UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Identificação e caracterização de proteínas imunogênicas de
exoantígenos do fungo *Fonsecaea pedrosoi***

Pollyanna Christina da Silva Martins

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Identificação e caracterização de proteínas imunogênicas de
exoantígenos do fungo *Fonsecaea pedrosoi***

Pollyanna Christina da Silva Martins

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2014

Pollyanna Christina da Silva Martins

Identificação e caracterização de proteínas imunogênicas de exoantígenos do
fungo *Fonsecaea pedrosoi*

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção
do grau de Mestre

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
Orientador

1ºExaminador

2ºExaminador

São Paulo, Novembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Maria Elza e Laércio que me deram a chance de vir ao mundo, ensinaram tudo que sei sobre amor e retidão, me cercaram de carinho, sempre apoiaram meus sonhos e principalmente acreditaram em mim até mesmo quando eu não acreditei.

Dedico também aos meus avós, Maria Josephina e Genésio aos quais tenho uma profunda admiração e amor, lamento que tenham partido tão cedo, todas as lembranças que tenho de vocês são puramente doces... Desde os beijos apertados do meu avô que a me ver abria os braços e o sorriso gritando "pítchuuuu" às pequeninas mãos da minha avó que preparavam comidas maravilhosas a uma velocidade vertiginosa.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Elza e Laércio que me apoiaram neste sonho, que acreditaram em mim desde o começo até o fim, mesmo quando eu deixei de acreditar. Agradeço especialmente meu pai por todo apoio emocional, pela sabedoria compartilhada, pela companhia nos momentos mais difíceis e principalmente pelo seu olhar amoroso e compreensivo que me serviu de lanterna em meio à escuridão, lanterna que me guiou até eu encontrar a luz.

Agradeço ao meu noivo e meu amor Cristiano, que me acompanhou e me apoiou com todo carinho e atenção neste sonho, que me faz feliz e completa a cada dia e que me mostrou o significado de estar plena.

Agradeço ao professor Sandro pela oportunidade que me deu para desenvolver este trabalho, pela orientação, paciência e ética, por ser um ótimo profissional e ao mesmo tempo tão humano.

Agradeço aos meus queridos colegas de laboratório, Lav, Grasi, Zé, Miriam, Suelen, Luciana, Lucas, Fábio, Luana, Nicole, Karen, Karla, Roney, Leandro e Sonia. E aos queridos agregados da micologia Hadassa e Gilberto. Todos sempre dispostos a ajudar e a dar sorrisos, eu tive a sorte de trabalhar num lugar cheio de gente boa e de bem com a vida, repleto de ótimos profissionais que vou guardar com muito carinho no coração e nunca esquecerei.

Agora agradeço aos meus grandes amigos pessoais que conquistei nesta empreitada Lavinia, Grasielle e José Roberto, sempre juntos pra rir e pra chorar. Agradeço os conselhos, as baladas, as comilanças. Agradeço o grande apoio que me deram nos momentos difíceis. Amigos, irmãos inesquecíveis.

Finalmente agradeço aos meus pequenos grandes companheiros, meus gatos, Alice, Lilla, Serj, Legolas e Fred, que passaram noites em claro fazendo suas gracinhas enquanto eu estudava e escrevia, por eles sinto um amor puro, que a maioria das pessoas não pode compreender, me traz um contentamento contente e fazem a vida mais doce e leve.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo (USP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	38
OBJETIVOS GERAIS	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
MATERIAL E MÉTODOS	40
FUNGO	40
ANIMAIS	40
OBTENÇÃO DOS SOROS IMUNORREATIVOS	40
PRODUÇÃO E OBTENÇÃO DE EXOANTÍGENOS	40
MATERIAL DA SONICAÇÃO DE <i>F. PEDROSOI</i> :	41
DOSAGEM DE PROTEÍNAS:	41
ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE):.....	41
WESTERN BLOT	42
SELEÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORREATIVAS:.....	42
PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ESPECTROMETRIA DE MASSA:	42
SEQUENCIAMENTO PROTEICO	42
RESULTADOS	45
PRODUÇÃO E OBTENÇÃO DOS EXOANTÍGENOS	45
WESTERN BLOT DOS EXOANTIGENOS.....	46
GEL BIDIMENSIONAL DOS EXOANTÍGENOS.....	47
WESTERN BLOT DO GEL BIDIMENSIONAL	47
WESTERN BLOT DO FUNGO SONICADO	48
SEQUENCIAMENTO PROTEICO	50
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

Martins, P. C. S. Identificação e caracterização de proteínas imunogênicas do exoantígeno do fungo *Fonsecaea pedrosoi*. Dissertação para exame de defesa tese (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RESUMO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea, com alto índice de morbidade, causada por fungos demácios, sendo o mais recorrente agente etiológico o *Fonsecaea pedrosoi*. Já foi descrito em todos continentes e é mais recorrente em países de clima quente, sua incidência é de grande importância no Brasil. Raramente os indivíduos se curam, pois, não há terapia padrão por conta da baixa eficácia das terapêuticas antifúngicas atuais contra a cromoblastomicose. Pouco se sabe sobre a relação parasita hospedeiro desta infecção. Os métodos de diagnóstico laboratorial se limitam a visualização das estruturas fúngicas presentes nos tecidos do hospedeiro. Decorrente da falta de informação sobre a cromoblastomicose uma doença de tamanha morbidade, surge à necessidade de estudar melhor a resposta imunológica e seus antígenos. Nosso trabalho mostrou que algumas proteínas secretadas em meio nutricionalmente pobre (exoantígenos) se mostraram imunorreativas, contra os soros de camundongos BALB/c com diferentes tempos de infecção, assim como proteínas derivadas da ruptura do fungo total através da sonicação. A proteína que se mostrou majoritariamente imunorreativa foi a de aproximadamente 50KDa, outros trabalhos descrevem proteínas de alta relevância com peso molecular próximo deste, sugerindo uma possível relação entre os achados. O sequenciamento destas bandas mostrou homologia significativa com enoyl redutase, uma enzima envolvida na síntese de ácidos graxos.

Palavras-Chaves: Cromoblastomicose, *Fonsecaea pedrosoi* e imunogenicidade em cromomicose

ABSTRACT

Martins, P. C. S. Identification and characterization of immunogenic exoantigens proteins of the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. Dissertação para exame de defesa (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ABSTRACT

The chromoblastomycosis is a subcutaneous mycosis with high morbidity, caused mostly by *Fonsecaea pedrosoi*, a dematiaceous fungus. The chromoblastomycosis has been described in all continents and is more recurrent in hot climate countries, with a greatest incidence in Brazil. The host rarely heal because the therapy is low efficacy of current antifungal therapies against chromoblastomycosis. Little is known about the relationship of *Fonsecaea pedrosoi* with the host. The diagnostic methods is limited to visualize fungal structures, present in the host tissues. Arising from lack of information about the chromoblastomycosis, is necessary to characterize new antigens. Our work has shown that some secreted proteins in medium (exoantigens) were immunoreactive against sera from infected mice, with different times of infection, as well as proteins derived from the fungus rupture by sonication. The antigen has approximately 50 kDa. Other studies describe proteins with high relevance close this molecular weight, suggesting a possible relationship between the findings. The sequencing of these bands showed significant homology with enoyl reductase, an enzyme involved in fatty acid synthesis.

Key-words: Chromoblastomycosis, *Fonsecaea pedrosoi* and immunogenicity on chromomycosis

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Cromoblastomicose ou cromomicose é uma doença fúngica crônica geralmente limitada à pele e tecidos subcutâneos. A cromoblastomicose é causada por fungos demáceos que possuem uma constitutiva síntese e deposição de melanina na parede celular fúngica (RIPPON, 1988; DE HOOG et al., 2000;. BRANDT & WARNOCK, 2003). A micose começa com um trauma transcutâneo permitindo que fragmentos de hifas e conídios penetrem subcutaneamente. Ela ocorre, preferencialmente, em seres humanos, embora alguns casos de cromoblastomicose tenham sido relatados em outros mamíferos (MCGINNIS, 1983; RIPPON, 1988., DE HOOG et al, 2000; FONDATI et al., 2001). Os agentes etiológicos da cromoblastomicose são *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta* (a variedade morfológica de *F. pedrosoi*), *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa* (CALIGIORNE et al., 1999). *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala spinifera* (SILVA et al., 2005; DEVELOUX et al, 2006.; TOMSON et al., 2006).

Embora a doença tenha sido diagnosticada em todos os continentes, ocorre mais frequentemente em regiões de clima úmido tropical e subtropical, regiões da América, Ásia e África (RIPPON, 1988 KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; BRANDT & WARNOCK, 2003). Os principais locais de ocorrência da cromoblastomicose incluem Brasil (SILVA et al, 1999;.. MINOTTO et al, 2001), México (BONIFAZ et al, 2001), Venezuela (PEREZ-BLANCO et al., 2006), Japão (FUKUSHIRO, 1983) e em Madagascar (ESTERRE et al., 1996). No Brasil, a Amazônia tem sido considerada como a principal área endêmica da cromoblastomicose (SILVA et al, 1999;.. MARQUES et al, 2006). A infecção geralmente afeta os indivíduos que estão envolvidos na agricultura e os homens são mais comumente afetados (cerca de 70% dos casos). A explicação para essa predominância não é clara, mas os homens são considerados mais comumente envolvidos no trabalho agrícola e são mais propensos a causar lesões em si, facilitando assim a inoculação. Além disso, o possível efeito inibitório de hormônios femininos no crescimento fúngico pode explicar parcialmente o número relativamente baixo de casos em mulheres (Hernandez-Hernandez et al, 1995;. Silva et ai., 1999). Sem

predileção racial a doença é mais recorrente em pacientes de 30-50 anos, pois, o período entre a inoculação e o desenvolvimento da doença é longo (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; SILVA et al, 1999.; BRANDT & WARNOCK, 2003). Os locais mais comumente afetados são as extremidades inferiores, especialmente nos pés, que são mais propensos a estar em contato com materiais infectados, solo e plantas ou madeira podre (RIPPON, 1988). Mãos, braços e nádegas são também freqüentemente acometidos, relatos esporádicos mostram lesões nas orelhas, córnea, pescoço, rosto, peito, tórax e abdômen (BITTENCOURT et al, 1994; MINOTTO et al, 2001; SALGADO et al., 2005).

As lesões iniciais de cromoblastomicose são geralmente pápulas eritematosas, que gradualmente aumentam exibindo morfologias variadas como aspecto de couve-flor, nódulos verrucosos, tumores e placas parecidas com as de psoríase (RICHARD-BLUM et al., 1998). Nos estágios mais avançados da infecção, a disseminação pode ocorrer por extensão das lesões como satélites ao longo do sistema linfático ou por auto-inoculação através do ato de coçar (KONDO et al., 2005).

A principal complicação é a infecção secundária, que pode ser freqüente e levar a linfedema e elefantíase (SILVA & EKIZLERIAN, 1985; SILVA et al, 1999.; KONDO et al., 2005). Quando observadas em microscópio, secções histológicas são compostas de uma camada externa de tecido fibroso e uma camada interna contendo leucócitos polimorfonucleares, células inflamatórias granulomatosas, histiócitos e células multinucleadas gigantes (SILVA & EKIZLERIAN, 1985; BRANDT & WARNOCK, 2003). Em alguns casos, especialmente os de longa data, a reação inflamatória crônica e o tecido fibroso cicatricial podem oferecer uma condição favorável para o desenvolvimento de neoplasia maligna da pele e tecidos mais profundos como muscular e até mesmo ósseo (CAPLAN, 1968; FOSTER & HARRIS, 1987; DOS SANTOS GON & MINELLI, 2006).

A invasão sistêmica em decorrência da cromoblastomicose é muito rara. No entanto, a ocorrência de *F. pedrosoi* em abscessos cerebrais foi relatada em indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes (MCGINNIS, 1983; AL-HEDAITHY et al, 1988; SANTOSH et al, 1995.; NOBREGA et al, 2003; SABERI et al., 2003).

O diagnóstico laboratorial de cromoblastomicose é realizado através da observação de estruturas chamadas de corpos escleróticos, que podem ser identificados pelo exame direto e estudo histológico das crostas e exsudados das lesões (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Os corpos escleróticos são também observados nos tecidos acometidos, através de preparações de hidróxido potássio 10% e hematoxilina-eosina. Os corpos escleróticos são muitas vezes vistos em locais mais profundos das lesões, enquanto que as hifas e conídios podem estar presentes em porções mais superficiais (BONIFAZ et al., 2001). Corpos escleróticos podem ser encontrados de forma individual, em clusters ou no interior das células gigantes. Para as culturas, as partes da amostra para biopsia podem ser utilizadas para o crescimento em Sabouraud suplementado com antibióticos. Pequenas colônias escuras geralmente aparecem dentro de 2 semanas. A identificação das espécies baseia-se na produção de conídios do fungo durante o crescimento em diferentes meios, incluindo ágar batata (DIXON & POLAK-WYSS, 1991). Não há nenhum procedimento sorológico disponível para o diagnóstico da cromoblastomicose. Abordagens moleculares utilizando o gene que codifica subunidades ribossomais foram descritas como ferramentas promissoras para taxonomia dos fungos demáceos (CALIGIORNE et al, 1999, 2005; ABLIZ et al, 2003, 2004.; DE HOOG et al, 2004.; TANABE et al., 2004).

Se não diagnosticada nas fases iniciais, o curso da cromoblastomicose pode evoluir para um estado crônico envolvendo dificuldades em gerir a terapia, a associação potencial com o crescimento de carcinoma epidermóide em áreas afetadas, má qualidade de vida e a incapacidade de trabalhar por conta das limitações causadas nos membros afetados, que podem até necessitar serem amputados, além, do aspecto das lesões que podem causar problemas na vida social do indivíduo (BRANDT & WARNOCK, 2003).

Os neutrófilos e macrófagos são as células-chave na resposta imunológica contra cromoblastomicose. A reação granulomatosa típica observada nos pacientes com a doença é regulada por neutrófilos (URIBE et al., 1989). A produção de citocinas derivadas de macrófagos e a morte de *F. pedrosoi* foi descrita (ALVIANO et al. 2004, NIMRICHTER et al., 2004; HAYAKAWA et al., 2006), embora haja provas de que as estruturas fúngicas podem se modular diminuindo a eficácia dos macrófagos in vitro (FARBIARZ et

al, 1992;.. BOCCA et al, 2006).

O mecanismo de defesa do hospedeiro na cromoblastomicose não tem sido satisfatoriamente investigado. Ainda não se sabe se a imunidade humoral desempenha um importante papel no controle da doença, embora anticorpos com ação antimicrobiana direta em soros de indivíduos infectados tenham sido identificados (ALVIANO et al, 2004a; NIMRICHTER et al, 2005). Os indivíduos provenientes de áreas endêmicas com exposição anterior ao fungo desenvolvem uma resposta humoral específica, embora não tenha sido claramente correlacionada com o curso da doença (ESTERRE et al., 1997).

O período necessário para conversão sorológica é variável, alguns pacientes apresentam sorologia positiva após o final de tratamento antifúngico (ESTERRE et al., 2000). Foi visto que a imunidade mediada por célula em pacientes com cromoblastomicose de longa data foi prejudicada e como resultado, estes indivíduos tornaram-se incapazes de desenvolver uma reação imunológica eficaz contra antígenos fúngicos, contribuindo para a persistência do fungo no tecido (FUCHS & PECHER, 1992).

Reações de hipersensibilidade tardia podem ser utilizadas para indicar respostas inflamatórias mediadas por células T de ambos os antígenos exógenos ou auto-antígenos (BROWN, 1993), e são importantes determinantes da exposição prévia a elementos fúngicos. Este parâmetro é frequentemente utilizado para avaliar a resposta imune celular do hospedeiro a uma vasta gama de agentes patogênicos, incluindo *F. pedrosoi* (CORBELLINI et al., 2006).

