack of general awareness of the problem posed by the fungus to human health (Itin *et al.*, 1998; Hofling-Lima *et al.*, 2005).

Currently, no effective treatment has been established for hialohyphomycosis caused by *Pae. lilacinus*, and the amphotericin B, flucytosine, fluconazole, miconazole or itraconazole that have been used, in some cases of skin, subcutaneous or ocular infection, have often given unsatisfactory results. Encouragingly, however, some of the so-called ‘new azoles’, such as posaconazole, ravuconazol and voriconazole, have recently demonstrated good activity against *Pae. lilacinus* *in vitro* (Pastor and Guarro, 2006;

Annals of Tropical Medicine & Parasitology - ATM1089.3d 25/8/10 13:18:18
The Charlesworth Group, Wakefield +44(0)1924 366598 - Rev 7.5.1mW (Jan 20 2009)

E. PEIXOTO; J. C. OLIVEIRA; P. R. Z. ANTAS; C. M. BORBA

Received 30 June 2010,

Revised 23 July 2010,

Accepted 27 July 2010

Reprint requests to: C. M. Borba.

E-mail: cborba@ioc.fiocruz.br

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](#)