Existem poucos estudos avaliando a imunofenotipagem dos elementos celulares relacionados com a imunidade mediada por células envolvidas na resposta inflamatória contra a cromoblastomicose em lesões cutâneas. Subtipos celulares comuns incluem Linfócitos T (CD41 e CD81) e B e numerosos macrófagos (ESTERRE et al, 1991., D'AVILA et al, 2003). Sotto *et al.* (2004) Foi demonstrado que os macrófagos se acumulam na pele e antígenos e de *F. pedrosoi* no citoplasma destas células como material homogêneo ou granulado. Fenômenos semelhantes foram detectados em dendrócitos e células de Langerhans, sugerindo um papel destas células como células apresentadoras de antígeno na cromoblastomicose.

Estudos em camundongos atímicos infectados com *F. pedrosoi*

mostraram que o curso da infecção, levou a granulomas difusos e confluentes com distribuição aleatória de fungos, apoiando um papel para resposta imune mediada por células T (AHRENS et al., 1989). Estudos mostraram que Linfócitos CD4 são células potencialmente importantes para o controle de cromoblastomicose (GIMENES ET AL, 2005;. TEIXEIRA DE SOUSA et al., 2006). A imunização de camundongos com conídios de *F. pedrosoi* apresentou elevado fluxo de células CD4 para drenagem nos linfonodos (TEIXEIRA DE SOUSA et al., 2006). Estas células foram purificadas a partir de camundongos *in vivo* e *in vitro*, proliferaram após a re-estimulação com antígeno específico (designado como chromo Ag, que corresponde ao sobrenadante da cultura isento de células obtido após crescimento de *F. pedrosoi* em meio Sabouraud) com uma produção de IFN- γ . O uso de camundongos deficientes de células CD4 e CD8 em modelo de cromoblastomicose revelou que a carga fúngica no fígado e baço de animais infectados por via intraperitoneal é maior na ausência de células CD4, mas não foi influenciado por linfócitos CD8. Além disso, os camundongos deficientes de células CD4, mas não de CD8, apresentaram a diminuição de hipersensibilidade tardia. Estes animais também produziram quantidades menores de IFN- γ quando em comparação com camundongos selvagens, ao passo que os níveis desta citocina em camundongos deficientes em células CD8 não foram alterados (TEIXEIRA DE SOUSA et al., 2006).

Em humanos com formas graves da doença, uma alta produção de IL-10 e os baixos níveis de IFN- γ são geralmente observados (GIMENES et al., 2005). As células T destes indivíduos não conseguem proliferar *in vitro* após indução com chromo Ag. Em contraste, pacientes com as formas mais leves da doença predominantemente produzem IFN- γ e baixo níveis de IL-10; uma capacidade eficiente de proliferar é observada em populações de células T destes pacientes. Coletivamente, estes resultados podem sugerir que as células CD4 T secretoras de IFN- γ são necessárias para induzir imunidade protetora contra *F. pedrosoi* (GIMENES et al, 2005;.. TEIXEIRA DE SOUSA et al, 2006). Em estudos *in vitro* observou-se que, na presença de agentes da cromoblastomicose, a expressão de moléculas MHC-II e CD8 nos macrófagos são modulados negativamente (HAYAKAWA et al., 2006). Além disso, a fagocitose de conídios de *F. pedrosoi* por células de Langerhans resulta na

inibição de expressão CD40 e B7-2 Os receptores do hospedeiro envolvidos na resposta imunológica contra cromoblastomicose continuam a caracterizar-se (SILVA et al., 2007).

Explorando as razões subjacentes à natureza crônica da infecção por *F. pedrosoi* nosso grupo desenvolveu um modelo murino de cromoblastomicose crônica, devido a uma falta de receptor de reconhecimento de padrões (PRR). *F. pedrosoi* foi reconhecido principalmente por receptores de lectina do tipo C (CLRs), mas não por receptores do tipo toll (TLR), que resultou na indução de citocinas pró inflamatórias defeituosas. A resposta Inflamatória contra *F. pedrosoi* poderia ser reintegrada por co-estimulação de TLR, mas também exigiu a CLR Mincle e sinalização através da via de Syk / CARD9.

A administração exógena de ligantes de TLR ajudou a infecção de *F. pedrosoi* in vivo. Estes resultados demonstram uma falha no reconhecimento inato que pode resultar em infecção crônica, isto realça a importância da sinalização coordenada PRR, e fornece a prova do princípio que exogenamente agonistas aplicados PRR podem ser utilizados terapeuticamente (SOUZA et al 2011).

A resposta imune humoral também parece desempenhar um papel na cromoblastomicose. Silva et al (2014) Exploraram as populações de células T reguladoras e do padrão Th17 em lesões de pacientes. A constituição de uma resposta imune local de alta expressão de IL-17 e baixa expressão de outras citocinas pode ser pelo menos em parte, uma tentativa para ajudar o sistema imune contra a infecção fúngica. Por outro lado, os níveis elevados da resposta imune local mediada por perfil Th17 poderia superar o papel de células T reguladoras. A imunomodulação ineficiente como uma consequência do desequilíbrio por células Treg / Th17 parece corroborar com a resposta imune menos eficaz contra fungos.

A melanina, o principal antígeno do *F. pedrosoi*, é potencialmente envolvida na ativação do receptor Toll-like (TLR) 4 com consequente produção de quimiocina pro-inflamatória IL-8 (EL-OBEID et al., 2006). O conhecimento sobre a estrutura dos componentes da parede celular de *F. pedrosoi* e outros agentes etiológicos da cromoblastomicose ainda é limitada, mas a estimulação de Respostas por TLR a partir de moléculas fúngicas clássicas, como β -glucanas (LEVITZ, 2004) indica que tais mecanismos imunes podem estar

envolvidos na resposta inata contra cromoblastomicose. As b-glucanas também são ligantes envolvidos na ativação de a atividade fungicida de neutrófilos através da ligação a dectina-1 (KENNEDY ET AL., 2007), que tem sido associada com o controle de infecções fúngicas (DENNEHY & BROWN, 2007). Finalmente, estruturas de manose, que foram anteriormente descritos como estruturas de superfície de *F. pedrosoi* (ALVIANO et al. DE 2003), também podem ter potencial para ativar receptores de manose e ajudar a controlar a cromoblastomicose.

O tratamento para cromoblastomicose é muito difícil e a terapia disponível não é totalmente eficaz (BONIFAZ et al., 1997, 2004; ESTERRE & QUEIROZ-TELLES, 2006). A resposta a tratamentos com antimicóticos orais é muito limitada (MINOTTO et al., 2001). Muitos tratamentos tem sido usados para cromoblastomicose mas com baixa eficácia até agora (MCGINNIS, 1983). Itraconazol tem sido usado por longos períodos, geralmente entre 6 e 12 meses, é uma alternativa, porem, muitos pacientes não demonstram melhora no quadro clínico (ANDRADE et al., 2004). Para alguns casos a melhor estratégia terapêutica tem sido a combinação de duas drogas antifúngicas escolhidas após teste de susceptibilidade (POIRRIEZ et al., 2000), como anfotericina B e 5 fluorocitosina (BONIFAZ et al., 1997), ou itraconazol e terbinafina (GUPTA ET AL., 2002). É muito difundido o uso de antifúngicos associados por longos prazos, o que pode levar a resistência fúngica e recaídas durante o tratamento. (ESPINEL-INGROFF, 1997; GIMENES et al., 2005; ESTERRE & QUEIROZ-TELLES, 2006). Testes in vitro revelaram que caspofungina é ativa contra *F. pedrosoi* (DEL POETA et al., 1997), porém fluconazol e ketoconazol praticamente não apresentaram atividade (DE BEDOUT et al., 1997; ANDRADE et al., 2004).

Outras terapias alternativas incluem métodos físicos como cirurgia convencional, cirurgia a laser, termoterapia e crioterapia (BONIFAZ et al., 1997; POIRRIEZ et al., 2000; CASTRO et al., 2003). Entre os tratamentos cirúrgicos os mais efetivos estão eletrodissecação e crioterapia principalmente nos estágios iniciais da cromoblastomicose. (LUPI et al., 2005). O calor local pode reduzir substancialmente a extensão das lesões e a necessidade de cirurgias mais invasivas. Uma terapia que demonstrou sucesso na infecção por *F. pedrosoi* foi a exposição da superfície da lesão a um calor de 46°C por mais de

cinco horas diárias durante dois meses e o uso de laser de dióxido de carbono (HIRA et al., 2002). Membros desabilitados e altamente deformados requerem amputação (ELGART, 1996).

Fonsecaea pedrosoi é um dos agentes causadores da cromoblastomicose mais freqüentes (RIPPON, 1988; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; BRANDT E WARNOCK, 2003). Embora distribuído por todo o mundo *F. pedrosoi* é encontrado principalmente em regiões tropicais. Seu nicho natural é o mesmo descrito para outras espécies de dematiáceos, compreendem o solo, madeira podre e plantas em decomposição (RIPPON, 1988; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; BRANDT & WARNOCK, 2003; SALGADO et al., 2004; MARQUES et al., 2006). Na cultura, *F. pedrosoi* cresce lentamente e produz colônias de textura veludosa para felpuda a 25 °C. As colônias amadurecer normalmente em 14 dias e são de tonalidades entre verde oliva, marrom e preta. A estrutura filamentosa é mantida nas culturas em diferentes condições térmicas de cultivo, 25°C, 30°C ou 37°C. *Fonsecaea pedrosoi* produz hifas marrons escuras septadas e conidióforos eretos ramificados nos vértices. Os conídios são marrons e em forma de barril. A conidiogênese do *Fonsecaea pedrosoi* inclui três padrões de formação de conídios, *Cladosporium*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; RIPPON, 1998). Dentro do hospedeiro durante a infecção o fungo se diferencia morfológicamente, formando grandes estruturas esféricas altamente pigmentadas, estas células são conhecidas como células escleróticas, corpos muriformes ou corpos fumagóides. (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; BRANDT & WARNOCK, 2003; GIMENES ET AL., 2005; FRANZEN ET AL., 2006).

Fonsecaea pedrosoi é um modelo bastante diferenciado em biologia celular, como descrito anteriormente em seu ciclo de vida apresenta diferentes estados morfológicos que incluem estruturas de reprodução (conídios), forma Filamentosa durante sua vida saprófita e fase parasitária representada pelos corpos escleróticos. A princípio, qualquer um destes estados morfológicos podem gerar todas as outras, exceto a transição de células escleróticas para conídios (LOPEZ MARTINEZ & MENDEZ-TOVAR, 2007). Os mecanismos envolvidos nas transições morfológicas do *F. pedrosoi* são ainda desconhecidos, embora o conhecimento sobre o controle experimental desses

processos tenha melhorado nos últimos anos. Muitos fatores estão envolvidos na morfogênese fúngica, incluindo elementos nutricionais, temperatura e oferta de oxigênio (SZANISZLÓ ET AL, 1983;. & OSHEROV DE MAIO, 2001; VAN BURIK & MAGEE, 2001). O cultivo sob condições estáticas induz preferencialmente o crescimento de hifas, enquanto a agitação por períodos curtos (2-5 dias) estimula a formação de conídios. Foram relatadas tentativas de induzir a formação de corpos escleróticos *in vitro* utilizando diferentes abordagens (REISS & NIKERSON, 1974; SZANISZLÓ ET AL., 1976; MCGINNIS, 1983; COOPER, 1985; IBRAHIM-GRANET ET AL., 1987; MATSUMOTO & AJELLO, 1991; ALVIANO ET AL., 1992). No entanto, encontraram muitas dificuldades, sendo assim se conhece menos sobre esta fase morfológica do fungo (KWON- CHUNG & BENNETT, 1992; MENDOZA ET AL., 1993). Gamas ácidas de pH são consideradas como indutoras da formação de células escleróticas (COOPER, 1985; IBRAHIM- GRANET ET AL., 1987). Além disso, tal como descrito por Alviano et al. (1992), uma grande população de corpos escleróticos ($\pm 90\%$) é formada após o crescimento durante 14 dias a 37°C em meio ácido suplementado com propranolol (800 mM). Este estudo foi ainda validado por Silva et al. (2002), que demonstraram que as células escleróticas formadas sob essas condições são morfolologicamente e antigenicamente semelhantes aos obtidos *in vivo*. Também tem sido descrito que *F. pedrosoi* requer que baixas concentrações de Ca^{2+} (0,1 mM) a pH 2,5 para exibir quase 100% de células escleróticas a partir do micélio, sugerindo que a concentração de íons no tecido humano poderia participar do processo de dimorfismo durante cromoblastomicose (MENDOZA et al., 1993). De fato, Ca^{2+} e propranolol induzem a diferenciação em muitas outras células eucarióticas através da ativação da sinalização de diferentes vias (WALLUKAT, 2002; BREITWIESER, 2006). Embora as condições que induzem as transições morfológicas e conseqüente formação de células escleróticas durante a infecção sejam desconhecidas, um potencial indutor de dimorfismo fisiológico do *F. pedrosoi* foi sugerido (ALVIANO et al., 2003). O fator ativador de plaquetas (PAF), um fosfolípido de ocorrência natural, demonstrou induzir a diferenciação de células animal (CHAO & OLSON, 1993) e microbiana (RODRIGUES et al, 1996;.. LOPES et al, 1997) O PAF foi então tesado para estimular a conversão do micélio para células escleróticas do *F.*

pedrosoi (ALVIANO et al., 2003) testes de microscopia confirmaram sua capacidade de induzir a formação destas células típicas, tal como descrito anteriormente com propranolol (ALVIANO et al., 1992). Além disso, vários parâmetros bioquímicos foram avaliados nas células induzidas por PAF e por propranolol. Ambos apresentaram perfis semelhantes dos constituintes de ácidos graxos, composição de polissacarídeos e expressão de fosfolipídios de membrana (ALVIANO et al., 2003). A adição de PAF ou propranolol nas culturas de micélio estimulou de forma semelhante a atividade da ectofosfatase, apoiando uma correlação entre morfogénese e expressão de superfície das fosfatases (KNEIPP et al., 2003). As células escleróticas são extremamente resistentes à destruição pelo sistema imunológico (ESTERRE ET AL, 1993;. & OVERHOLT ROSEN, 1996; HAMZA et al., 2003), o que contribui para a persistência de *F. pedrosoi* dentro do hospedeiro humano e do desenvolvimento de uma doença crônica. Neste contexto, a inibição da diferenciação de micélios de para formas escleróticas parasitárias, poderia ser uma alternativa interessante para a concepção de drogas antifúngicas a serem utilizadas na cromoblastomicose. Portanto, a compreensão deste processo e, conseqüentemente, esta transição morfológica e como pode ser inibido, poderia permitir o desenho de terapias alternativas eficientes contra a cromoblastomicose (SANTOS et. al., 2007).

Uma característica comum em micoses sistêmicas, é a formação induzida pelo patógeno de uma reação granulomatosa, que compreende leucócitos polimorfonucleares (PMN), monócitos e macrófagos (HIRSCH & JOHNSON, 1984;. ESTERRE et al, 1993). Por conseguinte, além das células hospedeiras regularmente presentes em tecidos infectados, células efetoras são recrutadas para os locais de infecção e são elementos chave na resposta imune a micoses subcutâneas (HAYAKAWA et al., 2006). Farbiarz et al. (1990) demonstraram que macrófagos peritoneais residentes de camundongos têm pouca ou nenhuma atividade citotóxica contra os conídios de *F. pedrosoi*. Durante o processo de fagocitose, partículas pigmentadas, supostamente melanina, são liberadas pelo fungo. Estas partículas foram detectadas por microscopia eletrônica em vacúolos fagocíticos contendo fungos, bem como em outros pequenos vacúolos citoplasmáticos, estes pigmentos secretados podem ativar neutrófilos e induzir a produção de anticorpos (ALVIANO et al.,

2004), o qual pode ter um impacto na patogênese da cromoblastomicose.

Rozental et al. (1994) mostraram que os macrófagos ativados também não conseguiram matar conídios do *F. pedrosoi*, embora eles causem um atraso significativo no tubo germinativo e formação de hifas. A atividade oxidativa dos macrófagos ativados foi estudada através da microscopia eletrônica de transmissão. Oxigênio e derivados intermediários foram observados na membrana plasmática ou em associação com fungos contidos nos vacúolos (ROZENTAL et al., 1994).

Outro estudo revelou que os macrófagos, PMN foram capazes de matar o *F. pedrosoi*, mesmo na ausência de anticorpos específicos. (ROZENTAL et al., 1996). Observações citoquímicas permitiram o estabelecimento de uma estreita correlação entre a capacidade e a citotoxicidade extracelular de PMN, como relatado por Nathan et al. (1979). Grânulos contendo peroxidase em neutrófilos foram encontrados em vacúolos com o parasita, indicando que os produtos da clivagem da H_2O_2 estão envolvidos na destruição do *F. pedrosoi*. A aderência microbiana é um dos determinantes mais importantes da patogênese. Este passo é normalmente seguido por internalização microbiana, o que pode ser utilizado pelo agente patogénico se replicar dentro do hospedeiro ou iludir o sistema imunológico (VERSTREPEN & KLIS, 2006). Foi demonstrado que *F. pedrosoi* pode ser detectado no citoplasma de macrófagos e células epiteliais tratados com citocalasina, sugerindo que o fungo apresenta uma capacidade invasiva (FARBIARZ et al., 1990; LIMONGI ET AL., 1997). Aparentemente, a invasão das células hospedeiras por *F. pedrosoi* é precedido por um passo mediado por uma adesina semelhante à lectina. Limongi et al. (1997) usaram de ovário de hamster chinês (CHO) células que apresentam diferentes mutações nos padrões de glicosilação (STANLEY, 1984, 1985) para estudar o processo de adesão de *F. pedrosoi*. Este estudo sugeriu que as células de conídios expressam adesinas do tipo lectina, com afinidade para manose e N-acetilglucosamina (GlcNAc). Os resíduos de manose foram aparentemente envolvidos no estágio inicial da adesão do *F. pedrosoi* as células hospedeiras, enquanto as unidades GlcNAc foram supostamente necessária para a internalização dos fungos (LIMONGI et al., 1997). A superfície de distribuição das lectinas do *F. pedrosoi* foi confirmada utilizando isotiocianato de fluoresceína (FITC) (LIMONGI et al., 2001). Curiosamente, a

expressão de superfície de sítios de manose e GlcNAc foi maior quando o fungo foi cultivado a 37°C do que a 28°C, o que sugere que as adesinas podem ser mais expressas durante a infecção. Além disso, a ligação de manose a neoglicoproteínas contendo GlcNAc foi inibida por incubação prévia de conídios do *F. pedrosoi* com cloroquina e ou tripsina (LIMONGI et al., 2001). Esta observação indica a natureza proteica da molécula de ligação a carboidratos e indica que as adesinas não são recicladas para serem expressas na superfície dos conídios como descrito por Tietze et al. (1980). Extratos da parede de conídios de *F. pedrosoi* obtidos por ruptura mecânica foram purificados por colunas de cromatografia de afinidade por manose ou GlcNAc. A análise de eletroforese revelou apenas uma banda que corresponde a 50KDa em eluatos de ambas resinas sugerindo que a mesma adesina reconhece ambos carboidratos (LIMONGI et al., 2001).

A fosforilação e defosforilação proteica desenvolve um papel na resposta do hospedeiro contra patógenos invasores (MENDES-GIANNINI et al., 2005). Na infecção por *F. pedrosoi*, o ataque e a invasão de células epiteliais e macrófagos tem sido correlacionados com a ação de proteínas quinases incluindo aquelas provenientes das células fúngicas (LIMONGI et al., 2003). O pré-tratamento dos macrófagos, células epiteliais ou conídios com inibidores da proteína quinase estaurosporina, genisteína e callostina antes da infecção diminuiu significativamente a invasão das células por *F. pedrosoi*. Interessantemente, o pré-tratamento apenas de conídios com os fármacos inibidores não diminuiu processo de invasão das células epiteliais, não tendo qualquer efeito sobre a interação com os macrófagos (LIMONGI et al., 2003). Estes resultados sugerem que a proteína quinase associada com o fungo não é eficiente para a sua entrada em células fagocíticas. O aparelho de proteína quinase, no entanto, é necessário para invasão das células teciduais, sugerindo um processo ativo de penetração. Ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais de fosfotirosina revelou uma acumulação de resíduos de tirosina fosforilada no local de fixação do *F. pedrosoi* à célula hospedeira, embora nenhuma rotulagem tenha sido observada após a internalização fúngica. Uma rotulagem da célula hospedeira com faloidina mostrou que filamentos de actina também podem participar deste processo. A coloração de fosfotreonina era mais fraca e somente observada em vacúolos

de macrófagos fagocíticos contendo o fungo (LIMONGI et al, 2003). Pode-se inferir que a fosforilação da tirosina durante este processo é um início, local e um evento de curta vida, enquanto que a fosforilação de treonina é um fenômeno transitório mais tardio e de difícil detecção pelo métodos utilizados no estudo de Limongi et al. (2003). Estes resultados mostram que as redes de transdução de sinal que envolve quinases proteicas e as atividades de fosfatase de proteína podem modular eventos cruciais durante infecções *F. pedrosoi*.

Melaninas fúngicas são carregadas negativamente, hidrofóbicas e de peso molecular elevado, surgindo através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e / ou precursores indólicos (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003). A melanina tem sido detectada em várias agentes patogénicos, incluindo *Candida albicans* (MORRIS-JONES et al., 2005), *Cryptococcus neoformans* (CHASKES & TYNDALL, 1978), *Paracoccidioides brasiliensis* (GOMEZ et al., 2001), *Sporothrix schenckii* (ROMERO-MARTINEZ et al, 2000;.. MORRIS-JONES et al, 2003), *Histoplasma capsulatum* (Nosanchuk et al., 2002), *Blastomyces dermatitidis* (NOSANCHUK et al., 2004) e *Aspergillus fumigatus* (TSAI et al., 2001). A capacidade de fungos patogénicos para produzir melanina está associada com a virulência. Em *C. neoformans*, a melanina protege as células fúngicas contra agentes oxidantes e também pela inibição celular mediada respostas (MEDNICK et al., 2005). A melanina pode interferir com a ativação do complemento e reduzir a susceptibilidade aos antifúngicos (REVISADO POR NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003). Em *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *S. schenckii*, a melanina foi detectada *in vitro* e *in vivo*, mas o seu papel em infecções fúngicas ainda não está claro. A capacidade do *F. pedrosoi* de produzir componentes de melanina associados a parede tem sido amplamente relatado (Farbiarz et al, 1990;.. Alviano et al, 1991, 2004a; Franzen et al, 1999., 2006; Cunha et al., 2005). Os constituintes do complexo de melanina da forma micelar do *F. pedrosoi* foram parcialmente descritos por Alviano et al.(1991). Os componentes associados a melanina compreendem ácidos graxos, polissacarídeos e proteínas. Manose, galactose e glucose foram os açúcares constituintes, enquanto os componentes lipídicos foram ácidos graxos saturados e insaturados variando de 16 a 18 carbonos. Ácidos aspártico e glutâmico, leucina glicina e alanina

foram os aminoácidos mais recorrentes (ALVIANO ET AL., 1991).

A microscopia eletrônica mostrou que a síntese de melanina do *F. pedrosoi* envolve a formação de compartimentos do tipo melanossoma, como descrito em células de mamíferos (SEIJI ET AL, 1963;.. QUEVEDO ET AL, 1987; MARKS & SEABRA, 2001; RAPOSO & MARKS, 2002). A biossíntese de melanina em fungos patógenos, incluindo *F. pedrosoi*, leva a acumular pigmentos com uma estrutura altamente resistente, subjacente à parede da célula (ROSAS et al, 2000;. & NOSANCHUK GOMEZ, 2003; NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003). Por causa dessa combinação entre a distribuição celular e a alta resistência contra diferentes medicamentos, a digestão de fungos melanizados com proteases, glicanases e desnaturantes origina partículas de melanina, chamadas de fantasmas de melanina (ROSAS et al., 2000). A digestão de *F. pedrosoi* também produz partículas pigmentadas, semelhantes em tamanho e forma (ALVIANO et al., 2004). Este resultado associado à análise de imunofluorescência leva a evidências que a síntese de melanina em *F. pedrosoi* segue o padrão de acúmulo de pigmento associados a parede fúngica. Curiosamente, as partículas segregadas de melanina podem também ser isoladas a partir de culturas de *F. pedrosoi*. Estas moléculas extracelulares são reconhecidas pelos soros de indivíduos com cromoblastomicose (ALVIANO et al., 2004), que concordou com estudos anteriores demonstrando que as melaninas fúngicas são compostos imunogenicamente ativos (NOSANCHUK et al, 1998;.. ROSAS et al, 2000). A biossíntese de melaninas fúngicas deriva de diferentes precursores. Mais comumente, os pigmentos fúngicos derivam de 1,8-dihidroxinaftaleno, gerando o chamado dihidroxinaftaleno-melaninas (revisado por GOMEZ & NOSANCHUK, 2003). Esta é a via biológica usado por *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium carrionii*, *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*, *F. compacta*, *Hendersonulla toruloidii*, *Phaeoannellomyces werneckii*, *Phialophora richardsiae*, *Phialophora verrucosa*, *Xylohypha bantiana* e *S. schenckii* (revisado por GOMEZ & NOSANCHUK, 2003). Em contraste, *C. neoformans* produz eumelanina através de polifenol oxidase (uma lacase), que catalisa uma de uma etapa da oxidação de intermediários de quinona dihidroxifenóis para que se auto-oxide subsequentemente para formar a melanina (RHODES et al.,

1982). A suplementação de culturas de *F. pedrosoi* com agrotóxicos triciclazólicos resultou num defeito de pigmentação (CUNHA et al., 2005). Como os triciclazólicos inibem a mielinização em células fúngicas bloqueando a via de síntese de melanina da dihidroxinaftalina, concluiu-se que o *F. pedrosoi* produz o pigmento utilizando esta via (CUNHA et al., 2005). Embora o tratamento com triciclazol não tenha influenciado a viabilidade dos fungos (FRANZEN et al., 2006), reduziu a habilidade do *F. pedrosoi* de destruir os macrófagos (FARBIARZ et al., 1990). Conídios tratados com triciclazol são mais susceptíveis aos efeitos anti-microbianos de macrófagos (CUNHA ET AL., 2005). Este efeito pode estar relacionado com as diferenças morfológicas perceptíveis induzidas pelo, triciclazol como foi descrito por Franzen et al. (2006). Foi mostrado que a melanina deve ser produzida e libertada durante a infecção por *F. pedrosoi* (FARBIARZ et al., 1990). Os soros de pacientes com cromoblastomicose reagem com a forma solúvel da melanina *F. pedrosoi* (ALVIANO et al., 2004). Os anticorpos contra melanina foram purificados com base na sua afinidade semelhante por resíduos de pigmentos insolúveis e utilizados em ensaios imunológicos e de crescimento celular. Como demonstrado por imunofluorescência e citometria de fluxo, os anticorpos de ligação a melanina foram reativos contra conídios pigmentados, micélio e as células escleróticas, bem como as partículas de fantasmas (ALVIANO et al., 2004). Células escleróticas obtidas a partir de lesões de pacientes foram similarmente reconhecidas pelos anticorpos. Em ensaios de fagocitose, conídios do *F. pedrosoi* foram opsonizados na presença de anticorpos para melanina, resultando num aumento da ingestão e morte por neutrófilos humanos e de animais (ALVIANO et al., 2004). Mesmo na ausência de células efectoras hospedeiras, anticorpos para melanina inibiram o crescimento *in vitro* de conídios e células escleróticas. Após tratamento com anticorpo, apenas 2,8% dos conídios permaneceram viáveis, indicando uma alta toxicidade mediada por anticorpos. Células escleróticas também foram inibidas, mas em menor grau. Esta observação pode ser uma consequência do fato de que os corpos escleróticos normalmente formam grandes agregados (ALVIANO et al., 1992), o que poderia prejudicar o acesso de ligantes externos às células internas.

Os resultados acima de acordo com dados anteriores demonstram que, em

camundongos infectados com *C. neoformans*, a administração de anticorpos monoclonais (mAbs) para melanina melhorou significativamente a sobrevivência dos animais (ROSAS et al., 2001). No modelo de *Cryptococcus*, mAbs anulou completamente o crescimento de células melanizadas, ao passo que não houve nenhum efeito sobre a replicação de células não melanizadas. Tomado em conjunto, estes resultados demonstram que a melanina é uma chave da parede celular que pode ser alvo de agentes antifúngicos. Os níveis de fagocitose de células escleróticas e conídios por neutrófilos foram aumentados na presença da melanina fúngica, o que sugere que as partículas de melanina também poderiam ativar as células fagocíticas (ALVIANO et al., 2004). A explosão oxidativa de neutrófilos na presença de *F. pedrosoi*, não está relacionada a fagocitose de fungos (*C. albicans*) por neutrófilos. A ingestão e a morte de conídios de *F. pedrosoi* por diferentes células fagocíticas foram aumentadas na presença de melanina solúvel (ALVIANO et al., 2004).

Estas observações concordaram com os relatos anteriores demonstrando que melaninas ou os seus precursores podem influenciar a ativação de macrófagos (D'ACQUISTO et al., 1995) e a proliferação e diferenciação de queratinócitos humanos e fibroblastos (BLINOVA et al., 2003). A capacidade da melanina de *F. pedrosoi* para ativar fagócitos foi, no entanto contrariada (BOCCA et al., 2006). Em um modelo incluindo IFN γ e macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo, o pigmento inibiu a produção de óxido nítrico (BOCCA et al., 2006). Segundo esses autores, este efeito pode estar relacionado com a incapacidade do hospedeiro em dizimar o *F. pedrosoi* do organismo, levando a uma doença crônica.

Os ácidos siálicos são uma família de monossacáridos compreendendo vários derivados de ácido neuramínico (SCHAUER, 1982). A sua presença em muitos glicoconjugados como monossacárideos terminais confere biologicamente diversas atividades para superfícies celulares (SCHAUER & KAMERLING, 1997). Em células fúngicas, ácidos siálicos parecem contribuir para a patogênese microbiana, protegendo fungos contra a fagocitose (revisto por ALVIANO et al., 1999) ou promovendo a adesão às proteínas da matriz extracelular (WASYLNKA et al., 2001). Os ácidos siálicos foram identificados como componentes da superfície dos micélio e conídios de *F. pedrosoi* (SOUZA et al., 1986; ALVIANO et al., 2004). Ácido N-acetilneuramínico

(Neu5Ac) foi o único derivado encontrado na fase de micélio. Já nos conídios continham ambos ácidos N glicolilneuramínico (Neu5Gc) e Neu5Ac (SOUZA et al., 1986). Em um relato inicial os ácidos siálicos foram caracterizados como os principais determinantes da morfogênese e integridade celular em *F. pedrosoi*, conforme inferida a partir das alterações marcantes na morfologia das hifas observada após a remoção enzimática destes açúcares (SOUZA et al., 1986). A expressão de glicoconjugados siálicos nos conídios, micélio e nas células escleróticas de *F. pedrosoi*, foi analisada utilizando siálico vírus (influenza A e estirpes do vírus C) tratamento de sialidase, e ensaios de ligação a lectina (ALVIANO et al., 2004). Tratamento de conídios e micélios marcados com FITC revelou a presença de glicoconjugados siálicos. Os conídios também expressam na parede celular estruturas contendo 9-O-acetil-N-acetilneuramínico (Neu5,9Ac2). As estruturas siálicas no *F. pedrosoi* eram aparentemente, glicoproteínas, como foi demonstrado por teste de imunorreatividade (ALVIANO et al., 2004). Em extratos celulares, proteínas de conídios e micélio, com molecular massas correspondentes a 40 e 56 kDa foram detectadas pela de ligação à lectina. Uma banda adicional de 77 kDa foi detectada em extratos protéicos de conídios, o que sugere uma associação entre expressão de ácido siálico e morfogênese (ALVIANO et al., 2004). Os ácidos siálicos e glicoproteínas siálicas não eram detectadas em células escleróticas obtidas *in vitro* ou *in vivo* (ALVIANO et al., 2004), sugerindo que estas células não possuem o metabolismo do ácido siálico. A possibilidade de que as técnicas convencionais para a detecção de ácido siálico não serem úteis com essas células não pode ser descartada também. Ainda não está claro como os ácidos siálicos podem influenciar na patogênese fúngica. Há, no entanto, algumas evidências que sustentam a hipótese de que os ácidos siálicos poderiam ajudar as células fúngicas a escapar das defesas do hospedeiro, protegendo-os contra a fagocitose (ODA et al., 1983; RODRIGUES et al., 1997; ALVIANO et al., 2004). De fato, a remoção enzimática de ácidos siálicos da superfície de conídios do *F. pedrosoi* resultou no aumento da fagocitose por os neutrófilos humanos a partir de indivíduos saudáveis (ALVIANO et al., 2004). Neste contexto, o papel da superfície fúngica contendo conjugados glicosílicos na infecção por *F. pedrosoi* pode ser semelhante ao que proposto para outras infecções (RODRIGUES et al., 1997), em qual o

ácido siálico, expresso pelos propágulos infecciosos, poderia proteger fungos contra a destruição por células hospedeiras até a diferenciação em forma parasitária. Em células escleróticas, a expressão aumentada de melanina aumenta a resistência contra a ação de células imunes efectoras (ESTERRE et al., 1993; ROSEN & OVERHOLT, 1996; HAMZA et al., 2003) e a expressão de ácido siálico não seria necessária. As sialidases são enzimas que removem os ácidos siálicos terminais de glicoconjugados siálicos (SCHAUER & KAMERLING, 1997).

Estas enzimas têm um potencial papel em muitas infecções microbianas (JOST et al., 2001), mas o seu papel no metabolismo das células fúngicas é controversa (UCHIDA et al., 1974; REAL et al., 1984; ROGGENTIN et al., 1999). Alviano et al. (2004) demonstraram que o micélio e conídios, mas não células escleróticas de *F. pedrosoi*, produzem sialidase. O papel das sialidases em infecção por *F. pedrosoi* é desconhecida, mas a remoção dos ácidos siálicos a partir de glicoproteínas da superfície celular altera perfis de glicosilação e glicolípidos em células fúngicas, o que poderia resultar na exposição de sítios adicionais para interação com conídios e formas de micélio.

As glicosilceramidas [cerebrosídeos, monohexosil ceramidas (CMH) ou GlcCer / GalCer] são glicoesfingolípidos (GSL) neutros sintetizados por uma variedade de organismos, incluindo animal, vegetal e fungos (LYNCH et al., 1992; BARRETO-BERGTER et al., 2004; NIMRICHTER et al., 2004). Eles são constituídos por um monossacárido, normalmente glicose ou galactose em ligação com o álcool primário de ceramida. Diferenças estruturais significativas têm sido observadas entre CMH fúngica e os seus homólogos em células animais, indicando uma via biosintética similar. CMH têm sido implicados em várias funções celulares, tais como o crescimento celular, a sinalização intracelular, a adesão microbiana e apoptose e triagem de proteínas (HAKOMORI, 2003; NIMRICHTER et al., 2005). Em organismos fúngicos, CMH tem sido relacionado com a triagem de moléculas de superfície celular, diferenciação celular, crescimento e patogenicidade (RODRIGUES et al., 2000, 2007; TOLEDO et al., 2001; LEVERY et al., 2002; PINTO et al., 2002; DA SILVA et al., 2004; NIMRICHTER et al., 2005; RITTERSHAUS et al., 2006). Métodos cromatográficos e MS demonstrou que CMH é sintetizado por *F. pedrosoi*. CMH de formas de micélio e conídios de *F. pedrosoi* foram

purificados e caracterizados como N-20-hydroxyhexadecanoyl-1- β -D-glucopiranosil e 9-metil-4,8-esfingadienina (NIMRICHTER et al., 2004, 2005), a estrutura conservada é normalmente encontrada em organismos fúngicos (BARRETO-BERGTER et al., 2004). Análise Imunofluorescência usando um mAb contra CMH de *F. pedrosoi*, demonstrou um perfil de reatividade muito interessante na superfície destas células, em que só os conídios ou micélios crescentes foram marcados, outros patógenos fúngicos mostraram também relação de CMH na apoptose e Triagem de Proteínas (HAKOMORI, 2003; NIMRICHTER et al., 2005). Em Organismos fúngicos, CMH tem Sido relacionado com a Triagem de Moléculas de superfície celular, diferenciação celular Crescimento e patogenicidade (RODRIGUES et al., 2000, 2007; TOLEDO et al., 2001; LEVERY et al., 2002; PINTO et al., 2002; DA SILVA et al., 2004; NIMRICHTER et al., 2005; RITTERSHAUSET al., 2006). Métodos cromatográficos e MS demonstrou que CMH é sintetizado por *F. pedrosoi* nas fase micelar e nos conídios.

No entanto, células escleróticas tratadas com mAb permaneceram 100% viáveis. Este resultado estava de acordo com os dados de imunofluorescência, mostrando que essas células não são reconhecidas pelos anticorpos anti-CMH (NIMRICHTER et al., 2004). Além disso, o índice de adesão de células tratadas com mAb escleróticas foi semelhante ao que a observada quando os anticorpos não foram adicionados. Três possibilidades foram levantadas: O CMH poderia estar ausente em células escleróticas, o CMH poderia ser produzido por estas células, embora apresentando uma estrutura distinta que prejudicaria o seu reconhecimento pelo mAb, ou a alta da melanização células escleróticas poderia formar um escudo protetor, bloqueando o acesso do anticorpo ao CMH. Todas as possibilidades foram investigadas (NIMRICHTER et al., 2005). CMH a partir de células escleróticas foram purificados e caracterizadas. Em contraste com vários fungos patogênicos em que CMH foram estudadas, as moléculas de células escleróticas de *F. pedrosoi* tinha uma diversidade estrutural. Embora estrutura conservada, foi encontrada nestas células, as principais espécies de CMH continham um grupo hidroxilo adicional, ligado à sua base de cadeia longa. Portanto, a expressão de CMH sobre as formas de parasitas *F. pedrosoi* foi confirmada. Curiosamente, este CMH estruturalmente diferente foi também reconhecido em ensaios

imunoenzimáticos por o mAb produzidos contra o estrutura conservada. No entanto, uma diminuição substancial na presente reconhecimento foi detectada, o que poderia explicar a falta de reatividade demonstrada experimentalmente por imunofluorescência (NIMRICHTER et al., 2005).

A última questão levantada foi o potencial de bloqueio devido ao reconhecimento pelo anticorpo expressão de melanina. De fato, as células escleróticas são fortemente pigmentadas (SILVA et al., 2002). Além disso, é bem sabido que este polímero é capaz de bloquear o acesso de várias moléculas através da parede celular das células fúngicas (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2006). A análise microscópica revelou que pormenorizada ligação do anticorpo a CMH foi apenas detectável na parede celular regiões onde melanização não era evidente. Por conseguinte, remoção de melanina a partir da superfície resultou em forte reação com o anticorpo anti-CMH, confirmando que a outros componentes da parede celular afeta a exposição destes lípidos a ligantes externos. Esses resultados levaram à conclusão de que melanização poderia afetar a ligação e, consequentemente, a susceptibilidade das células fúngicas para compostos antimicrobianos (NIMRICHTER et al., 2005). Os dados acima confirmam estudos anteriores revelando que CMH fúngica e sua via de biossíntese são potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (THEVISSSEN et al., 2005). Os dados sugereem que o anti-CMH é um agente antifúngico eficaz *in vitro*. No entanto, o escudo de melanina formada na superfície da célula, especialmente neste patógeno, é claramente um fator limitante. O uso alternativo de pequenas moléculas antimicrobianas, supostamente capazes de penetrar a blindagem de melanina e ligar no CMH, poderia ser uma alternativa promissora para controlar o crescimento de fungos. A este respeito, foi demonstrado que as defensas vegetais reconhecem especificamente CMH fúngica matando o micróbio (THEVISSSEN et al., 2004).

Ectoenzimas ou enzimas extra citoplasmáticas são moléculas cujo sítio catalítico está virado para o meio extracelular (HUNTER, 1995; MEYER-FERNANDES, 2002; RAST et al., 2003). Estas enzimas no *F. pedrosoi*, foram caracterizadas como enzimas da parede celular ecto-fosfatases e ecto-ATPases (E-Type) (KNEIPP et al, 2003, 2004.; COLLOPY-JUNIOR et al., 2006). A capacidade de *F. pedrosoi* para produzir ecto-fosfatases de superfície

foi primeiramente sugerida pela capacidade de micélios intactos de hidrolisar substratos fosforilados, tais como p-nitrofenilfosfato e aminoácidos fosforilados (KNEIPP et al., 2003, 2004). A atividade da enzima foi maior em pH ácido e foi fortemente reduzida por inibidores clássicos das fosfatases tais como ortovanadato de sódio, molibdato de sódio e fluoreto. A distribuição da parede celular e do micélio, assim como enzima de conídios foi confirmada pela microscopia eletrônica de transmissão, que mostrou densos depósitos de fosfato neste compartimento celular (KNEIPP et al., 2003, 2004). A atividade ecto-fosfatase em *F. pedrosoi* parece ser associada com o parasitismo, as células escleróticas mostraram a atividade mais elevada do que os conídios e micélio (KNEIPP et al., 2003). Além disso, um material isolado a partir de um caso humano de cromoblastomicose também mostrou aumento da atividade da enzima (KNEIPP et al., 2003), sugerindo que a expressão de fosfatases de superfície pode estar relacionada com patogênese. Em outro, um modelo de expressão diferencial de ecto-fosfatase induzida por fosfato exógeno confirmou esta hipótese (KNEIPP et al., 2004). Seguindo a descrição que Kneipp et al. (2004) o cultivo de conídios na ausência de exógeno resultou num aumento de 130 vezes na atividade da fosfatase de superfície. O pré-tratamento de células fúngicas com ortovanadato de sódio, um inibidor irreversível da ecto-fosfatase, reduziu a capacidade adesiva dos conídios (KNEIPP et al. 2004). Tomados em conjunto, estes resultados indicam que a ectofosfatase, além de suas possíveis funções na biologia de células de fungos, podem contribuir para a adesão de conídios de *F. pedrosoi* a células hospedeiras, um primeiro passo crucial no estabelecimento de cromoblastomicose. A capacidade de *F. pedrosoi* de hidrolisar aminoácidos fosforilados, aparentemente, varia de acordo com a diferenciação celular. A correlação entre morfogênese e expressão de superfície de fosfatases, de fato, parece ocorrer no *F. pedrosoi*. Além da observação de que células escleróticas, micélio e conídios expressam diferentes níveis de atividade ecto-fosfatase (KNEIPP et al., 2003), foi demonstrado que o propranolol e PAF, dois indutores distintos de celular diferenciação de *F. pedrosoi* (ALVIANO et al., 1992, 2003), estimulou significativamente a atividade das fosfatases de superfície (ALVIANO et al., 2003). As vias de sinalização que envolvem a atividade da ecto-fosfatase e diferenciação celular em *F. pedrosoi* continuam a ser estudadas. Ecto-ATPases

também estão presentes na superfície celular do *F. pedrosoi* (COLLOPY-JUNIOR et 2006 al.). Usando ATP como um substrato, uma atividade ecto-ATPase estimulada em MG21 formas de micélio foi caracterizado. Esta enzima atinge o seu ápice de atividade em pH alcalino e não foi sensível a inibidores de fosfatases e ATPases intracelulares. (ZIGANSHIN et al., 1995). Com base no fato que as células do micélio apresentaram níveis de atividade enzimática muito superiores às observadas em conídios e células escleróticas, uma correlação entre a atividade e diferenciação ecto-ATPase em *F. pedrosoi* também foi sugerido (COLLOPY-JUNIOR et al.,2006). No entanto, o conhecimento da relevância destas enzimas em biologia de fungos ou patogênese ainda é muito preliminar (SANTOS et al.,2007).

Conforme exposto anteriormente estudos mostram a presença de anticorpos contra antígenos específicos reconhecidos por soros de indivíduos infectados (VIDAL et al 2003 e 2007). A fim de explorarmos mais estas informações decidimos isolar as proteínas que se mostrassem imunorreativas em soros de animais infectados pelo *F. pedrosoi* e caracteriza-las.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Identificar e caracterizar as proteínas imunorreativas do *Fonsecaea pedrosoi*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de exoantígenos e proteínas por sonicação de colônias do *Fonsecaea pedrosoi*.
- Imunização e coleta dos soros dos animais modelo.
- Padronização do gel bidimensional.
- Definir as proteínas imunorreativas aos soros dos animais infectados pelo *Fonsecaea pedrosoi* por diferentes períodos, através de testes de Western blot.
- Caracterizar as proteínas do *Fonsecaea pedrosoi* obtidas a partir dos exoantígenos e da sonicação de colônias.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Fungo

Foi utilizada a cepa do fungo *Fonsecaea pedrosoi* da American Type Culture Collection (ATCC) número 46428 (Obtida no Laboratório de Micologia Clínica da Universidade de São Paulo-USP). A mesma foi mantida em meio ágar batata a 30°C, com repiques quinzenais.

Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c com 8 a 12 semanas de vida, obtidos no Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, foram mantidos em ambiente livre de patógenos específicos (SPF) e alimentados com ração comercial irradiada. Os camundongos foram sacrificados de acordo com critérios aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – CEUA/FCF.

Infecção dos animais

Dois grupos de animais contendo nove animais cada foram infectados via intraperitoneal com a mesma suspensão, contendo 1×10^6 conídios de *F. pedrosoi* em 100µL de PBS. Os grupos foram mantidos no biotério nas mesmas condições até a coleta do material.

Obtenção dos soros imunorreativos

O primeiro grupo foi eutanasiado 15 dias após a infecção, o segundo grupo 30 dias após a infecção. A coleta do sangue foi realizada da mesma forma por via intraperitoneal, após anestesia e total perda dos sentidos do animal, o sangue foi centrifugado por cinco minutos a 2000 rotações por minuto (rpm), a fase líquida, ou soro, foi coletada e armazenada a temperatura de -20°C até o momento do uso.

Produção e obtenção de exoantígenos

Colônias do *F. pedrosoi* (cerca de 1g de fungo em 300 ml de meio) foram fragmentadas e transferidas para o meio de cultura líquido caldo batata, onde permaneceram a 37°C sob constante agitação de 200 rpm, após 5 e 10 dias sob estas condições, as culturas receberam 0,2g de Timerosal® e decantaram

por cerca de 40 minutos, o sobrenadante foi recolhido em tubos Falcon® e centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi novamente recolhido e concentrado com auxílio do Amicon® 10 vezes a partir do volume inicial. Este material foi dialisado contra PBS por cerca de 16 horas, havendo duas trocas do diluente, a primeira após duas horas do início da diálise e a segunda após 12 horas.

O sobrenadante da cultura concentrado e dialisado passou por processo de precipitação proteica com auxílio do ácido tricloroacético e acetona. As proteínas obtidas da precipitação foram sonicadas em tampão para reidratação e estoque de amostra aplicável em gel bidimensional. Todo procedimento foi realizado conforme descrito no manual de eletroforese bidimensional da G&E (2-D Electrophoresis Principles and Methods 2004).

Material da sonicação de *F. pedrosoi*:

Porções de colônia de *F. pedrosoi* (50mg) crescidas em ágar batata por cerca de 10 dias foram removidas do meio, fragmentadas em pedaços pequenos e transferidas para microtubos de 2ml, contendo 1ml de tampão de estoque para amostra aplicável em gel bidimensional(G&E). O conteúdo do microtubo foi sonicado em amplitude de 50%, por cerca de 20 minutos, com intervalos de 15 segundos a cada 10 segundos de sonicação.

Dosagem de proteínas:

A dosagem protéica dos exoantígenos e das colônias sonicadas de *F. pedrosoi* foi realizada conforme o método de Bradford, utilizando CBB G-250, tendo como padrão albumina bovina e o tampão de estoque para amostra aplicável em gel bidimensional, respectivamente para o exoantígeno e o material sonicado.

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE):

Os exoantígenos e o fungo sonicado foram submetidos a processo de eletroforese bidimensional. A focalização isoeletrica foi realizada em sistema IPGphor (Amersham Biosciences) utilizando-se DryStrips Immobiline de pH 3-11 e 7cm, a segunda dimensão correu em gel de poliacrilamida 12%, por uma hora a 200mA. Os géis foram corados por Coomassie coloidal (Bio-Rad) ou por prata.

Western blot

O conteúdo dos géis foi transferido para membranas ECL com auxílio de uma unidade de transferência PWR70 G&E®. A transferência levou 60 min. Numa voltagem de 90mA, em seguida as membranas de ECL foram bloqueadas com uma solução contendo 2,5% de BSA, 5% de leite e 0,5% de tween 20 diluídos em PBS por duas horas. Após o bloqueio as membranas foram lavadas com uma solução contendo 0,05% de tween 20 diluído em PBS, seguiu então a etapa da interação das proteínas do *F. pedrosoi* com o soro dos animais. O soro diluído em PBS 1:200 foi interagido com a membrana por 16 horas, sob constante agitação a 4°C, em seguida as membranas foram lavadas com 0,5% de tween 20 diluído em PBS por três vezes, e então foi adicionado o anticorpo secundário *anti-mouse* IgG-HRP *conjugated* Santa Cruz Biotechnology® também diluído em PBS 1:5000, a interação durou 2 horas e foi seguida por uma lavagem com PBS e posterior revelação por quimioluminescência. O kit usado para revelação foi HRP *Chemiluminescent Substrate Reagent* Novex® da Invitrogen.

Seleção de proteínas imunorreativas:

As proteínas imunorreativas do exoantígeno e do fungo sonificado foram determinadas através do teste de Western blot, com os soros dos animais infectados. Fizemos pools dos soros, um contendo os de 15 e outro com os 30 dias de infecção e aplicamos para determinar a imunoreatividade das proteínas contidas no exoantígeno e no fungo sonificado.

Processamento do material para espectrometria de massa:

Os pontos e bandas selecionados foram incisados dos géis manualmente e sofreram digestão trípica como descrito por Shevchenko et al. 1996. Este material foi armazenado a temperatura de -20°C.

Sequenciamento proteico

As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker) utilizando o protocolo interno de preparação de amostra para análise de peptídeos. O protocolo consiste na mistura de 1 µL de uma solução saturada

de α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (TA 30 - 30/70 ACN:TFA0,1%) com 1uL da solução da amostra (resuspendida em TFA 0,1%). 0,5uL foi aplicado na placa AnchorChip para ser analisada. A aquisição dos dados foram realizadas no modo linear com os seguintes parâmetros: Ion Source 1 19.00 kV, Ion Source 2 16.80 kV, Lens 7.9 kV, Pulsed Ion Extraction 130 ns, Mass Range 700 - 3500Da, Laser Frequency 500Hz, Detector Gain 5.6x. Ainda para a aquisição, foram utilizados os padrões de calibração Protein Calibration Standard I (Bruker). A identificação das proteínas foi realizada através da ferramenta de busca Mascot no banco de dado SwissProt, utilizando filtro para taxonomia Fungica.

RESULTADOS

RESULTADOS

Produção e obtenção dos exoantígenos

Como descrito anteriormente, colônias do *Fonsecaea pedrosoi* foram submetidas às mesmas condições nutricionais e térmicas por tempos diferentes, a fim de determinar o melhor período para obtenção de exoantígenos. Para isto, utilizamos corrida eletroforética, aplicamos as amostras em gel de poliacrilamida 12% e fizemos a corrida com 200 mA por cerca de uma hora. As amostras mostraram um perfil proteico muito similar, porém as bandas do gel que representa a produção de exoantígenos por cinco dias se mostraram ligeiramente mais bem definidas que as de dez. Nas figuras 1 e 2 temos os géis empregados para testar a produção dos exoantígenos do *F. pedrosoi*, a coloração dos géis foi feita pela prata. As figuras mostram bandas num intervalo entre 260 e 20 kDa, a figura 1 mostra a amostra produzida por cinco dias e a figura dois a amostra produzida por 10 dias.

Figura 1: Gel de poliacrilamida 12% de exoantígenos de *F. pedrosoi* produzidos durante 5 dias. Corado por prata. As colunas da esquerda para direita apresentam concentrações crescentes de proteína, contendo no último poço o padrão de peso molecular.

Figura 2: Gel de poliacrilamida 12% de exoantígenos de *F. pedrosoi* produzidos durante 10 dias. Corado por prata. As colunas da esquerda para direita apresentam concentrações crescentes de proteína, contendo no último poço o padrão de peso molécula.

Western blot dos exoantígenos

Por conta da melhor definição das bandas, utilizamos os exoantígenos produzidos por cinco dias para realização do western blot. Os géis foram desenvolvidos como descrito anteriormente em materiais e métodos e seus conteúdos foram transferidos para membrana de ECL para realização dos ensaios. As figuras a seguir ilustram os resultados obtidos em relação à imunorretividade das substâncias liberadas pelo *Fonsecaea pedrosoi* no meio. A figura 3 mostra imunorretividade destas substâncias contra soros de camundongos após 15 dias de infecção, onde observamos apenas uma banda imunorreativa entre 260 e 140 KDa. A figura 4 ilustra a imunorretividade do mesmo material usado no teste anterior só que contra soros dos camundongos infectados por 30 dias, onde observamos um número maior de proteínas imunorreativas, podendo chegar a oito bandas de pesos moleculares variados.

Figura 3: Western blot usando o soro de camundongos BALB/c infectados com *F. pedrosoi* por 15 dias contra exoantígenos do fungo. Observa-se uma banda imunoretiva no intervalo entre 260 e 140 KDa.

Figura 4: Western blot usando o soro de camundongos BALB/c infectados com *F. pedrosoi* por 30 dias contra exoantígenos do fungo. Observa-se bandas imunoretivas de diferentes pesos moleculares.

Gel bidimensional dos exoantígenos

O gel bidimensional foi desenvolvido como descrito em materiais e métodos, para primeira dimensão utilizando tiras immobline® da G&E, com intervalo de pH entre 3 e 10 onde impregnamos os exoantígenos e focalizamos, para segunda dimensão usamos gel de poliacrilamida 12%, a corrida eletroforética foi realizada a 200mA por uma hora, o gel foi então corado por Comassie. Observamos proteínas majoritárias em pontos corados localizados no intervalo de pH entre aproximadamente 7 e 9, variando em peso molecular entre 150 e 30 KDa. A figura 5 mostra o mapa proteômico onde numeramos as proteínas conforme a intensidade que elas apresentaram após coloração por comassie, onde o ponto 1 é mais intenso e o 14 menos.

Figura 5: Mapa proteômico dos exoantígenos do *Fonsecaea pedrosoi* utilizando tiras immobline para focalização com pH entre 3 e 10 e corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12%. Corado com Comassie G50. Os números indicam os pontos conforme a intensidade de coloração de forma decrescente, onde 1 é mais fortemente corado e 14 menos.

Western blot do gel bidimensional

O conteúdo do gel bidimensional (exoantígenos) foi transferido para membrana ECL com uso da unidade de transferência da G&E PWR 70, realizamos então o protocolo para western blot como descrito anteriormente e revelamos por

quimioluminescência usando kit da Novex®. A figura 6 mostra os pontos imunorreativos a soros de camundongos após 30 dias de infecção. Um ponto no centro do gel com aproximadamente 25KDa e outro com aproximadamente 40KDa.

Figura 6: Western blot do gel bidimensional do exoantígeno do *Fonsecaea pedrosoi* contra soro de camundongo BALB/c após 30 dias de infecção, para primeira dimensão foi utilizado tira imobilizante pH entre 3-10, para segunda dimensão gel de poliacrilamida 12%. Dois pontos imunorreativos são observados, um no centro do gel e outro a sua direita, os pesos moleculares são de aproximadamente 25 e 40 KDa respectivamente.

Podemos observar que as proteínas que se mostraram imunorreativas não foram coradas no mapa proteômico. A coloração não pode ser realizada nem por comassie e nem por prata, o aumento da concentração de proteínas na amostra também não permitiu a coloração destes pontos imunorreativos.

Western blot do fungo sonificado

Os testes de imunoreatividade para gel bidimensional de exoantígenos apresentaram pontos imunorreativos que não puderam ser observados quando o gel era corado por comassie e por prata, sendo assim impossível a identificação do local do gel a ser recortado para sequenciamento, desta forma mudamos o tipo de amostra para colônias do fungo sonificadas em tampão para gel bidimensional a fim de melhorar a amostra, de forma que os pontos

imunorreativos pudessem ser corados e possibilitar a visualização para o corte do gel, porém, a amostra apresentou problemas na focalização das fitas para gel bidimensional, pela falta de tempo decidimos usar estas amostras em gel unidimensional para recortar as bandas imunorreativas e então sequencia-las.

A figura 7 mostra o western blot do *Fonsecaea pedrosoi* sonicado em tampão para gel bidimensional, como descrito em material e métodos. A amostra foi aplicada em gel unidimensional e realizamos o western blot, observamos uma banda fortemente imunorreativa com aproximadamente 50 KDa.

A figura 8 mostra o western blot do mesmo material sonicado contra soro de animais após 30 dias de infecção, onde podemos observar provavelmente a mesma banda fortemente imunorreativa, próxima de 50KDa e mais outras duas bandas reativas próximas de 100 KDa.

Figura 7: western blot do *Fonsecaea pedrosoi* sonicado, apresenta uma banda fortemente imunorreativa com aproximadamente 50KDa.

Figura 8: Western blot do *Fonsecaea pedrosoi* sonicado, apresenta uma banda fortemente imunorreativa com aproximadamente 50KDa e outras duas bandas reativas com aproximadamente 100KDa

Sequenciamento proteico

As bandas que se mostraram imunorreativas no western blot do fungo sonicado foram cortadas do gel, digeridas e mandadas para análise no Instituto de ciências biológicas (ICB-USP) pela equipe de biomass. As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker), os resultados foram analisados através de Mascot para taxonomia fúngica e os dados foram considerados significantes quando, os peptídeos apresentaram pelo menos 57% de homologia em relação às proteínas com as quais foram comparadas. Enumeramos as bandas, sendo a 1 de maior peso molecular, ou seja maior que 100KDa, a 2 de aproximadamente 100KDa e a 3 de aproximadamente 50KDa. A análise da banda 1 não foi considerada significativa, pois, a homologia foi menor que 57% (quadro 1), as bandas 2 e 3 apresentaram homologia considerável apenas uma proteína, chamada *enoyl reductase*. Dados gerais nos quadros 2 e 3.

Accession	Mass	Score	Description
1. YME2 CHAGB	92829	47	Mitochondrial escape protein 2 OS=Chaetomium globosum (strain ATCC 6205 / CBS 148.51 / DSM 1962 / NBRC 6347 / NRRL 1970) GN=YME2 PE=3 SV=1
2. MCRI ASPCL	36131	37	NADH-cytochrome b5 reductase 2 OS=Aspergillus clavatus (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1) GN=mcrl PE=3 SV=1
3. TIM50 ASFPU	57271	36	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim50 OS=Neosartorya fumigata (strain ATCC MYA-4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100) GN=tim50 PE=3 SV=2
4. EFGM PICST	86265	36	Elongation factor G, mitochondrial OS=Scheffersomyces stipitis (strain ATCC 58785 / CBS 6054 / NBRC 10063 / NRRL Y-11545) GN=MEF1 PE=3 SV=2
5. RS16 CANGA	15804	34	40S ribosomal protein S16 OS=Candida glabrata (strain ATCC 2001 / CBS 138 / JCM 3761 / NBRC 0622 / NRRL Y-65) GN=RPS16 PE=3 SV=1
6. RPAB1 SCHPO	24014	33	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPAB1 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=rpab5 PE=1 SV=1
7. SUS1 YARLI	10332	32	Transcription and mRNA export factor SUS1 OS=Yarrowia lipolytica (strain CLIB 122 / E 150) GN=SUS1 PE=3 SV=1
8. MRH4 LODFL	67618	32	ATP-dependent RNA helicase MRH4, mitochondrial OS=Lodderomyces elongisporus (strain ATCC 11503 / CBS 2605 / JCM 1781 / NBRC 1676 / NRRL YB-4239) GN=MRH4 PE=3 SV=1
9. MRPPL PYRTR	67085	31	Probable Xaa-Pro aminopeptidase P OS=Pyrenophora tritici-repentis (strain Pt-1C-BFP) GN=ampp PE=3 SV=1
10. TF2A SCHPO	34732	31	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=tif211 PE=1 SV=1

Quadro 1: Análise do sequenciamento do conteúdo da banda 1, maior que 100KDa, os dados não foram significantes pela baixa homologia.

Accession	Mass	Score	Description
1. YN67 SCHPO	34732	61	Putative enoyl reductase C646.07c OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPBC646.07c PE=3 SV=1
2. ASA1 CANGA	54007	44	ASTRA-associated protein 1 OS=Candida glabrata (strain ATCC 2001 / CBS 138 / JCM 3761 / NBRC 0622 / NRRL Y-65) GN=ASA1 PE=3 SV=1
3. LIS12 PENCW	52228	43	Nuclear distribution protein nudF 2 OS=Penicillium chrysogenum (strain ATCC 28089 / DSM 1075 / Wisconsin 54-1255) GN=nudF-2 PE=3 SV=1
4. PEP2 NECH7	26979	43	Pea pathogenicity protein 2 OS=Nectria haematococca (strain 77-13-4 / ATCC MYA-4622 / FGSC 9596 / MPV1) GN=PEP2 PE=3 SV=1
5. PEP2 NECH4	26979	43	Pea pathogenicity protein 2 OS=Nectria haematococca GN=PEP2 PE=2 SV=2
6. PRP5 NEUCR	131507	41	Pre-mRNA-processing ATP-dependent RNA helicase prp-5 OS=Neurospora crassa (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=prp-5 PE=3 SV=1
7. U396 USTMA	65958	40	UPF0396 protein UM04995 OS=Ustilago maydis (strain 521 / FGSC 9021) GN=UM04995 PE=3 SV=1
8. CWC15 ASHGO	19847	38	Pre-mRNA-splicing factor CWC15 OS=Ashbya gossypii (strain ATCC 10895 / CBS 109.51 / FGSC 9923 / NRRL Y-1056) GN=CWC15 PE=3 SV=1
9. AIM9 VANPO	72778	38	Altered inheritance of mitochondria protein 9, mitochondrial OS=Vanderwaltozyma polyspora (strain ATCC 22028 / DSM 70294) GN=AIM9 PE=3 SV=1
10. AT2W YEAST	99142	38	Putative COX1/OX13 intron 2 protein OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=at2 PE=1 SV=2

Quadro 2: Análise do sequenciamento do conteúdo da banda 2, com aproximadamente 100KDa, os dados foram significantes apenas para primeira proteína enoyl reductase.

Accession	Mass	Score	Description
1. YN67 SCHPO	34732	67	Putative enoyl reductase C646.07c OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPBC646.07c PE=3 SV=1
2. BN11 YEAST	220107	47	Protein BN11 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=BN11 PE=1 SV=3
3. MCRI ASPCL	36131	44	NADH-cytochrome b5 reductase 2 OS=Aspergillus clavatus (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1) GN=mcrl PE=3 SV=1
4. DBP2 YEAS7	61233	44	ATP-dependent RNA helicase DBP2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain YJM789) GN=DBP2 PE=3 SV=1
5. RPOF CLAFU	108440	40	Probable DNA-directed RNA polymerase OS=Claviceps purpurea PE=3 SV=1
6. RM10 SCHPO	28316	39	54S ribosomal protein L10, mitochondrial OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=mrp110 PE=3 SV=2
7. PRF4 ENCCU	47576	38	26S protease regulatory subunit 4 homolog OS=Encephalitozoon cuniculi (strain GR-M1) GN=RPT2 PE=1 SV=1
8. PFD4 SCHPO	14237	38	Probable prefoldin subunit 4 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPAC227.05 PE=3 SV=1
9. YSH1 SCHPO	86335	38	Endoribonuclease ysh1 OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=ysh1 PE=3 SV=2
10. Y0223 YEAST	33142	37	Transmembrane protein YOR223W OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) GN=YOR223W PE=1 SV=1

Quadro 3: Análise do sequenciamento do conteúdo da banda 2, com aproximadamente 50KDa, os dados foram significantes apenas para primeira proteína enoyl reductase. Como dito anteriormente, as bandas 2 e 3 de aproximadamente 100KDa e 50KDa respectivamente, apresentaram homologia significativa para enoyl reductase como ilustrado nos quadros 4 e 5 a seguir.

YN67 SCHPO	Mass: 34732	Score: 61	Expect: 0.026	Matches: 19			
Putative enoyl reductase C646.07c OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPBC646.07c PE=3 SV=1							
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
754.3298	753.3225	753.5225	-0.2000	12	-	17	2 K.IRKLPK.S
842.4710	841.4637	842.4610	-0.9973	210	-	217	0 R.DLRPAGSK.K
1023.5313	1022.5241	1023.5827	-1.0586	288	-	295	1 R.KIMIPFFL.- + Oxidation (M)
1025.5406	1024.5334	1023.5827	0.9507	288	-	295	1 R.KIMIPFFL.- + Oxidation (M)
1051.6861	1050.6789	1050.5532	0.1257	143	-	151	0 R.FSLATMPLR.N + Oxidation (M)
1103.6030	1102.5957	1103.6411	-1.0454	2	-	11	2 M.SITLSSRGK.I
1165.5952	1164.5880	1164.5676	0.0204	279	-	287	1 K.EFPNYPGR.K
1179.6057	1178.5985	1178.5720	0.0265	134	-	142	0 R.EYESIFVHR.F
1234.6328	1233.6255	1234.6816	-1.0560	1	-	11	2 -.MSITLSSRGK.I
1320.6061	1319.5988	1319.6609	-0.0621	18	-	29	0 K.SLEFFLDGSIDK.L
1374.7085	1373.7012	1374.7660	-1.0648	63	-	75	1 R.KYGVGPGATIWVK.D
1447.7331	1446.7259	1447.8084	-1.0825	121	-	132	0 K.IAFVLVLMHFMK.R
1479.7535	1478.7462	1479.7982	-1.0520	121	-	132	0 K.IAFVLVLMHFMK.R + 2 Oxidation (M)
1553.7588	1552.7515	1552.8436	-0.0921	143	-	155	1 R.FSLATMPLR.NIPK.N + Oxidation (M)
1707.7801	1706.7729	1706.8839	-0.1111	47	-	62	0 R.FSTADGTTLLPNTTLR.K
1977.9017	1976.8944	1976.0691	0.8253	45	-	62	1 R.LRFSTADGTTLLPNTTLR.K
2211.0736	2210.0663	2211.1146	-1.0484	134	-	151	1 R.EYESIFVHRFSLATMPLR.N + Oxidation (M)
2399.0038	2397.9965	2397.2957	0.7007	63	-	84	2 R.KYGVGPGATIWVKDLGPQIGWR.T
2671.2479	2670.2406	2669.4695	0.7711	85	-	106	0 R.TVPMIEVLGPVILHFFILNKK.W
No match to: 724.4134, 760.3135, 870.5148, 890.4635, 918.4639, 996.5240, 1021.5384, 1033.5378, 1147.6125, 1173.6520, 1182.6120, 1194.6046, 1214.6497, 1217.6046, 1283.6837, 1307.6813, 1311.6768, 1330.6855, 1350.6902, 1365.6637, 1385.7072, 1427.7032, 1431.7019, 1475.7450, 1493.7357, 1582.7830, 1610.7921, 1710.8192, 1731.8722, 1791.7422, 2383.9331, 2526.2191,							

Quadro 4: Resultado do sequenciamento da banda 2, apresentando 61% de homologia com a proteínas enoyl reductase.

YN67_SCHPO	Mass: 34732	Score: 67	Expect: 0.0067	Matches: 12			
Putative enoyl reductase C646.07c OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPBC646.07c PE=3 SV=1							
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
842.4952	841.4879	842.4610	-0.9731	210	- 217	0	R.DLRPAGSK.K
1025.5644	1024.5572	1023.5827	0.9745	288	- 295	1	R.KIMIPFFL.- + Oxidation (M)
1051.7177	1050.7105	1050.5532	0.1573	143	- 151	0	R.FSLATMPLR.N + Oxidation (M)
1107.5846	1106.5773	1106.5866	-0.0093	1	- 10	1	-.MSITLSSRGK.K
1165.6241	1164.6168	1164.5676	0.0493	279	- 287	1	K.EFPNYPGRS.R
1179.6439	1178.6366	1178.5720	0.0646	134	- 142	0	R.EYESIFVHR.F
1234.7010	1233.6937	1234.6816	-0.9879	1	- 11	2	-.MSITLSSRGK.I
1320.6335	1319.6262	1319.6609	-0.0347	18	- 29	0	K.SLEFPLDGSIDK.L
1487.8013	1486.7940	1485.7787	1.0153	32	- 44	1	R.DEVSSVTRLPVER.L
1707.8290	1706.8217	1706.8839	-0.0622	47	- 62	0	R.FSTADGTTLLPNTTLR.K
2211.1702	2210.1630	2211.1146	-0.9517	134	- 151	1	R.EYESIFVHRFSLATMPLR.N + Oxidation (M)
2399.0962	2398.0889	2397.2957	0.7932	63	- 84	2	R.KYGVGPGATIWVKDLGPQIGWR.T
No match to: 703.3078, 811.4191, 870.5330, 1016.5895, 1101.5615, 1182.7066, 1283.7191, 1307.7172, 1330.7220, 1365.6979, 1373.7114, 1434.8018, 1444.8146, 1475.7967, 1493.7839, 1572.7527, 1638.9027, 1699.8728, 1710.8747, 1730.9340, 1765.8059, 1791.8148, 2153.1583, 2343.0679, 2384.0259, 2705.2414, 2717.1714, 2734.3347							

Quadro 5: Resultado do sequenciamento da banda 3, apresentando 67% de homologia com a proteínas enoyl reductase.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os estudos visando compreender a relação parasita hospedeiro no desenvolvimento das doenças abrangem tanto as respostas apresentadas pelo hospedeiro quanto à virulência do microrganismo, neste sentido caracterizar moléculas antigênicas dos microrganismos e compreender a resposta do hospedeiro, podem levar ao melhor entendimento da doença, o que é fundamental para o desenvolvimento de diagnóstico laboratorial e padronização de terapias que sejam eficazes, dois pontos de pouquíssimo entendimento na cromoblastomicose. Sendo assim nosso trabalho caracterizou proteínas imunogênicas oriundas de exoantígeno e de colônias sonicadas do *Fonsecaea pedrosoi*.

A produção de exoantígenos apresentou bandas mais definidas com o menor período de incubação, cinco dias. Foi realizado o western blot e o gel bidimensional a partir deste material, onde foi observado na figura 4, cerca de oito bandas imunorreativas, entre elas a banda de aproximadamente 50KDa. Esta banda provavelmente é a mesma observada no Western blot do fungo sonificado, onde se mostrou fortemente imunorreativa (figuras 7 e 8). Em 2003 VIDAL et al. descreveram uma alta sensibilidade e especificidade de soros de pacientes com cromoblastomicose contra uma banda de 54KDa apresentada no macerado do fungo. Ainda uma proteína de 50KDa foi descrita por Limongi et al. (2001) sugerindo a semelhança à lectina que reconhece ambos os hidratos de carbono e está ligada a adesão do *Fonsecaea pedrosoi* nos tecidos e células. A relação do trabalho discutido aqui e os trabalhos citados anteriormente é a proximidade dos pesos moleculares das bandas que se mostraram imunorreativas, podendo sugerir uma relação entre elas e a importância de proteínas com pesos moleculares por volta de 50KDa durante a cromoblastomicose experimental.

Estes resultados ainda abrem a proposta de desenvolver anticorpos monoclonais para estudar melhor a função imunogênica relacionada a estas substâncias. A imunização por anticorpos monoclonais pode ser a chave para uma melhor resposta contra o patógeno. Nosso grupo observou que camundongos tratados com anticorpos contra uma adesina de 70KDa do

Sporothrix schenki produz uma resposta protetora contra o patógeno (NASCIMENTO et al 2008). Ainda nesta linha outros trabalhos mostraram o efeito protetor contra candidíase em modelo animal através do uso de anticorpos monoclonais (XIN H & CLUTER 2011 e MORAQUES et al 2014). Isto nos reforça que o desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra estas proteínas é de grande importância para avaliar melhor a relação parasita hospedeiro na cromoblastomicose e estudar novas formas tratamento.

Ambos os western blot de exoantígeno e do fungo sonicado apresentaram imunorreatividade mais intensa para os soros de animais após 30 dias de infecção do que os soros de 15 dias de infecção. Neste caso de modelo murino, apresentando maior quantidade de imunoglobulinas no período mais crônico da doença. Interessantemente foi descrito que pacientes com maior cronicidade e conseqüentemente com a doença mais desenvolvida mostraram índices de imunoglobulinas (IgG, IgG 1, 2 e 3) mais altos que aqueles com menor tempo de infecção e com formas mais brandas da doença. (SILVA DE AZEVEDO et al 2014).

A princípio iríamos utilizar os exoantígenos em gel bidimensional para fazer a incisão das bandas que se mostrassem imunorreativas em teste de western blot e então sequenciar este material, porém as bandas imunorreativas foram justamente àquelas que não puderam ser coradas por Comassie, partimos então para coloração por prata, onde também não conseguimos identificar os pontos de interesse, decidimos concentrar ainda mais os exoantígenos. Com a alta concentração da amostra, as tiras immobline® passaram a não focalizar o material impossibilitando o desenvolvimento do gel bidimensional.

Mudamos a amostra de exoantígenos para o fungo total macerado com auxílio de nitrogênio, porém também não obtivemos sucesso nem mesmo para gel unidimensional.

Foi quando decidimos sonicar a amostra, já em tampão apropriado para gel bidimensional, para evitar a etapa de precipitação onde cogitamos estar o problema, novamente houveram impedimentos na etapa de focalização, porém sucesso no gel unidimensional, decidimos utilizar este material para identificar as bandas imunorreativas e sequenciar.

Os resultados do sequenciamento proteico apresentaram homologia de mais de 60% com enoyl redutase, uma enzima importante na síntese de ácidos graxos contidos na parede de microrganismos, esta enzima foi frequentemente descrita como participante para formação da estrutura da parede de inúmeras bactérias, e é hoje estudada como alvo para antibióticos (WANG Y & MA S 2013), a enoyl redutase foi descrita como participante na síntese da parede de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (TORKKO JM et al 2003). Isto sugere que a enoyl redutase pode ser estudada como alvo para terapias também na cromoblastomicose.

Em resumo observamos que o melhor período para obtenção de exoantígenos é após cinco dias de produção, diferentes materiais tais como exoantígenos e colônias de fungo sonificados podem apresentar a mesma banda imurreativa de aproximadamente 50KDa, nosso sequenciamento apresentou homologia de cerca de 60% do material imunorreativo para enoyl redutase, uma enzima ligada a síntese de ácidos graxo importantes para parede de microrganismos, também descrita em fungos. Nosso trabalho é importante como base para nortear estudos relacionados a diagnóstico e tratamento para cromoblastomicose.

CONCLUSÕES

- ✓ Colônias do *Fonsecaea pedrosoi* em caldo batata mantidas sob agitação constante a 37°C secretam inúmeras substâncias no meio, e quando aplicadas em gel mostram bandas mais definidas quando mantidas num período menor de incubação, cinco dias.
- ✓ Soros de camundongos infectados com *Fonsecaea pedrosoi* são reativos a exoantígenos e a colônias fúngicas sonicadas.
- ✓ O western blot do gel bidimensional mostra duas bandas majoritárias que foram coradas no gel.
- ✓ O western blot de colônias do *Fonsecaea pedrosoi* sonicadas apresentam três bandas imunorreativas sendo a de aproximadamente 50KDa a mais imunorreativa para soros de BALB/c infectados após 15 e 30 dias de infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLIZ P, FUKUSHIMA K, TAKIZAWA K, NIEDA N, MIYAJI M & NISHIMURA K (2003) Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. **J Clin Microbiol** 41: 873–876.
- ABLIZ P, FUKUSHIMA K, TAKIZAWA K & NISHIMURA K (2004) Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. **FEMS Immunol Med Microbiol** 40: 41–49.
- AHRENS J, GRAYBILL JR, ABISHAWL A, TIO FO & RINALDI MG (1989) Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. **Am J Trop Med Hyg** 40: 651–658.
- AL-HEDAITHY SS, JAMJOOM ZA & SAEED ES (1988) Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Saudi Arabia. **APMIS** 3: 94–100.
- ALINE ALVES DE LIMA SILVA, PAULO RICARDO CRIADO, RICARDO SPINA NUNES, WELLINGTON LUIZ FERREIRA DA SILVA, LUCIANE KANASHIRO-GALO, MARIA IRMA SEIXAS DUARTE, MIRIAN N. SOTTO, CARLA PAGLIARI
In Situ Immune Response in Human Chromoblastomycosis – A Possible Role for Regulatory and Th17 T Cells **Plos one**(2014)
- ALVIANO CS, FARBIARZ SR, DE SOUZA W, ANGLUSTER J & TRAVASSOS LR (1991) Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **J Gen Microbiol** 137: 837–844.
- ALVIANO CS, TRAVASSOS LR, ANGLUSTER J & DE SOUZA W (1992) Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia** 119: 17–23.
- ALVIANO CS, TRAVASSOS LR & SCHAUER R (1999) Sialic acids in fungi: **a minireview. Glycoconj J** 16: 545–554.
- ALVIANO DS, KNEIPP LF, LOPES AHCS, TRAVASSOS LR, MEYER- FERNANDES JR, RODRIGUES ML & ALVIANO CS (2003) Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. **Res Microbiol** 154: 689–695.
- ALVIANO DS, FRANZEN AJ, TRAVASSOS LR, HOLANDINO C, ROZENTAL S, EJZEMBERG R, ALVIANO CS & RODRIGUES ML (2004a) Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infect Immun** 72: 229–237.
- ALVIANO DS, RODRIGUES ML, ALMEIDA CA, SANTOS ALS, COUCEIRO JNSS, SOARES RMA, TRAVASSOS LR & ALVIANO CS (2004b) Differential expression of sialylglycoconjugates and sialidase activity in distinct morphological stages of *Fonsecaea pedrosoi*. **Arch Microbiol** 181: 278–286.
- ANDRADE TS, CASTRO LG, NUNES RS, GIMENES VM & CURY AE (2004) Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. **Mycoses** 47: 216–221.
- BARRETO-BERGTER E, PINTO MR & RODRIGUES ML (2004) Structure and biological functions of fungal cerebroside. **An Acad Bras Cienc** 76: 67–84.
- BITTENCOURT AL, LONDERO AT & ANDRADE JAF (1994) Cromoblastomiose auricular. Relato de um caso. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 36: 381–383.
- BLINOVA MI, YUDINTSEVA NM, KALMYKOVA NV, KUZMINYKH EV, YURLOVA NA, OVCHINNIKOVA OA & POTOKIN IL (2003) Effect of melanins from black yeast fungi on

proliferation and differentiation of cultivated human keratinocytes and fibroblasts. **Cell Biol Int** 27: 135–146.

BOCCA AL, BRITO PP, FIGUEIREDO F & TOSTA CE (2006) Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia** 161: 195–203.

BONIFAZ A, MARTINEZ-SOTO E, CARRASCO-GERARD E & PENICHE J (1997) Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery and combination of both. **Int J Dermatol** 36:542–547.

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

BONIFAZ A, PAREDES-SOLIS V & SAUL A (2004) Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. **Expert Opin Pharmacother** 5: 247–254.

BRANDT ME & WARNOCK DW (2003) Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infection caused by dematiaceous fungi. *J Chemother* 15: 36–47. Breitwieser GE (2006) Calcium sensing receptors and calcium oscillations: calcium as a first messenger. **Curr Top Dev Biol** 73:85–114.

BROWN DL (1993) The interpretation of tests of T-cell and natural killer cell function in man. *Clinical Aspects of Immunology* (Lachmann PJ, Peters SDK, Rosen FS & Walport MJ, eds), **Blackwell Sci. Publication, Boston** pp. 843–858.

CALIGIORNE RB, DE RESENDE MA, DIAS-NETO E, OLIVEIRA SC & AZEVEDO V (1999) Dematiaceous fungal pathogens: analysis of ribosomal DNA gene polymorphism by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Mycoses** 42: 609–614.

CALIGIORNE RB, LICINIO P, DUPONT J & DE HOOG GS (2005) Internal transcribed spacer rRNA gene-based phylogenetic reconstruction using algorithms with local and global sequence alignment for black yeasts and their relatives. **J Clin Microbiol** 43: 2816–2823.

CAPLAN RM (1968) Epidermoid carcinoma arising in extensive chromoblastomycosis. **Arch Dermatol** 97: 38–41.

CASOLARI C, ROSSIB T, BAGGIO G, COPPIC A, ZANDOMENEGHIC G, RUBERTOC AI, FARINAD C, FABIOA G, ZANCAE A & CASTELLIC M (2004) Interaction between saquinavir and antimycotic drugs on *C. albicans* and *C. neoformans* strains. **Pharmacol Res** 50:

CASSONE A, DE BERNARDIS F, TOROSANTUCCI A, TACCONELLI E, TUMBARELLO M & CAUDA R (1999) In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. **J Infect Dis** 180: 448–453.

CASTRO LG, PIMENTEL ER & LACAZ CS (2003) Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. **Int J Dermatol** 42: 408–412.

CHAO W & OLSON MS (1993) Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. **Biochem J** 292: 617–629.

CHASKES S & TYNDALL RL (1978) Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. **J Clin Microbiol** 7: 146–152.

COLLOPY-JUNIOR I, RODRIGUES ML, ALVIANO CS, TRAVASSOS LR & MEYER-FERNANDES JR (2005) Characterization of an ecto-ATPase activity in *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res** 5: 899–907.

COOMBS GH, GOLDBERG DE, KLEMBE M, BERRY C, KAY J & MOTTRAM JC (2001) Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. **Trends Parasitol** 17: 532–537.

COOPER BH (1985) *Phialophora verrucosa* and other chromoblastomycotic fungi. Fungal Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans (Szanişzlo PJ, ed), **Plenum Press, New York**.pp. 263–280.

CORBELLINI VA, SCROFERNEKER ML, CARISSIMI M & SANTOLIN LD (2006) Delayed-type hypersensitivity response to crude and fractionated antigens from *Fonsecaea pedrosoi* CMMI 1 grown in different culture media. **Mycopathologia** 162: 51–55.

CUNHA MM, FRANZEN AJ, ALVIANO DS, ZANARDI E, ALVIANO CS, DE SOUZA W & ROZENTAL S (2005) Inhibition of melanina synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. **Microsc Res Tech** 68: 377–384.

D'ACQUISTO F, CARNUCCIO R, D'ISCHIA M & MISURACA G (1995) 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid, a diffusible melanina precursor, is a potent stimulator of lipopolysaccharideinduced production of nitric oxide by J774 macrophages. **Life Sci** 57: PL401–PL406.

D'AVILA SC, PAGLIARI C & DUARTE MI (2003) The cell-mediated immune reactions in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlacion with different clinical forms of the disease. **Mycopathologia** 156: 51–60.

DASH C, KULKARNI A, DUNN B & RAO M (2003) Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. **Crit Ver Biochem Mol Biol** 38: 89–119.

DA SILVA AF, RODRIGUES ML, FARIAS SE, ALMEIDA IC, PINTO MR & BARRETO-BERGTER E (2004) Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are involved in the differentiation of conidia into mycelial cells. **FEBS Lett** 561: 137–143.

DE BEDOUT C, GOMEZ BL & RESTREPO A (1997) In vitro susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 39: 145–148.

DE HOOG GS, QUEIROZ-TELLES F, HAASE. (2000) Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Med Mycol** 38: 243–250.

DE HOOG GS, ATTILI-ANGELIS D, VICENTE VA, VAN DEN ENDE AH & QUEIROZ-TELLES F (2004) Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Med Mycol** 42: 405–416.

DEL POETA M, SCHELLWA & PERFECT JR (1997) In vitro antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds. Antimicrob Agents **Chemother** 41: 1835–1836.

DENNEHY KM & BROWN GD (2007) The role of the {beta}-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. J Leukoc Biol. Epub ahead of print, DOI:10.1189/jlb.1206753.

DEVELOUX M, DIENG MT, NDIAYE B, RAPHENON G & LEPERS JP (2006) Chromomycosis caused by *Exophiala spinifera* in Sahelian Africa. **Ann Dermatol Venereol** 133: 68–69.

DIXON DM & POLAK-WYSS A (1991) The medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses** 34: 1–18.

DOS SANTOS GON A & MINELLI L (2006) Melanoma in a longstanding lesion of chromoblastomycosis. **Int J Dermatol** 45: 1331–1333.

ELGART GW (1996) Chromoblastomycosis. **Dermatol Clin** 14: 77–83.

- EL-OBEID A, HASSIB A, PONTEN F & WESTERMARK B (2006) Effect of herbal melanin on IL-8: a possible role of Toll-like receptor 4 (TLR4). **Biochem Biophys Res Commun** 344: 1200–1206.
- ESPINEL-INGROFF A (1997) Clinical relevance of antifungal resistance. **Inf Dis Clin N Am** 11: 929–944.
- ESTERRE P & QUEIROZ-TELLES F (2006) Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Curr Opin Infect Dis** 19: 148–152.
- ESTERRE P, RAVISSE P & PEYROL S (1991) Immunopathologie de la lésion cutanée de chromomycose. **J Mycol Med** 1: 201.
- ESTERRE P, PEYROL S, SAINTE-MARIE D, PRADINAUD R & GRIMAUD JA (1993) Granulomatous reaction and tissue remodeling in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis. **Virchows Arch Pathol Anat** 422: 285–291.
- ESTERRE P, ANDRIANTSIMHAVANDY A, RAMARCEL ER & PECARRERE JL (1996) Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. **Am J Trop Med Hyg** 55: 45–47.
- ESTERRE P, JAHEVITRA M, RAMARCEL E & ANDRIANTSIMAHAVANDY A (1997) Evaluation of the ELISA technique for the diagnosis and the seroepidemiology of chromoblastomycosis. **J Mycol Med** 7: 137–141.
- ESTERRE P, JAHEVITRA M & ANDRIANTSIMAHAVANDY A (2000) Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. **Clin Diagn Lab Immunol** 7: 497–500.
- FARBIARZ SR, DE CARVALHO TU, ALVIANO C & DE SOUZA W (1990) Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. **J Med Vet Mycol** 28: 373–383.
- FARBIARZ SR, DE CARVALHO TU, ALVIANO CS & DE SOUZA W (1992) Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. **J Med Vet Mycol** 30: 265–273.
- FONDATI A, GALLO MG, ROMANO E & FONDEVILA D (2001) A case of feline phaeohyphomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **Vet Dermatol** 12: 297–301.
- FOSTER HM & HARRIS TJ (1987) Malignant change (squamous carcinoma) in chronic chromoblastomycosis. **Aust N Z J Surg** 57: 775–777.
- FRANZEN AJ, DE SOUZA W, FARINA M, ALVIANO CS & ROZENTAL S (1999) Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. **FEMS Microbiol Lett** 173: 395–402.
- FRANZEN AJ, CUNHA MM, BATISTA EJ, SEABRA SH, DE SOUZA W & ROZENTAL S (2006) Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4 triazol[3,4] benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. **Microsc Res Tech** 69: 729–37.
- FUCHS J & PECHER S (1992) Partial suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. **Mycopathologia** 119: 73–76.
- FUKUSHIRO R (1983) Chromoblastomycosis in Japan. **Int J Dermatol** 22: 221–229.
- GIMENES VMF, DE SOUZA MG, FERREIRA KS, MARQUES SG, GONÇALVES AG, SANTOS DVCL, SILVA CMP & ALMEIDA SR (2005) Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes Infect** 7: 708–713.

GOMEZ BL & NOSANCHUK JD (2003) Melanin and fungi. **Curr Opin Infect Dis** 16: 91–96.

GOMEZ BL, NOSANCHUK JD & DIEZ S (2001) Detection of melaninlike pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infect Immun** 69: 5760–5767.

GUPTA AK, TABORDA PR & SANZOVO AD (2002) Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. **Med Mycol** 40: 529–534.

HAKOMORI S (2003) Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. **Curr Opin Hematol** 10: 16–24.

HAMZA SH, MERCADO PJ, SKELTON HG & SMITH KJ (2003) An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. **J Cutan Pathol** 30: 340–343.

HAYAKAWA M, GHOSH EEB, DE SOUSA MGT, FERREIRA KS & ALMEIDA SR (2006) Phagocytosis, production of nitric oxide and proinflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous fungi that causes chromoblastomycosis. **Scand J Immunol** 64: 382–387.

HERNANDEZ-HERNANDEZ F, DE BIEVRE C, CAMACHO-ARROYO I, CERBON MA, DUPONT B & LOPEZ-MARTINEZ R (1995) Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* in vitro and characterization of progesterone receptors. **J Med Vet Mycol** 33: 235–239.

HIRA K, YAMADA H, TAKAHASHI YR & OGAWA H (2002) Successful treatment of chromoblastomycosis using carbon dioxide laser associated with topical heat applications. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 16: 273–275.

HIRSCH BC & JOHNSON WC (1984) Pathology of granulomatous diseases: mixed inflammatory granulomas. **Int J Dermatol** 23: 585–597.

HUBE B (2000) EXTRACELLULAR PEPTIDASES OF HUMAN PATHOGENIC FUNGI. **CONTRIB MICROBIOL** 5: 126–137. HUBE B & NAGLIK J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology** 147: 1997–2005.

H'OFLING-LIMA AL, GUARRO J, FREITAS D, GODOY P, GENE J, SOUZA LB, ZAROR L & ROMANO AC (2005) Clinical treatment of corneal infection due to *Fonsecaea pedrosoi*—case report. **Arq Bras Oftalmol** 68: 270–272.

HUNTER T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell** 80: 225–236.

IBRAHIM-GRANET O, DANGUET C, DENNETIERE B & BIEVRE C (1987) Etude en microscopie électronique à transmission des cellules fumigoides de *Cladosporium carrionii* obtenues à pH 2.5 et de *Fonsecaea pedrosoi* obtenues sur milieu de Francis. Comparaison aux cellules observées dans les lésions humaines. **Bull Soc Fr Mycol Med** 16: 257–262.

JOST BH, SONGER JG & BILLINGTON SJ (2001) Cloning, expression, and characterization of a neuraminidase gene from *Arcanobacterium pyogenes*. **Infect Immun** 69: 4430–4437.

KENNEDY AD, WILLMENT JA, DORWARD DW, WILLIAMS DL, BROWN GD & DELEO FR (2007) Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. **Eur J Immunol** 37: 467–478.

Kneipp LF, Palmeira VF, Pinheiro AAS, Alviano CS, Rozental S, Travassos LR & Meyer-Fernandes JR (2003) Phosphatase activity on the cell wall of *Fonsecaea pedrosoi*. **Med Mycol** 41: 469–477.

KNEIPP LF, RODRIGUES ML, HOLLANDINO C, ESTEVES FF, SOUTO-PADRON T, ALVIANO CS, TRAVASSOS LR & MEYER-FERNANDES JR (2004) Ecto-phosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. **Microbiology** 150: 3355–3362.

KOHL NE, EMINI EA, SCHLEIF WA, DAVIS LJ, HEIMBACH JC, DIXON RA, SCOLNICK EM & SIGAL IS (1988) Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. **Proc Natl Acad Sci USA** 85: 4686–4690.

KONDO M, HIRUMA M, NISHIOKA Y, MAYUZUMI N, MOCHIDA K, IKEDA S & OGAWA H (2005) A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. **Mycoses** 48: 221–225.

KWON-CHUNG KJ & BENNETT JE (1992) Chromoblastomycosis. *Medical Mycology* (Cann C & Hunsberger S, eds), **Lea and Febiger Inc., Philadelphia**, pp. 337–355.

LEVERY SB, MOMANY M, LINDSEY R, TOLEDO MS, SHAYMAN JA, FULLER M, BROOKS K, DOONG RL, STRAUS AH & TAKAHASHI HK (2002) Disruption of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc: ceramide glucosyltransferase strongly affects spore germination, cell cycle, and hyphal growth. **FEBS Lett** 525: 59–64.

LEVITZ SM (2004) Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes Infect** 6: 1351–1355.

LIMONGI CL, ROZENTAL S, ALVIANO CS & DE SOUZA W (1997) The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster ovary glycosylation mutant cells. **Mycopathologia** 138: 127–135.

LIMONGI CL, ALVIANO CS, DE SOUZA W & ROZENTAL S (2001) Isolation and partial characterization of an adhesin from *Fonsecaea pedrosoi*. **Med Mycol** 39: 429–437.

LIMONGI CL, DE SOUZA W & ROZENTAL S (2003) Protein kinase antagonists inhibit invasion of mammalian cells by *Fonsecaea pedrosoi*. **J Med Microbiol** 52: 201–209.

LOPES AHCS, DUTRA PML, RODRIGUES CO, SOARES MJ, ANGLUSTER J & CORDEIRO RSB (1997) Effect of platelet-activating factor on the process of cellular differentiation of *Herpetomonas muscarum*. *J Eukaryot Microbiol* 44: 321–325.

LOPEZ MARTINEZ R & MENDEZ TOVAR LJ (2007) Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 25: 188–194. Lupi O, Tying SK & McGinnis MR (2005) Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **J Am Acad Dermatol** 53: 931–951.

LYNCH DV, CAFFREY M, HOGAN JL & STEPONKUS PL (1992) Calorimetric and x-ray diffraction studies of rye glucocerebroside mesomorphism. **Biophys J** 61: 1289–1300.

MARKS MS & SEABRA MC (2001) The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2: 738–748.

MARQUES SG, SILVA CM, SALDANHA PC, REZENDE MA, VICENTE VA, QUEIROZ-TELLES F & COSTA JM (2006) *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi** 47: 305–311.

MATSUMOTO T & AJELLO L (1991) Dematiaceous fungi potentially pathogenic for humans and lower animals. *Handbook of Applied Mycology* (Arora DK, Ajello L & Mukerji KG, eds), **Marcel Decker Inc., New York**, pp. 117–161.

MCGINNIS M (1983) Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. **J Am Acad Dermatol** 8: 1–16.

- MEDNICK AJ, NOSANCHUK JD & CASADEVALL A (2005) Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infect Immun** 73:2012–2019.
- MENDES-GIANNINI MJS, SOARES CP, MONTEIRO DA SILVA JL & ANDREOTTI PF (2005) Interaction of pathogenic fungi with host-cells: molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol Med Microbiol** 45: 383–394.
- MENDOZA L, KARUPPAYIL SM & SZANISZLO PJ (1993) Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. **Mycoses** 36: 157–164.
- MEYER-FERNANDES JR (2002) Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a function. **Parasitol Int** 51: 299–303.
- MEYER-FERNANDES JR, DUTRA PML, RODRIGUES CO, SAAD-NEHME J & LOPES AHCS (1997) Mg²⁺-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. **Arch Biochem Biophys** 341: 40–46.
- MINOTTO R, BERNARDI CD, MALLMANN LF, EDELWEISS MI & SCROFERNEKER ML (2001) Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, **Brazil**. **J Am Dermatol** 44: 585–592.
- MONOD M, JATON-OGAY K & REICHARD U (1999) *Aspergillus fumigatus*-secreted proteases as antigenic molecules and virulence factors. **Contrib Microbiol** 2: 182–192.
- MONOD M, CAPOCCIA S, LECHENNE B, ZAUGG C, HOLDOM M & JOUSSON O (2002) Secreted proteases from pathogenic fungi. **Int J Med Microbiol** 292: 405–419.
- MORRIS-JONES R, YOUNGCHIM S & GOMEZ BL (2003) Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infect Immun** 71: 4026–4033.
- MORRIS-JONES R, GOMEZ BL & DIEZ S (2005) Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans* in vitro and during infection. **Infect Immun** 73: 6147–6150.
- NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ & HUBE B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl peptidases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev** 67: 400–428.
- NATHAN CF, SILVERSTEIN SC, BRUKNER LH & COHN ZA (1979) Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. **J Exp Med** 149: 100–113.
- NIMRICHTER L, BARRETO-BERGTER E, MENDONÇA-FILHO RR, KNEIPP LF, MAZZI MT, SALVE P, FARIAS SE, WAIT R, ALVIANO CS & RODRIGUES ML (2004) A monoclonal antibody to glucosylceramide inhibits the growth of *Fonsecaea pedrosoi* and enhances the antifungal action of mouse macrophages. **Microb Infect** 6: 657–665.
- NIMRICHTER L, CERQUEIRA MD, LEITÃO EA, MIRANDA K, NAKAYASU ES, ALMEIDA SR, ALMEIDA IC, ALVIANO CS, BARRETO-BERGTER E & RODRIGUES ML (2005) Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. **Infect Immun** 73: 7860–7868.
- NOBREGA JP, ROSEMBERG S, ADAMI AM, HEINS-VACCARI EM, LACAZ CS & DE BRITO (2003) *Fonsecaea pedrosoi* cerebral phaeohyphomycosis (“chromoblastomycosis”): first human culture-proven case reported in Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 45: 217–220.
- NOSANCHUK JD & CASADEVALL A (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiol** 5: 203–223.

NOSANCHUK JD & CASADEVALL A (2006) Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother** 50: 3519–3528.

NOSANCHUK JD, ROSAS AL & CASADEVALL A (1998) The antibody response to fungal melanin in mice. **J Immunol** 160:6026–6031.

NOSANCHUK JD, GOMEZ BL & YOUNGCHIM S (2002) Histoplasma capsulatum synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. **Infect Immun** 70: 5124–5131.

NOSANCHUK JD, VAN DUIN D, MANDAL P, AISEN P, LEGENDRE AM & CASADEVALL A (2004) Blastomyces dermatitidis produces melanin in vitro and during infection. **FEMS Microbiol Lett** 239: 187–193.

ODA LM, KUBELKA CF, ALVIANO CS & TRAVASSOS LR (1983) Ingestion of yeast forms of Sporothrix schenckii by mouse peritoneal macrophages. **Infect Immun** 39: 497–504.

OSHEROV N & MAY GS (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS Microbiol Lett** 199: 153–160.

PALELLA FJ JR, DELANEY KM, MOORMAN AC, LOVELESS MO, FUHRER J, SATTEN GA, ASCHMAN DJ & HOLMBERG SD (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient study investigation. **N Engl J Med** 338: 853–860.

PALMEIRA VF (2006) Peptidases secretadas por conídios de Fonsecaea pedrosoi: efeito de inibidores proteolíticos no crescimento, ultraestrutura e interação com hospedeiro. PhD Thesis, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

PALMEIRA VF, KNEIPP LF, ALVIANO CS & SANTOS ALS (2006) Secretory aspartyl peptidase from mycelia of Fonsecaea pedrosoi: effect of HIV peptidase inhibitors. **Res Microbiol** 157: 819–826.

PALMEIRA VF, KNEIPP LF, ALVIANO CS & SANTOS ALS (2006) The major chromoblastomycosis fungal pathogen Fonsecaea pedrosoi extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. **FEMS Immunol Med Microbiol** 46: 21–29.

PEREZ-BLANCO M, HERNANDEZ VALLES R, GARCIA-HUMBRIA L & YEGRES F (2006) Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. **MedMycol** 44:467–471.

PINTO MR, RODRIGUES ML, TRAVASSOS LR, HAIDO RM, WAIT R & BARRETO-BERGTER E (2002) Characterization of glucosylceramides in Pseudallescheria boydii and their involvement in fungal differentiation. **Glycobiology** 12: 251–260.

POIRRIEZ J, BREUILLARD F, FRANCOIS N, FRUIT J, SENDID B, GROSS S & DEI-CAS E (2000) A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. **Am J Trop Med Hyg** 63: 61–63.

POZIO E & MORALES MA (2005) The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. **Trends Parasitol** 21: 58–63.

QUEVEDO WC, FITZPATRICK TB, SZABO G & JIMBOW K (1987) Biology of melanocytes. **Dermatology in General Medicine** (Fitzpatrick TB, ed), pp. 224–251.

MCGRAW-HILL, NEW YORK. RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS & DESHPANDE VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev** 62: 597–635.

RAPOSO G & MARKS MS (2002) THE DARK SIDE OF LYSOSOME-RELATED ORGANELLES: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. **Traffic** 3: 237–248.

RAST DM, BAUMGARTNER D, MAYER C & HOLLENSTEIN GO (2003) Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry** 64: 339–366.

Reiss E & Nikerson WJ (1974) Control of dimorphism in *Phialophora verrucosa*. *Sabouraudia* 12: 202–213.

RHODES JC, POLACHEK I & KWON-CHUNG KJ (1982) Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun** 36: 1175–1184.

RICHARD-BLUM S, HARTMANN DJ & ESTERRE P (1998) Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. **Eur J Clin Invest** 28: 748–754.

RIPPON JW (1988) Chromoblastomycosis. Medical Mycology (Sauders WB, ed), **Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia** pp. 276–296.

Rittershaus PC, Kechichian TB, Allegood JC, Merrill AH Jr, Hennig M, Luberto C & Del Poeta M (2006) Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* 116: 1651–1659.

RODRIGUES CO, DUTRA PML, SOUTO-PADRÃO T, CORDEIRO RSB & LOPES AHCS (1996) Effect of platelet-activating factor on cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 735–740.

RODRIGUES ML, ROZENTAL S, COCEIRO JNSS, ANGLUSTER J, ALVIANO CS & TRAVASSOS LR (1997) Identification of N-acetylneuraminic acid and its 9-O-acetylated derivative on the cell surface of *Cryptococcus neoformans*: influence on fungal phagocytosis. **Infect Immun** 65: 4937–4942.

RODRIGUES ML, TRAVASSOS LR, MIRANDA KR, FRANZEN AJ, ROZENTAL S, DE SOUZA W, ALVIANO CS & BARRETO-BERGTER E (2000) Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. **Infect Immun** 68: 7049–7060.

RODRIGUES ML, DOS REIS FCG, PUCCIA R, TRAVASSOS LR & ALVIANO CS (2003) Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine peptidase. **Microb Pathogen** 34: 65–71.

RODRIGUES ML, NIMRICHTER L, OLIVEIRA DL, FRASES S, MIRANDA K, ZARAGOZA O, ALVAREZ M, NAKOUZI A, FELDMESSER M & CASADEVALL A (2007) Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell* 6: 48–59.

ROGGENTIN P, KRUG G, SCHAUER R & BRASCH J (1999) Lack of sialidase activity in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses** 42: 33–36.

ROMERO-MARTINEZ R, WHEELER M, GUERRERO-PLATA A, RICO G & TORRES-GUERRERO H (2000) Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infect Immun** 68: 3696–3703.

- ROSAS AL, NOSANCHUK JD, FELDMESSER M, COX GM, MCDADE HC & CASADEVALL A (2000) Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. **Infect Immun** 68: 2845–2853.
- ROSAS AL, NOSANCHUK JD & CASADEVALL A (2001) Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun** 69: 3410–3412.
- ROSEN T & OVERHOLT M (1996) Persistent viability of the medlar body. **Int J Dermatol** 35: 96–98.
- ROYAL GC JR, NANDEDKAR AK, SAMPSON CC & FAGGETT T (1984) Neuraminidase production by *Candida albicans*. **J Natl Med Assoc** 76: 143–145.
- ROZENTAL S, ALVIANO CS & DE SOUZA W (1994) The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. **Mycopathologia** 126: 85–91.
- ROZENTAL S, ALVIANO CS & DE SOUZA W (1996) Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. **J Med Vet Mycol** 34: 323–330.
- SABERI H, KASHFI A, HAMIDI S, TABATABAI SA & MANSOURI P (2003) Cerebral phaeohyphomycosis masquerading as a parafalcian mass: case report. **Surg Neurol** 60: 354–359.
- SALGADO CG, SILVA JP, DINIZ JAP, SILVA MB, COSTA PF, TEIXEIRA C & SALGADO UI (2004) Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 46: 33–36.
- SALGADO CG, SILVA JP, SILVA MB, COSTA PF & SALGADO UI (2005) Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. **Lancet Infect Dis** 5:528.
- SANTOS ALS & SOARES RMA (2005) *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine peptidase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. **FEMS IMMUNOL MED MICROBIOL** 43: 13–20.
- SANTOS ALS, CARVALHO IM, SILVA BA, PORTELA MB, ALVIANO CS & SOARES RMA (2006) Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. **FEMS Immunol Med Microbiol** 46: 209–220.
- SANTOSH V, KHANNA N, SHANKAR SK, PAL L, DAS S, CHANDRAMUKHI A & KOLLURI VR (1995) Primary mycotic abscess of the brain caused by *Fonsecaea pedrosoi*. **Case report. J Neurosurg** 82:128–130.
- SCHAUER R (1982) Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 40: 131–234.
- SCHAUER R & KAMERLING JP (1997) Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. *Glycoproteins, II* (Montreuil J, Vliegthart JFG & Schachter H, eds), **Elsevier**, pp. 243–402. Amsterdam.
- SEIJI M, SHIMAO K, BIRBECK MSC & FITSPATRICK TB (1963) Subcellular localization of melanin biosynthesis. **Ann NY Acad Sci** 100: 497–533.
- SEPKOWITZ KA (1998) Effect of HAART on natural history of AIDS-related opportunistic disorders. **Lancet** 351: 228–230.

SILVA CL & EKIZLERIAN S (1985) Granulomatous reactions induced by lipids extracted from *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compactum*, *Cladosporium carrionii* and *Phialophora verrucosum*. **J General Microbiol** 131: 187–194.

SILVA JP, DE SOUZA W & ROZENTAL S (1999) Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). **Mycopathologia** 143: 171–175.

SILVA JP, ALVIANO DS, ALVIANO CS, DE SOUZA W, TRAVASSOS LR, DINIZ JAP & ROZENTAL S (2002) Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. **FEMS Immunol Med Microbiol** 33: 63–69.

SILVA MR, FERNANDES OF, COSTA CR, CHAUL A, MORGADO LF, FLEURY-JUNIOR LF & COSTA MB (2005) Subcutaneous phaeohyphomycosis by *Exophiala jeanselmei* in a cardiac transplant recipient. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 47: 55–57.

SILVA BA, PINTO MR, SOARES RMA, BARRETO-BERGTER E & SANTOS ALS (2006) *Pseudallescheria boydii* releases metallopeptidases capable to cleave several proteinaceous compounds. **Res Microbiol** 157: 425–432.

SILVA BA, SANTOS ALS, BARRETO-BERGTER E & PINTO MR (2006) Extracellular peptidase in the fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. **Curr Microbiol** 53: 18–22.

SILVA JP, SILVA MB, SALGADO UI, DINIZ JA, ROZENTAL S & SALGADO CG (2007) Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. **FEMS Immunol Med Microbiol** 50: 104–111.

SINGH N (2000) Infections in solid organ transplant recipients. **Curr Opin Infect Dis** 13: 343–347.

SOTTO MN, DE BRITO T, SILVA AMG, VIDAL M & MARTINS CASTRO LG (2004) Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. **J Cutan Pathol** 31: 14–18.

SOUZA ET, SILVA-FILHO FC, DE SOUZA W, ALVIANO CS, ANGLUSTER J & TRAVASSOS LR (1986) Identification of sialic acids on the cell surface of hyphae and conidia of the human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. **J Med Vet Mycol** 24: 145–153.

STAHL PD, RODMAN JS, MILLER MJ & SCHLESINGER PH (1978) Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA** 75: 1399–1403.

STANLEY P (1984) Glycosylation mutants of animal cells. **Annu Rev Genet** 18: 525–552.

STANLEY P (1985) Membrane mutants of animal cells: rapid identification of those with primary defect in glycosylation. **Mol Cell Biol** 5: 923–929.

SZANISZLO PJ, HSIEH PH & MARLOWE JD (1976) Induction and ultrastructure of the multicellular (sclerotic) morphology in *Phialophora dermatitidis*. **Mycologia** 68: 117–130.

SZANISZLO PJ, JACOBS CW & GEIS PA (1983) Dimorphism: morphological and biochemical aspects. *Fungi Pathogenic for Humans and Animals. Part A*. **Biology** (Howard DH, ed), pp. 323–426. Marcel Dekker, New York.

TANABE H, KAWASAKI M, MOCHIZUKI T & ISHIZAKI H (2004) Species identification and strain typing of *Fonsecaea pedrosoi* using ribosomal RNA gene internal transcribed spacer regions. **Jpn J Med Mycol** 45: 105–112.

TEIXEIRA DE SOUSA MG, GHOSH EEB & ALMEIDA SR (2006) Absence of CD41T Cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. **Scand J Immunol** 64: 595–600.

THEVISSSEN K, WARNECKE DC, FRANCOIS IE, LEIPELT M, HEINZ E, OTT C, ZAHNINGER U, THOMMA BP, FERKET KK & CAMMUE BP (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. **J Biol Chem** 279: 3900–3905.

THEVISSSEN K, FRANCOIS IE, AERTS AM & CAMMUE BP (2005) Fungal sphingolipids as targets for the development of selective antifungal therapeutics. **Curr Drug Targets** 6: 923–928.

TIETZE C, SCHLESINGER P & STAHL P (1980) Cloroquine and ammonium ion inhibits receptor-mediated endocytosis of mannose-glycoconjugates by macrophages: apparent inhibition of receptor recycling. **Biochem Biophys Res Commun** 93: 1–8.

TOLEDO MS, LEVERY SB, SUZUKI E, STRAUS AH & TAKAHASHI HK (2001) Characterization of cerebrosides from the thermally dimorphic mycopathogen *Histoplasma capsulatum*: expression of 2-hydroxy fatty N-acyl (E)-Delta(3)-unsaturation correlates with the yeast-mycelium phase transition. **Glycobiology** 11: 113–124.

TOMSON N, ABDULLAH A & MAHESHWARI MB (2006) Chromomycosis caused by *Exophiala spinifera*. **Clin Exp Dermatol** 31: 239–241.

TSAI HF, FUJII I & WATANABE A (2001) Pentaketide melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* requires chain-length shortening of a heptaketide precursor. **J Biol Chem** 276: 29292–29298.

TSUNETO LT, ARCE-GOMEZ B, PETZL-ERLER ML & QUEIROZ-TELLES F (1989) HLA-A29 and genetic susceptibility to chromoblastomycosis. **J Med Vet Mycol** 27: 181–185.

UCHIDA Y, TSUKADA Y & SUGIMORI T (1974) Production of microbial neuraminidases induced by colominic acid. **Biochim Biophys Acta** 350: 425–431.

URIBE F, ZULUAGA AI, LEONW & RESTREPO A (1989) Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 105: 1–6. van Burik JAH & Magee PT (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. **Annu Rev Microbiol** 55: 743–772.

VERSTREPEN KJ & KLIS FM (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* 60: 5–15. Wallukat G (2002) The beta-adrenergic receptors. **Herz** 27: 683–690.

WANG Y1, MA S. Recent Advances in Inhibitors of Bacterial Fatty Acid Synthesis Type II (FASII) System Enzymes as Potential Antibacterial Agents. **ChemMedChem**. 2013 Jul 24. doi: 10.1002/cmdc.201300209.

WASYLNKA JA, SIMMER MI & MOORE MM (2001) Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. **Microbiology** 147: 869–877.

ZIGANSHIN AU, ZIGANSHINA LE, KING BF & BURNSTOCK G (1995) Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and the inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. 429: 412–418.

TORKKO JM1, KOIVURANTA KT, KASTANIOTIS AJ, AIRENNE TT, GLUMOFF T, ILVES M, HARTIG A, GURVITZ A, HILTUNEN JK. *Candida tropicalis* expresses two mitochondrial 2-enoyl thioester reductases that are able to form both homodimers and heterodimers. **J Biol Chem**. 2003 Oct 17;278(42):41213-20. Epub 2003 Jul 30.

MARIA DA GLÓRIA SOUSA, DELYTH M. REID,1 EDINA SCHWEIGHOFFER,2 VICTOR TYBULEWICZ,2 JUˆ RGEN RULAND,3,4 JEAN LANGHORNE, SHO YAMASAKI,5 PHILIP R. TAYLOR, SANDRO R. ALMEIDA, AND GORDON D. BROWN Restoration of Pattern Recognition Receptor Costimulation to Treat Chromoblastomycosis, a Chronic Fungal Infection of the Skin. **Cell** 2011.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/41/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Identificação e caracterização de proteínas imunogênicas de exoantígenos do fungo *Fonsecaea pedrosoi*." (Protocolo CEUA/FCF/361), de responsabilidade da pesquisadora **Pollyanna Christina da Silva Martins** sob a orientação do Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 04 de junho de 2012.

São Paulo, 06 de junho de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP