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

**Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Fonsecaea*
pedrosoi isoladas de pacientes com cromoblastomicose**

Tânia Sueli de Andrade

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Assoc. Arlete Emily Cury

Co-orientadora:
Prof^a. Assoc. Rosario D. C. Hirata

São Paulo
2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010393

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Andrade, Tânia Sueli de
A553c Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose / Tânia Sueli de Andrade. -- São Paulo, 2004.
132p

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Cury, Arlete Emily

Co-orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

1. Micologia médica 2. *Fonsecaea pedrosoi* : Micologia
3. Cromoblastomicose : Medicina I. T. II. Cury, Arlete Emily, orientador III. Hirata, Rosario Dominguez Crespo, co-orientador.

616.969 CDD

Tânia Sueli de Andrade

Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Assoc. Arlete Emily Cury
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 15 de outubro de 2004.

À Deus

Ao meu grande amor, Ricardo

Aos meus pais, Salete e Anísio, meu irmão Fábio, minha amiga Camila e
minha avó Anna,

Pelo apoio, amor e carinho que sempre me dedicaram.

Agradecimentos

Ao Ricardo, pela paciência, colaboração e carinho.

À Prof^a. Arlete Emily Cury, mentora, cujos conhecimentos, sugestões, ensinamentos e orientação tornaram possível o presente trabalho e, também, pela paciência amizade e carinho.

À Profa. Rosario D. C. Hirata, pela dedicação, paciência, ensinamentos que tornaram possível o presente trabalho e também pela amizade e carinho dedicados durante esses anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Josep Guarro e toda sua equipe do laboratório de microbiologia da unidade de micologia da Universidade de Réus - Espanha, que me acolheram com carinho e tornaram possível parte da execução deste trabalho.

Ao prof. Mário Hirata pelo apoio, carinho e disponibilidade com que me recebeu em seu laboratório.

Ao prof. Edson Durigon e equipe pelo apoio e colaboração na execução de alguns trabalhos.

A amiga Sonia Regina Caramico Buratto do laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, pela valiosa colaboração na execução dos trabalhos, aprendizado, apoio, amizade e carinho com que me acolheu durante todos esses anos.

À amiga Viviane do laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, pelo apoio e valiosa colaboração na execução dos trabalhos e amizade.

À Dr^a. Marcia de Souza Carvalho Melhem, amiga, pelo incentivo, aprendizado, colaboração, amizade e carinho, que me acompanham desde o início da minha carreira científica.

Aos amigos e colaboradores do Instituto Adolfo Lutz, Sandra, Walderez, Andrez, e toda a brilhante equipe de micologistas desta seção, pelo apoio, colaboração e carinho com que me recebem durante todos estes anos.

À equipe da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da USP, em especial ao Dr. Luiz Guilherme Martins de Castro e Ricardo Spina Nunes, pela valiosa colaboração nos trabalhos, apoio e amizade.

Ao Prof. Carlos da Silva Lacaz *in memoriam*, pela colaboração no início desse trabalho e acima de tudo pelo grande legado deixado em sua jornada micológica com amor e dedicação admiráveis.

À equipe do laboratório de micologia do Instituto de Medicina Tropical, Mônica, Elisabeth e Natalina, pelo apoio e colaboração em diversas fases deste trabalho.

À Profª. e amiga Maria Magali S. R. Soares, pela iniciação no mundo dos fungos, do qual não quero mais sair.

Aos colegas do laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, Karen, Rosana, Eliver, Glória, Márcia e Marina pelo apoio e amizade.

A todos os colegas do laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, em especial a Dra. Roselene, pela paciência e dedicação no ensinamento das práticas de biologia molecular.

Ao Dr. Paulo R. Cunha e equipe pelo apoio e amizade.

Ao prof. Valderéz Gambale pelo apoio e amizade.

A amiga Ana Lúcia Bergamasco pelo apoio e amizade.

As secretárias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Marcia, Elaine e também ao Jorge, pela orientação, paciência e amizade.

As todos os professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
I RESUMO	
II INTRODUÇÃO	01
III OBJETIVOS	27
IV MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1. Cepas	30
2. Estudos morfológicos macroscópicos e microscópicos.....	36
3. Extração do DNA genômico.....	37
4. Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico.....	37
5. Identificação molecular de <i>F. pedrosoi</i> por PCR – duplex	38
6. Genotipagem das cepas de <i>F. pedrosoi</i> por RAPD e RFLP	41
6.1. Genotipagem por RAPD.....	41
6.2. Genotipagem por RFLP	42
7. Identificação molecular de <i>F. pedrosoi</i> por sequenciamento de DNA...	43
8. Antifungigrama pela técnica de diluição em ágar	45
8.1. Diluições do antifúngico	45
8.2. Inóculo	46
8.3. Execução do teste de concentração inibitória mínima.....	47
9. Análise dos resultados	48
V RESULTADOS	49
1. Estudos fenotípicos macroscópicos.....	50
2. Estudos fenotípicos microscópicos.....	50
3. Identificação molecular da <i>F. pedrosoi</i> por PCR – duplex	55
3.1. Avaliação e quantificação do DNA genômico	55
3.2. Padronização da PCR individual	56

3.3. Padronização da PCR duplex	58
3.4. Estudos de identificação molecular por PCR – duplex	63
4. Genoipagem das cepas de <i>F. pedrosoi</i> por RAPD e RFLP.....	68
4.1. ERIC – PCR	68
4.2. REP – PCR.....	71
4.3. PCR – RFLP.....	75
5. Identificação molecular de <i>F. pedrosoi</i> por sequenciamento de DNA...	85
6. Antifungigrama pela técnica de diluição em ágar.....	90
VI DISCUSSÃO	94
VII CONCLUSÃO	105
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
IX ANEXO 1	133
X ANEXO 2	134

I RESUMO

Andrade, T. S. caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose. São Paulo, 2004. 132p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

A cromoblastomicose é uma infecção subcutânea causada por fungos demácios, como a *Fonsecaea pedrosoi*. O pleomorfismo e a similaridade entre gêneros e espécies, ocorrências características dessa classe de fungos, podem interferir na identificação morfológica. Vários esquemas terapêuticos para o tratamento da cromoblastomicose já foram utilizados, mas até o momento não existe uma terapia padrão. Em alguns casos, a correta identificação do agente etiológico pode auxiliar na indicação terapêutica, pois algumas espécies respondem melhor a determinados tratamentos do que outras.

Com o objetivo de auxiliar o diagnóstico laboratorial da cromoblastomicose, foi desenvolvido um teste para identificação molecular e detecção rápida da *Fonsecaea pedrosoi*, empregando-se a metodologia da PCR-*duplex* com iniciadores específicos para a *F. pedrosoi* e universais para fungos. Esse teste mostrou-se altamente específico para a *F. pedrosoi* e, portanto, indicado para ser utilizado na identificação molecular desse fungo. Também com o intuito de avaliar as características fenotípicas e genotípicas de cepas de *F. pedrosoi* oriundas de pacientes com vários anos de infecção, 47 amostras, isoladas de modo seqüencial, de 11 pacientes foram analisadas por ERIC-PCR, REP-PCR, RFLP e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do complexo rDNA. Por ERIC-PCR e REP-PCR foram detectados 15 genótipos e, por RFLP, 6 genótipos. As técnicas combinadas geraram 20 genótipos. Com

base nos resultados de sequenciamento, foi possível detectar dois tipos de sequência que apresentaram 97% de similaridade sendo homólogas as seqüências de *Fonsecaea pedrosoi* disponíveis em bancos gênicos. De modo geral, pode-se observar que a espécie *F. pedrosoi* apresenta variação molecular e genética entre diferentes cepas e mesmo entre as cepas isoladas de um mesmo paciente.

Andrade, T. S. Phenotypic and genotypic characterization of *Fonsecaea pedrosoi* strains isolated from patients with chromoblastomycosis. São Paulo, 2004. 132p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

The chromoblastomycosis is a subcutaneous infection caused by dematiaceous fungi, such as the *Fonsecaea pedrosoi*. The pleomorfism and the similarity between genus and species that are characteristics of these fungi, can interfere on the morphologic identification. Several therapeutic regimens for the chromoblastomycosis treatment have already been used, but till now there is not any standard therapy. In some cases, the correct identification of the etiologic agent can help in the treatment because some species have a better response to some treatments than to others.

A test was developed to the molecular identification and quick detection of the *Fonsecaea pedrosoi* with the purpose of helping the laboratorial diagnoses of the chromoblastomycosis, using the PCR – duplex methodology with specific oligonucleotide primers for the *Fonsecaea pedrosoi* and universals for general fungi. This test is highly specific and sensible for the *Fonsecaea pedrosoi* and so, it is indicated for the molecular identification of this fungus.

Another purpose of this study was to evaluate phenotypic and genotypic characteristics of the *Fonsecaea pedrosoi* strains isolated from patients with a long-term infection. For this reason 47 samples, isolated sequentially, from 11 patients were analyzed by ERIC-PCR, REP-PCR, RFLP and sequencing of the region ITS1 – 5.8S - ITS2 of the rDNA complex. Fifteen genotypes were found

by ERIC-PCR and REP-PCR and six genotypes were found by RFLP, the combination of the methods showed twenty genotypes.

Based on the results of sequencing it was possible to detect 2 types sequences that presented 97% of similarity and the available *Fonsecaea pedrosoi* sequences in gene banks were homological.

In general, the *Fonsecaea pedrosoi* strains presents a molecular and genetic variation between different strains and even between isolated strains of the same patients.

II - INTRODUÇÃO

Introdução

1. Fisiopatologia e epidemiologia da cromoblastomicose

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea de evolução lenta, crônica, adquirida através de ferimentos com plantas ou qualquer corpo estranho que veicule um dos diversos agentes etiológicos. Estes usualmente se encontram dispersos na natureza, e já foram recuperados do solo e de matéria orgânica em decomposição em todo mundo (AL-Doory, 1972; Lacaz *et al*, 1991; Schell *et al*, 1999).

A distribuição geográfica da cromoblastomicose está relacionada ao clima, sendo mais freqüente em países de clima tropical e subtropical. No Brasil, prevalece nos Estados das regiões norte, nordeste e sul (Londero e Ramos, 1976; Londero e Ramos, 1989; Silva *et al*, 1991; Silva *et al*, 1992; Silva *et al*, 1998; Silva *et al*, 1999; Queiroz-Telles, 1997). Recentemente, (Piveta *et al*, 2002) o Brasil foi considerado o primeiro país em incidência dessa micose, com 1,6 casos/10.000 habitantes, ultrapassando o número de casos divulgados em Madagascar (1,2 casos/10.000 habitantes), anteriormente referido como o primeiro país em incidência dessa micose (Esterre *et al*, 1996).

A incidência da cromoblastomicose é maior em indivíduos do sexo masculino, na faixa etária de 31 a 40 anos (A-Doory, 1972; Lacaz *et al*, 1991; Castro, 1998). Além disso, devido a sua predominância em áreas rurais pode ser considerada doença ocupacional. No Nordeste do Brasil, a exposição de trabalhadores rurais ao babaçu (*Orbignya phalerata martins*) foi relacionada ao aparecimento da doença em alguns pacientes, dos quais foi isolada a *Fonsecaea pedrosoi* (Silva *et al*, 1995). Essa espécie foi recentemente detectada, por cultura e microscopia eletrônica, em uma planta conhecida na

região Norte como "Maria fecha a porta" e na região Sudeste como "dormideira" (*Mimosa pudica*) (Salgado *et al*, 2004). Os autores, também isolaram esse fungo de uma lesão produzida pela referida planta em uma mulher.

Na Venezuela, pacientes com cromoblastomicose por *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii* relataram que se feriram com cactáceas (*Ritterocereus griseus* e *R. deficiens*), plantas comumente encontradas na região endêmica desse país e das quais o fungo já foi isolado (Zeppenfeldt *et al*, 1994).

A doença tem início quando o fungo penetra o tecido cutâneo e origina um processo de infecção micótica com erupção de pápulas, verrugas ou nódulos que posteriormente podem ulcerar. A localização é, de modo geral, podal, mas pode ocorrer também em pernas, nádegas e, com menos frequência, nas mãos e braços. No entanto, já foram observados casos de infecção na região auricular, nasal e em outras partes do corpo (A-Doory, 1972; Lacaz *et al*, 1991).

A doença não compromete o estado geral dos pacientes, mas com o passar dos anos pode incapacitar o indivíduo para o trabalho e o convívio social. Alguns autores têm relatado casos em associação com hanseníase, micetoma e câncer (A-Doory, 1972; Silva *et al*, 1994).

Embora diversos pesquisadores tenham classificado as diferentes formas de lesão verrucosa como nodosa, confluyente e ulcerosa, observa-se que, de modo geral, o início e a evolução de qualquer delas são os mesmos (A-Doory, 1972; Lacaz *et al*, 1991). Inicialmente, no local da inoculação forma-se uma pequena pápula elevada, eritematóide e não pruriginosa, podendo desaparecer espontaneamente. O desenvolvimento dessa pequena alteração pode ser lento, formando-se, então, placas verrucosas eritematosas. Com

freqüência, formam-se nódulos com centro avermelhado ou acinzentado, duros, com destacada projeção sobre a superfície da pele. A disposição e a configuração dos mesmos conferem ao processo clínico aspecto de “*couve-flor*”, geralmente pontilhada de elementos negros (*black dots*). Com freqüência, essas lesões estão associadas às infecções bacterianas, secundárias (A-Doory, 1972; Rippon, 1988).

Clinicamente, algumas formas de cromoblastomicose podem ser confundidas com várias doenças como blastomicose, sífilis terciária, tuberculose verrucosa da pele, micetoma, leishmaniose, algumas formas de candidíase mucocutânea crônica, esporotricose, lupus eritematoso e hanseníase (A-Doory, 1972; Rippon, 1988; Lacaz *et al*, 1991). Em todos os casos, a simples demonstração do fungo no exame direto do material da lesão e em culturas estabelecem o diagnóstico (McGinnis, 1983).

2. Tratamento da cromoblastomicose

A cromoblastomicose é uma doença de evolução lenta e por isso o paciente demora a procurar o serviço de saúde. Isso dificulta o tratamento que, na maioria das vezes, é apenas paliativo. Diversos esquemas terapêuticos já foram utilizados, mas poucos são os relatos de cura (BONIFAZ *et al*, 1997; BOPP, 1978; CASTRO, 1992; CASTRO, 1998; ESTERRE *et al*, 1996; QUEIROZ-TELLES *et al*, 1992; YU, 1995). Esses esquemas incluem processos físicos, cirúrgicos e quimioterápicos, mas não existe um consenso sobre o procedimento a ser adotado. De modo geral, o tipo da lesão, a duração da doença, o sítio de infecção, assim como, as condições físicas e econômicas do paciente direcionam a terapêutica.

Nos primeiros estágios da doença, alguns autores indicam a excisão cirúrgica, eletrodissecação, uso do forno de Bier ou criocirurgia. Em estágios mais avançados, a conduta preferencial tem sido a administração de medicamentos de modo isolado ou em associação (Castro, 1992; Kullavanijaya *et al*, 1995; Lavalley *et al*, 1987; Lopes *et al*, 1979; Queiroz-Telles, *et al*, 1997).

A administração oral de iodeto de potássio associada a administração endovenosa de iodeto de sódio, foi um dos primeiros tratamentos a ser utilizado como terapêutica complementar (Lacaz *et al*, 1991). Em 1957, Bopp conseguiu bons resultados com a associação vitamina D2 e iodeto de sódio.

Durante a década de 60 e início dos anos 70, vários pesquisadores relataram o uso de tiabendazol com algum sucesso terapêutico e esse tratamento ainda é utilizado em alguns casos (Esterre *et al*, 1996; Solano, 1966). Mais tarde, em 1978, Lopes e colaboradores relataram que a 5-fluorocitosina, administrada por via oral, sob a forma de comprimidos e por via tópica, sob a forma de pomada, foi eficaz no tratamento da cromoblastomicose. Entretanto, foi observou-se ocorrência de resistência com o uso prolongado desse agente terapêutico (Lopes *et al*, 1978). Posteriormente, esses e outros autores preconizaram o uso da associação de anfotericina B com 5-fluorocitosina (Bopp, 1978; Lopes *et al*, 1979). Apesar de ser considerado por muito tempo o tratamento de eleição, sua aplicação depende em grande parte do estado físico do paciente. Isso se deve a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade induzidas pelas drogas, o que pode levar à suspensão do tratamento (Lacaz *et al*, 1991). A 5-fluorocitosina também já foi utilizada em associação com outros quimioterápicos, como tiabendazol e cetoconazol, com resultados variáveis (De Clercq *et al*, 1985).

Em 1978, Yanase e colaboradores utilizaram, pela primeira vez, anfotericina B intralesionalmente. Em 1991, Cueva-Paz obteve algum sucesso com aplicações tópicas, sob a forma de pomada, e administrações endovenosas desse poliênico.

Na década de 80, o cetoconazol foi indicado por diversos pesquisadores que observaram melhora clínica (Greene *et al*, 1990; McBurney, 1982). Em 1987, Ganer realizou o primeiro estudo clínico com um dos azóis de última geração, o itraconazol, e observou bons resultados para dois pacientes com cromoblastomicose. A partir daí, vários estudos têm demonstrado a eficácia do tratamento com esse triazol (Borelli, 1987; Kumar, 1991; Queiroz-Telles *et al*, 1992), mas ainda há casos de pacientes que não respondem a essa terapia (Borelli, 1997; Castro, 1992; Restrepo, 1994). Por outro lado, foram observados bons resultados com associação de itraconazol e criocirurgia. A cura, ocorrida em alguns casos, foi comprovada por meio de acompanhamento clínico e laboratorial durante meses e, em alguns casos, durante anos (Bonifaz *et al*, 1997; Kullavanijaya *et al*, 1995). Outros triazóis, como o fluconazol e o saperconazol também já foram empregados, mas sucesso terapêutico foi observado em poucos casos (Diaz *et al*, 1992; Franco *et al*, 1992).

Na ilha de Madagascar, o uso da terbinafina em pacientes com cromoblastomicose tem sido referido como eficaz (Esterre *et al*, 1996).

Embora diversos tratamentos possam ser utilizados, verifica-se, na literatura consultada, que é pequeno o número de relatos sobre cura definitiva comprovada. Segundo alguns autores (Castro, 1998; McGinnis, 1983), é necessário acompanhamento de cura clínica e micológica durante anos após o término da terapia, visto que, os casos de recidiva são freqüentes. Não são

raros os relatos de cura, seguida de acompanhamento durante meses, mas a maioria dos pacientes envolvidos sofre recidiva após alguns anos (Castro, 1998; McGinnis, 1983). Muitas vezes a dificuldade na cura deve-se ao próprio paciente que, ao perceber melhora clínica, abandona o tratamento; o retorno desses pacientes ao serviço de saúde usualmente ocorre após o reaparecimento e agravamento das lesões.

Mesmo após 10 anos de uso, o itraconazol continua sendo muito utilizado no tratamento da cromoblastomicose, sendo considerado por alguns autores como droga de escolha (Hoog *et al*, 2000). Além do uso da terbinafina com sucesso por alguns pesquisadores (Esterre *et al*, 1996; Sevigny e Ramos, 2000), outras tentativas de tratamento têm sido realizadas como, por exemplo, a associação de itraconazol e terbinafina (Gupta *et al*, 2002), e a utilização de um composto obtido através de extração alcoólica do alho (*Allium sativum*), denominado de ajoene ([E, Z]-4,5,9-trihiadodeca-1,6,11-triene 9-oxide). Esse composto mostrou-se eficaz *in vivo* e *in vitro*, sobretudo quando utilizado contra cepas de *Cladophialophora carrionii* (Pérez-Blanco *et al*, 2003). Entretanto, são necessários estudos mais amplos, a fim de se comprovar a real eficácia desses compostos, utilizados de forma isolada ou associada, uma vez que, após algum tempo, a maioria dos pacientes apresenta recidivas das lesões, independente do tratamento realizado.

Uma maneira de avaliar a eficácia terapêutica é a determinação do perfil de suscetibilidade do fungo frente ao agente antifúngico utilizado no tratamento. Esse procedimento é indicado porque o estabelecimento do diagnóstico clínico de cura definitiva, ou até mesmo parcial, pode levar meses ou anos, pois a resposta a terapêutica na cromoblastomicose quase nunca é

imediatamente. Portanto, a análise do perfil de susceptibilidade da cepa isolada do paciente em tratamento pode fornecer subsídios para a manutenção da terapia ou então a substituição por tratamento mais adequado. Em trabalho recente, foram encontrados elevados valores de concentração inibitória (CIM) para o itraconazol frente a cepas isoladas de pacientes com cromoblastomicose e sob tratamento com esse antifúngico (Andrade *et al*, 2004). Esses valores foram mais bem evidenciados com isolados sequenciais de alguns pacientes. Em dois desses casos, pode-se estabelecer correlação entre elevados valores de CIM e piora no quadro clínico desses pacientes.

A baixa eficácia terapêutica também pode resultar de infecção por cepas de fungo resistentes (Espinel – Ingroff, 1997). Além disso, o longo período de infecção pode determinar modificações nas características morfológicas usuais, impossibilitando, muitas vezes, a identificação do agente da cromoblastomicose (Andrade *et al*, 2003).

Além de eventuais dificuldades no diagnóstico clínico da doença, o tratamento também pode ser dificultado quando a identificação correta do agente não é alcançada. Esse problema é mais importante em doenças como a cromoblastomicose, a feo-hifomicose e o eumicetoma, onde cada agente responde de forma diferente aos antifúngicos disponíveis (Esterre *et al*, 1996; Restrepo, 1994).

De modo geral, as micoses subcutâneas, como a cromoblastomicose, apresentam características clínicas específicas, que permitem ao especialista chegar ao diagnóstico e instituir o tratamento adequado. Algumas vezes, porém, essas micoses apresentam aspectos clínicos similares (Lacaz *et al*,

1991) e, portanto, são necessários testes laboratoriais sensíveis e específicos para estabelecer o diagnóstico definitivo (Lacaz et al, 1991).

3. Diagnóstico Laboratorial da cromoblastomicose

3.1. Métodos morfológicos

O diagnóstico laboratorial da cromoblastomicose baseia-se na demonstração do fungo (exame direto) em materiais biológicos, obtidos por raspagem e por biópsia da lesão (McGinnis, 1983). Para a identificação do agente, são analisadas as características morfológicas de colônias isoladas em meios de cultura sintéticos.

Segundo McGinnis, a presença de células muriformes, arredondadas, de coloração marrom, com divisão longitudinal (**Figura 1**), no tecido do hospedeiro, diferencia a cromoblastomicose da feo-hifomicose. Embora essas células recebam denominações variáveis de autor para autor, sua detecção confirma o diagnóstico de cromoblastomicose (McGinnis, 1983). Além dessas formas, podem estar presentes hifas demácias e células leveduriformes. A coloração marrom é devida ao pigmento de melanina depositada na parede fúngica (Alviano et al, 1991).

Figura 1. Fotomicrografia de células muriformes em tecido subcutâneo tratado com KOH 10%.

Os agentes da cromoblastomicose, assim como os do eumicetoma, da feo-hifomicose e da esporotricose, são fungos demácios (Schell et al, 1995; Padhye e McGinnis, 1999). Esses fungos apresentam pigmento marrom escuro, denominado melanina, em sua parede celular. Esse pigmento é um antioxidante natural, importante na sobrevivência e longevidade dos propágulos fúngicos, além de conferir maior patogenicidade e virulência a esses fungos (Wheeler e Bell, 1987; Feng et al, 2001; Alviano et al, 2004).

Os agentes da cromoblastomicose têm crescimento lento, requerendo até 14 dias para o isolamento. As colônias são escuras, aveludadas, com centros elevados. A análise macroscópica não identifica o fungo causador, porque as colônias desses agentes possuem características morfológicas similares.

Os fungos causadores dessa micose incluem: *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea compacta*, *Rhinocladiella aquaspersa* e, mais recentemente, têm sido relatadas espécies de *Exophiala* (Queiroz-Telles et al, 1996; Padhye et al, 1996; Barba-Gómez et al, 1992).

Microscopicamente, verifica-se que *Fonsecaea pedrosoi* (**Figura 2**) é fungo pleomórfico, isto é, pode apresentar mais de um tipo de conideogênese. O gênero é caracterizado pelo desenvolvimento de conidióforo que origina camada primária de conídios, os quais produzem conídios simpodiais. Estes evoluem para células de conideogênese, as quais originam outras camadas de conídios; os primeiros são largos (2,5µm x 12µm), seguindo-se conídios menores (1,8 µm x 3,2 µm). Usualmente, este processo resulta em apenas duas ou três camadas de conídios que constituem as características

morfológicas do gênero *Fonsecaea*. No entanto, a partir desses conídeos pode haver a formação de três tipos de esporulação: a) tipo cladosporium: conidióforos de comprimentos variados, eretos. Conídios unicelulares ou bicelulares, em forma elíptica, dispostos em cadeias acrópetas; b) tipo rhinocladiella: conidióforos nodosos com esporulação acropleurógena. Os conídios estão unidos por apículos ao conidióforo; c) tipo phialophora: esporulação semi-endógena em fiálides, com colaretes conspícuos. (Schell *et al*, 1999; Hoog *et al*, 2000).

Figura 2. Fotomicrografia de *Fonsecaea pedrosoi*, mostrando conidióforos eretos com formação típica tipo cladosporium

A *Fonsecaea compacta* também é fungo pleomórfico. Apresenta os três tipos de esporulação de *F. pedrosoi*, sendo que a única diferença entre as duas espécies está na maior quantidade de esporulação em *F. compacta*, o que dificulta a visualização da conidiogênese (Schell *et al*, 1999; Hoog *et al*, 2000).

A *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carionii* apresenta hifas septadas, ramificadas e demaciadas. Os conidióforos são eretos, originam os conídios

unicelulares e elipsóides. Esses possuem, em média, 2,5 μm a 4,5 μm e formam cadeias acrópetas (Schell *et al*, 1999; Hoog *et al*, 2000).

A *Phialophora verrucosa* produz hifas septadas, ramificadas e demaciadas. Os conidióforos são diferenciados em simples ou ramificados. As fiálides são monofialídicas, obclavadas com constrição na base do colarete em forma de taça. Os conídios não possuem septos, medem de 1 μm a 2,5 μm x 2,4 μm a 4,9 μm , ficando aglomerados no colarete (Schell *et al*, 1999; Hoog *et al*, 2000).

As hifas da *Rhinoctadiella aquaspera* são septadas, ramificadas, demaciadas e os conidióforos são eretos, de parede celular espessa e simpodial. Os conídios são unicelulares alongados (raros bicelulares), acropleurógenos, com diâmetro de 2 μm a 5 μm aproximadamente (Schell *et al*, 1999; Hoog *et al*, 2000)..

A identificação dos fungos demácios pelos métodos morfológicos de rotina é, muitas vezes, difícil, devido ao pleomorfismo que é comum a esses fungos (Schell *et al*, 1999). Nesses casos, é necessário enviar as cepas a centros de referência para serem identificadas. Além disso, tratamentos prévios da cromoblastomicose com antifúngicos também podem contribuir para alterar as características morfológicas do fungo, dificultando a sua identificação.

De modo geral, os métodos morfológicos de identificação são demorados e algumas vezes são inconclusivos. Isto ocorre, por exemplo, quando os fungos não desenvolvem características morfológicas peculiares de determinada espécie. Esse fato é observado, com frequência, em espécies antropofílicas do gênero *Trichophyton* (Gräser *et al*, 2000) que apesar de não-demácios, sua identificação também é controversa (Gräser *et al*, 2000). Por

serem mais bem adaptadas ao ser humano, essas espécies desenvolvem poucas estruturas conidiogênicas, o que torna necessário o emprego de testes bioquímicos para sua identificação. Mesmo assim, muitas vezes não é possível determinar a espécie isolada (Gräser et al, 2000).

No caso dos fungos demácios, a dificuldade de identificação não está na falta de conidiogênese e sim no grau de pleomorfismo em uma mesma espécie, ou seja, a presença de mais de um tipo de conidiogênese. Como exposto acima, um exemplo é a *Fonsecaea pedrosoi* que apresenta três tipos de conidiogênese: cladosporium, fialófora e rinocladiela (Schell et al, 1999; Hoog et al, 2000; McGINNIS, 1980).

Apesar da conidiogênese predominante ser, na maioria das cepas de *F. pedrosoi*, do tipo cladosporium, também podem ser encontrados em uma mesma cepa os três tipos de esporulação, como podemos observar nas **figuras 3 e 4**, que mostram diferentes aspectos micro-morfológicos de um mesmo isolado.

Figura 3: Fotomicrografia de *Fonsecaea pedrosoi* com esporulação tipo cladosporium e tipo fialófora.

Figura 4: Fotomicrografia de *Fonsecaea pedrosoi* com esporulação tipo rinocladiela.

Fungos do gênero *Exophiala* e *Rhinocladiella* também podem apresentar mais de um tipo de conidiogênese (McGinnis, 1978; McGinnis e Schell, 1980). A fim de se resolver esse problema, foram desenvolvidos testes bioquímicos para os fungos do gênero *Exophiala* (Hoog *et al*, 1995). Entretanto, assim como acontece com os fungos do gênero *Trichophyton*, muitas espécies ainda não são passíveis de serem identificadas (Rogers *et al*, 1999).

Também há casos de fungos cuja identificação é prejudicada por não produzirem conídios no primeiro isolamento, mesmo quando se utilizam métodos auxiliares para estimular a conidiogênese. Nessas condições, os fungos são classificados na Forma ordem *Mycelia Sterila* (McGinnis, 1980; Pires *et al*, 1996; Andrade *et al*, 1997).

Portanto, como podemos observar, existem vários problemas que podem dificultar o isolamento e a identificação correta do fungo. Esse fato pode acarretar falha no tratamento que, em última instância, pode significar um risco a vida do paciente. Essa observação é pertinente, considerando-se que muitas infecções fúngicas podem levar o paciente a óbito em pouco tempo. Como

exemplo podemos citar principalmente as infecções sistêmicas oportunistas como a zigomicose, a hialo-fifomicose e a feo-hifomicose. Nesses casos, o diagnóstico na maioria das vezes é realizado *pós morte*. Entre os fungos demácios, são exemplos dessas intercorrências infecções por *Cladophialophora bantiana*, *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* ou por *Ramichloridium mackenziei*. Essas espécies são consideradas extremamente patogênicas, porque possuem neurotropismo e a infecção cerebral primária pode se disseminar. Por isso, o diagnóstico *in vivo* é muito difícil (Dixon *et al*, 1989; Rossmann *et al*, 1996; Schell *et al*, 1999; Horr e Hoog, 1999).

Alm de esses fungos possm o pigmento melanina, comprovado como um importante fator de virulncia (Brush and Money, 1999; Feng *et al*, 2001), eles tambm pertencem famlia *Herpotrichiellaceae*, a qual tem potencial evoluo ecolgica, pois possui enorme poder de adaptao como patgeno de humanos ou outros vertebrados (Horr e Hoog, 1999). Esse fato apoiado pelos casos de cromoblastomicose, feo-hifomicose e micetomas que so ocasionados por diversos membros dessa famlia (Horr e Hoog, 1999).

Portanto, o emprego de mtodos de diagnstico rpido pode ser valioso para o incio de terapia adequada, em casos onde os mtodos clssicos de isolamento e identificao do agente no so adequados.

3.2. Mtodos Imunolgicos

Alm dos mtodos morfolgicos, os testes imunolgicos podem ser aplicados no auxlio ao diagnstico de diversas micoses. Essas provas so principalmente indicados quando o tempo de cultivo demorado e o fungo de

difícil isolamento, como, por exemplo, na paracoccidioidomicose (Brummer *et al*, 1993) e na histoplasmose (Wheat *et al*, 1986).

A aplicação de testes imunológicos para diagnóstico e seguimento da doença tem evoluído muito na última década. O desenvolvimento de moléculas antigênicas purificadas, antígenos recombinantes e anticorpos monoclonais proporcionaram avanços significativos nessa área e esses avanços têm proporcionado reações mais sensíveis e específicas que as anteriormente obtidas (Costa *et al*, 2000).

Técnicas como: fixação de complemento, imunodifusão, imunofluorescência indireta, aglutinação em látex, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e *immunoblotting* estão sendo utilizadas tanto em pesquisa como em rotina (Costa *et al*, 2000). Entretanto, apesar dos avanços alcançados nessa área, a ocorrência de reação cruzada nos testes ainda constitui um grande problema para os pesquisadores. Esse fenômeno é com frequência observado em regiões onde diferentes micoses são endêmicas, como, por exemplo, em países da América Latina, onde a paracoccidioidomicose, a doença de Jorge Lobo e a histoplasmose coexistem (Verweij *et al*, 2000).

O diagnóstico imunológico de micoses causadas por fungos demácios, ainda é objeto de diversos estudos. Muitos ensaios já foram realizados com o objetivo de se obter antígenos específicos de natureza proteica (Espinell-Ingroff *et al*, 1986; Esterre *et al*, 1997; Vidal *et al*, 2003) e ou lipídica (Barros e Resende, 1999) utilizados em técnicas como imunodifusão dupla, contraímuno-eletoforese e ELISA (Villalba *et al*, 1988; Vidal *et al*, 2003).

Embora esses testes tenham mostrado alta especificidade, a sensibilidade foi baixa (Vidal *et al*, 2003; Abliz *et al*, 2003).

Em estudos recentes (Esterre *et al*, 2000; Vidal *et al*, 2003), verificou-se que o emprego de antígenos somáticos na técnica de ELISA pode ser útil no diagnóstico e no acompanhamento da cromoblastomicose. Esse teste mostrou-se altamente específico e apresentou maior sensibilidade do que a observada utilizando-se técnicas de precipitação, como a contraímunoeletroforese e a imunodifusão dupla (Vidal *et al*, 2003). Em trabalho recente, a técnica de *immunoblotting* revelou uma fração com aproximadamente 54 kDa presente em antígenos somáticos e metabólicos de *Fonsecaea pedrosoi*, que mostrou sensibilidade de 96,6% e especificidade de 100%, quando avaliada frente a 60 soros de pacientes com CBM causada por este fungo, 36 soros de esporotricose, 34 soros de leishmaniose cutânea e 48 soros de indivíduos normais (doadores de sangue), sendo portanto, mais sensível e específica em comparação com as outras provas já testadas, podendo ser a técnica de eleição para testes em rotina laboratorial (Vidal *et al*, *in press*).

3.3. Métodos Moleculares

Na atualidade estão sendo utilizados métodos moleculares para estabelecer padrões que possam auxiliar no diagnóstico e na identificação correta de algumas espécies de fungos (Hoog *et al*, 1995).

Um desses métodos é a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) desenvolvida por Kary Mullis em 1983. O método consiste de uma reação de polimerização em cadeia para a amplificação de seqüências de DNA por uma reação enzimática direcionada por iniciadores (Erich, 1989). A PCR é utilizada para produzir *in vitro* grande número de cópias de uma determinada seqüência de DNA. A partir daí, o produto resultante da amplificação pode ser utilizado em uma variedade de aplicações. Essa técnica é muito utilizada no diagnóstico laboratorial de várias doenças, sejam elas de ordem infecciosa ou não.

Técnicas moleculares de identificação e detecção rápida como a *PCR* têm apresentado potencial aplicação no estudo de fungos patogênicos. Reações específicas foram desenvolvidas para leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* (Shin *et al*, 1999; Elie *et al*, 1998) e para fungos filamentosos como *Aspergillus* spp, *Scedosporium* spp, *Cladophialophora carrioni*, *Fonsecaea* spp, *Hortae weneckii*, várias espécies de dermatófitos e fungos dimórficos (Martin *et al*, 2000; Weed *et al*, 1998; Abliz *et al*, 2003, Abliz *et al*, 2003; Abliz *et al*, 2004; Liu *et al*, 2002; Lindsley *et al*, 2001). Esses trabalhos foram desenvolvidos com a finalidade de identificar o agente isolado diretamente em cultura ou em amostras biológicas (SHIN *et al*, 1999; Elie *et al*, 1998).

Em trabalhos mais recentes (Ninet *et al*, 2003; Hall *et al*, 2003; Hall *et al*, 2004) têm sido empregado teste comercial *Microseq® D2 large-subunit rDNA*

fungal (*Microbial Identification System, Applied Biosystems*), na identificação de fungos isolados de amostras clínicas. O desenvolvimento desse *kit* foi fundamentado na tecnologia da *PCR* e no sequenciamento da região 28S rDNA (utilizada na identificação molecular de fungos). O *kit* é composto de reagentes para a *PCR*, reagentes para o sequenciamento, *software* para identificação e análise das seqüências e mais uma biblioteca de seqüência de ácido nucléico fúngico.

Os trabalhos realizados com dermatófitos e leveduras (Ninet *et al*, 2003; Hall *et al*, 2003) demonstraram a possibilidade do uso desse *kit* em rotina, sobretudo quando técnicas morfológicas (fenotípicas) não forem conclusivas. Entretanto, quando o mesmo foi utilizado em testes com fungos filamentosos (Hall *et al*, 2004) verificou-se a necessidade de ampliação da biblioteca genômica, pois muitos fungos não foram identificados pela comparação das seqüências fornecidas pelo *software* do *kit*. Os autores consideram que o método é acurado e pode ser utilizado para identificação de fungos filamentosos no laboratório clínico, mas recomendam uma ampliação no banco de dados das seqüências disponíveis (Hall *et al*, 2004).

Além de serem utilizadas com finalidade diagnóstica como a *PCR*, outras técnicas moleculares são empregadas em estudos epidemiológicos, taxonômicos e filogenéticos de fungos (Attili *et al*, 1998; Haase *et al*, 1999; Spatafora *et al*, 1995).

Uma dessas técnicas é o *random amplified polymorphic DNA (RAPD)* (Williams *et al*, 1990) que foi desenvolvido primeiramente com a finalidade de detectar polimorfismos entre organismos que não possuíam seqüências conhecidas, possibilitando desta forma a geração de marcadores moleculares e

a construção de mapas genéticos. Esse método também é conhecido como *Arbitrarily Primed Polimerase Chain reaction* (AP-PCR) (Welsh e McClelland; 1990) e *DNA Amplification fingerprint* (Caetano-Anollés *et al*, 1991).

O método RAPD está fundamentado na utilização de iniciadores pequenos e aleatórios para amplificar seqüências do DNA genômico pela PCR, empregando baixas temperaturas de hibridização. Nessas condições, formam-se produtos de amplificação de vários tamanhos que compõem um perfil de bandas (*fingerprint*) que possibilita a tipagem de determinado organismo.

Vários sistemas biológicos já foram analisados por RAPD, incluindo uma variedade de fungos (Sam Milan *et al*, 1997; Bertout *et al*, 2001; Bart-Delabesse *et al*, 2001; Defontaine *et al*, 2002). Um estudo realizado com vários fungos demácios utilizando essa técnica (Caligiorne *et al*, 1999) demonstrou alto grau de polimorfismo para espécies diferentes e baixo grau de polimorfismo para fungos de uma mesma espécie. Também nesse estudo os autores observaram baixo grau de polimorfismo para os fungos *F. pedrosoi* e *F. compacta* e, portanto, sugerem que a classificação como espécies distintas pode não ser apropriado (Caligiorne *et al*, 1999).

Outra técnica muito utilizada em tipagem molecular de fungos é *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Nollau e Wagener, 1997) pela qual o DNA genômico ou os produtos de amplificação gerados na PCR são digeridos com enzimas de restrição (endonucleases de restrição). Os fragmentos obtidos são, então, separados por eletroforese e analisados quanto ao seu tamanho, empregando ou não sondas de DNA. Os perfis de restrição gerados são comparados e a identidade genética de um certo organismo pode ser determinada. Essa técnica também já foi empregada em vários sistemas

incluindo muitos fungos (Girardin *et al*, 1994; Lasker, 2002; Delabesse *et al*, 2001; Ahmed *et al*, 1999). Trabalhos com fungos demácios foram realizados utilizando como alvo os genes que codificam as subunidades de RNA ribossômico (rDNA) (Caligiorne *et al*, 1999; Atili *et al*, 1998). Nesses trabalhos pode-se confirmar, por meio da análise de restrição enzimática, a estreita relação que existe entre as espécies de *Fonsecaea* e seu distanciamento genético de outros fungos demácios. Com base nessas observações, também foi proposta uma revisão taxonômica para as duas espécies desse gênero.

Os polimorfismos de DNA do tipo RFLP são úteis para estabelecer perfis que permitem diferenciar cepas de vários isolados ou espécies para fins taxonômicos ou epidemiológicos. Esses polimorfismos, assim como os gerados pelo RAPD e técnicas de detecção direta, como a PCR, têm potencial aplicação no diagnóstico laboratorial em várias micoses, incluindo a cromoblastomicose.

Essas técnicas podem ser aplicadas no estudo do genoma total ou em regiões específicas do genoma como, por exemplo, o complexo rDNA, ou em elementos de repetição.

Atualmente, as seqüências mais utilizadas nos estudos filogenéticos e diagnósticos compreendem regiões que codificam os genes das subunidades do RNA ribossômico 18S rDNA, 5.8S rDNA e 28S rDNA (IWES *et al*, 2002). Esses genes fazem parte do complexo rDNA, que inclui duas regiões espaçadoras internas (*internal transcribed spacers*) (**Figura 5**). A região espaçadora transcrita interna 1 (ITS1) está localizada entre o 18S rDNA e 5.8S rDNA e a região espaçadora transcrita interna 2 (ITS2) está localizada entre o 5.8S rDNA e 28S rDNA. Além dessas seqüências, o complexo rDNA também

possui duas regiões espaçadoras externas (*external transcribed spacers*), uma ao gene 18S e outra ao gene 28S rRNA, denominadas ETS1 e ETS2. Os genes do complexo rDNA são encontrados em todos os microrganismos e conhecidos por acumular mutações a uma velocidade constante (IWES, et al, 2002).

Figura 5. Representação do complexo DNA ribossômico, constituído dos genes que codificam as subunidades de rRNA 18S, 5.8S e 28S, e as regiões espaçadoras externas (ETS1 e ETS2) e as regiões espaçadoras internas (ITS1 e ITS2).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que foi o primeiro fungo a ter seu genoma completamente seqüenciado, o complexo rDNA está localizado no Cromossomo XII e seu tamanho é de aproximadamente 9Kb. O complexo se repete cerca de 140 vezes nesse cromossomo e tem um total de bases repetidas de quase 1260 kb. Como o tamanho total do genoma do *S. cerevisiae* é cerca de 13,4 megabases, o complexo rDNA possui aproximadamente 10% do tamanho de seu genoma total (IWES et al, 2002). Esse complexo de genes, com cópias múltiplas, possui seqüências que são conservadas e também seqüências variáveis, servindo, desse modo, como referência para estudos de evolução e divergências entre organismos.

O gene 18S possui aproximadamente 1800 pb com regiões conservadas e também variáveis. As seqüências variáveis do gene 18S são estudadas para

diferenciar gêneros e espécies (IWES *et al*, 2002). O gene *5.8S* possui cerca de 160 pb e é uma região altamente conservada. Portanto, não é indicada para estudo entre diferentes gêneros ou espécies (IWES *et al*, 2002). O gene *28S* é o maior deles e possui aproximadamente 3400 pb. Assim como o *18S* contém regiões conservadas e variáveis, sendo, portanto, utilizado também para estudos diferenciais de gêneros e espécies (IWES, *et al*, 2002).

As regiões ETS1 e ETS2 contêm seqüências conservadas, porém o papel biológico das mesmas ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se que são vitais para o processamento inicial do rRNA durante a transcrição (IWES *et al*, 2002).

As regiões ITS1 e ITS2 são hipervariáveis, demonstram grande diversidade genética entre diferentes organismos e até mesmo dentro da mesma espécie. Por isso, são fundamentais para a diferenciação filogenética das espécies (HOOG *et al*, 1999). Essas regiões também são importantes para o processamento inicial do rRNA durante a transcrição (IWES *et al*, 2002).

Embora os estudos das seqüências ITS1 e ITS2 sejam úteis na identificação molecular dos fungos (Haase *et al*, 1999; Spatafora *et al*, 1995), em alguns casos não foi possível a classificação filogenética exata. Por exemplo, no caso dos agentes da cromoblastomicose: *Fonsecaea pedrosoi* e *Fonsecaea compacta*, ainda há dúvidas quanto a *F. compacta* ser uma subespécie da *F. pedrosoi* ou se realmente é uma outra espécie. (Attili *et al*, 1998). Por isso, estudos com outras regiões do genoma podem ser necessários, a fim de se obter informações adicionais que possibilitarão um melhor entendimento da evolução entre e inter espécies.

Além dos polimorfismos do complexo rDNA, outras variantes genéticas podem ser empregadas no estudo molecular de fungos, como, por exemplo, a utilização de seqüências curtas repetidas de DNA (Versalovic *et al*, 1991) em estudos filogenéticos. Essas seqüências são conhecidas como *Repetitive extragenic palindrome* (REP) e *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) e estão distribuídas pelo genoma. Foram primeiro identificadas em bactérias.

As seqüências (REP) e (ERIC) ou *Palindromic Units* (PU) são exemplos de elementos de repetição. Esses elementos possuem localização intercistrônica, não sofrem transposição e estão envolvidos em varias funções biológicas, como terminação da transcrição, estabilidade do mRNA, organização dos cromossomos, ou ainda podem estar relacionados com a patogenicidade (Versalovic *et al*, 1991).

A seqüência consensual REP foi desenhada a partir do alinhamento múltiplo de seqüências de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Stern *et al*, 1984). Esta seqüência de 38 pb contém 6 posições totalmente degeneradas. (Versalovic *et al*, 1991).

A seqüência ERIC foi primeiro observada no gene *tls* da bactéria *E. coli* (Sharples *et al*, 1990) e foi denominada *Intergenic Repeat Units*. Mais tarde, outro grupo de pesquisadores identificou a mesma seqüência e a denominou ERIC (Hulton *et al*, 1991). Esta seqüência possui 126 pb, e tem uma localização extragênica, exceto no *Vibrio cholerae*.

Os primeiros estudos com as seqüências REP e ERIC foram focados em suas funções biológicas (Stern *et al*, 1984; Gilson *et al*, 1984). Posteriormente, um estudo (Versalovic *et al*, 1991) demonstrou, por meio da técnica de PCR, o

potencial dessas seqüências em gerar *fingerprints* bacterianos, úteis em tipagem molecular.

A diferença básica entre os ensaios de PCR-ERIC e PCR-REP e a técnica clássica de *RAPD* é o emprego de iniciadores com tamanhos diferentes, pois para o PCR-ERIC e PCR-REP os iniciadores são de tamanho maior do que os utilizados normalmente no *RAPD*.

Os ensaios PCR-ERIC e PCR-REP têm sido empregados em estudos epidemiológicos e filogenéticos de várias bactérias e fungos (Louws *et al*, 1994; Gilling *et al*, 1997; Gilling *et al*, 1997; Belkum *et al*, 1993; Edel *et al*, 1995; Metha *et al*, 2002; Metha *et al*, 2002).

Em estudos epidemiológicos conduzidos com o fungo fitopatígeno *Stemphylium solani* (Metha *et al*, 2002; Metha *et al* 2002), onde foram empregados os ensaios com PCR-ERIC e PCR-REP, pode-se caracterizar os isolados de acordo com a região de origem do fungo e a origem do isolamento (do algodão ou do tomate). Em outro estudo epidemiológico, isolados de amostras clínicas de pacientes neutropênicos e cepas de coleções de fungos do gênero *Aspergillus* (Belkum *et al*, 1993), foram utilizados para comparar diferentes *motifs* de repetição presentes no genoma de cinco espécies diferentes de *Aspergillus*, entre eles, o ERIC. Foram desenvolvidos ensaios de PCR com seis iniciadores diferentes, um para cada *motif*, e o perfil de produtos gerados permitiu a discriminação das cinco espécies, independente do iniciador utilizado. Por isso, os autores consideraram que as técnicas de PCR-ERIC e PCR-REP podem ser utilizadas na tipagem e caracterização de espécies fúngicas provenientes de locais diferentes.

Em fungos patogênicos para humanos, como os causadores da cromoblastomicose, esses elementos de repetição ainda não foram pesquisados. Entretanto, esses estudos poderiam auxiliar tanto na identificação molecular como na identificação de cepas de uma mesma espécie, isoladas de pacientes de diferentes regiões ou, então, isoladas em diferentes estágios do tratamento de um mesmo paciente. A partir dos perfis gerados, seria possível estabelecer uma correlação entre os vários aspectos que envolvem a cromoblastomicose.

III - OBJETIVOS

Objetivos

1. Analisar as características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose.
2. Comparar as características genotípicas e os perfis de suscetibilidade ao itraconazol de cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas sequencialmente de pacientes com cromoblastomicose, durante o tratamento com itraconazol.
3. Desenvolver um teste de PCR para identificação molecular de cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas em cultura e avaliar a sua aplicabilidade na diferenciação entre esse e outros fungos demácios que também podem causar micoses subcutâneas.

IV – MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cepas

No total, foram analisadas 104 cepas de fungos demácios. Entre essas, 55 foram isoladas de pacientes atendidos na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina/USP (HC/USP) (**Tabela 1**), sendo 47 recuperadas de modo seqüencial de 11 pacientes em tratamento com itraconazol (**Tabela 2**) e 8 não seqüenciais (**Tabela 3**). Também foram analisadas 13 cepas de pacientes isoladas em outros centros (Instituto Adolfo Lutz, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Laboratório Central de Saúde Pública – Bahia e Pontifícia Universidade Católica de Campinas) e enviadas para identificação no laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP); essas cepas também foram incluídas em nossa coleção de culturas de fungos demácios (**Tabela 4**). Dessa coleção, foram também estudadas 29 cepas doadas pelo Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT/USP), 6 cepas, incluindo a cepa padrão de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 (ICB/UFGM), doadas pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFGM), e uma cepa originária da *Unitat de Microbiologia de la Facultat de Medicina da Universitat Rovira i Virgili*, Réus, Espanha.

Todas as cepas foram numeradas de acordo com a data de entrada no laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP).

Tabela 1. Características clínico - epidemiológicas dos pacientes com cromoblastomicose atendidos na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina/USP e com acompanhamento entre dezembro de 1995 a maio de 2002.

Pacientes	Idade / sexo	Duração da doença	Procedência (estados)	Local de infecção	Forma clínica	Gravidade	Tratamentos anteriores
JDN	92 / M	14 anos	BA	mão, braço	placa, verrucosa	moderada	itraconazol
AMJ	68 / F	6 anos	MG	pernas	nodular, tumoral	severa	cetoconazol
OAS	73 / M	17 anos	MG	pernas e pés	nodular, tumoral	severa	fluco ² + C-LN ₂ ³
JZN	55 / M	16 anos	RO	pés	placa, verrucosa	moderada	cetoconazol
JGL	72 / M	10 anos	ni	pernas	placa	moderada	Sem tratamento
JMC	50 / M	11 anos	BA	pernas	placa verrucosa	moderada	cetoconazol +itraconazol +sulfa
MFS	75 / M	14 anos	BA	pés	placa, verrucosa	moderada	ni
OP	71 / M	6 anos	RO	pernas e pés	nodular, tumoral	ni	itraconazol + terbinafina
AJO	36 / F	7 anos	PE	pernas	ulcerada, verrucosa	leve	ni
FJOS	47 / M	ni ¹	ni	Mão	ni	ni	ni
JRS	54 / M	11 anos	RO	ni	ni	ni	itraconazol + terbinafina
JRO	51 / M	nd	ni	pernas	placa, verrucosa	moderada	ni
FCS	53 / M	10 anos	BA	glúteo	placa, verrucosa	moderada	itraconazol + C-LN ₂
EGS	79 / M	50 anos	BA	pés	placa, verrucosa	moderada	⁴ Amb + C-LN ₂
AJM	ni / M	nd	nd	braço	placa, verrucosa	moderada	ni
EPC	ni / M	10 anos	BA	pernas	placa	moderada	ni
MFP	ni / M	5 anos	BA	mão	placa	moderada	ni
JL	ni / M	ni	ni	ni	ni	ni	ni
OFA	ni / M	ni	ni	pernas	placa, verrucosa	ni	ni

¹ni: não informado; ²fluco: ³fluconazol; ⁴C-LN₂: criocirurgia por nitrogênio líquido; ⁵Amb: anfotericina B.

Tabela 2. Cepas isoladas de modo sequencial entre dezembro de 1995 a maio de 2002 de 11 pacientes com cromoblastomicose, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=47).

Paciente	Número da cepa FCF/USP	Identificação morfológica	Data de coleta
JDN	T12	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Dezembro / 95
JDN	T28	Fungo não esporulante	09/12/97
JDN	T32	Fungo não esporulante	Abril / 98
AMJ	T19	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	26/08/97
AMJ	T27	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	02/12/97
AMJ	T29	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	02/04/98
AMJ	T30	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	07/04/98
AMJ	T75	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	18/09/01
AMJ	T76	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	16/10/01
AMJ	T80	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	11/12/01
AMJ	T84	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	08/08/02
OAS	T20	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	26/08/97
OAS	T22	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	30/09/97
OAS	T31	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	28/04/98
OAS	T50	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	25/04/99
OAS	T55	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	14/10/99
OAS	T57	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	06/07/00
OAS	T65	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	10/10/00
OAS	T69	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	10/01/01
OAS	T70	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	20/03/01
OAS	T71	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	27/03/01
OAS	T78	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	08/11/01
JZN	T26	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	12/12/97
JZN	T41	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	03/09/98
JZN	T45	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	02/1999
JZN	T72	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	31/07/01
JGL	T34	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	20/06/98
JGL	T35	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	22/06/98
JMC	T36	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	29/06/98
JMC	T43	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	08/12/98
JMC	T46	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	27/04/99
JMC	T47	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	25/05/99
MFS	T48	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	25/05/99
MFS	T51	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	29/06/99
MFS	T66	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	22/10/00
MFS	T77	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	04/10/01
MFS	T81	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	09/04/01
OP	T56	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	01/10/99
OP	T60	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	08/8/00
OP	T63	Fungo não esporulante	14/09/00
OP	T68	Fungo não esporulante	07/11/00
AJO	T64	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	13/09/00
AJO	T67	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	14/11/00
FJO	T73	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	08/06/01
FJO	T79	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	28/08/01
JRS	T82	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	28/09/01
JRS	T83	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	07/05/02

Tabela 3. Cepas isoladas entre dezembro de 1995 a maio de 2002 de 8 pacientes com cromoblastomicose, provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n=8).

Paciente	Número da cepa FCF/USP	Identificação morfológica	Data de coleta
JRO	T 18	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	01/06/96
FCS	T 21	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	29/08/97
EGS	T 33	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	14/05/98
AJM	T 37	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	17/07/98
EPC	T 40	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	15/09/98
MFP	T 53	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	25/04/99
JL	T 54	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Outubro / 99
OFA	T 74	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	04/09/01

Tabela 4. Cepas pertencentes à coleção de culturas de fungos demácios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, provenientes de outros centros de pesquisa (n=49).

Identificação morfológica	Número da cepa FCF/USP	Procedência direta	Procedência remota	Data do isolamento
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T4	IMTSP 86	Paciente/HC/SP	Agosto/1978
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T 11	IALSP	Paciente/IIER/SP	24/06/1993
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T16	IALSP	Paciente/CRTAIDS/SP	Agosto/ 1996
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T17	IMTSP 368	Paciente/HC/SP	agosto 1997
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T 23	IALSP	Paciente/Registro-SP	maio 1997
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T 24	UFMS	Paciente/Campo Grande- MS	29/09/1997
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T25	IALSP	Paciente/Registro-SP	20/11/1997
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T 38	IALSP	Paciente/Sorocaba-SP	27/07/1998
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T 42	IALSP	Paciente/Registro-SP	22/10/1998
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T 44	LACEN/BA	Paciente/BA	dezembro 1998
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T59	IALSP	Paciente/IIER/SP	12/06/2000
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T86	IALSP	Paciente/Sorocaba-SP	junho 2003
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	T110	ATCC 46428	Paciente/MG	1980
<i>Fonsecaea compacta</i>	T08	IMTSP 877	Paciente/HC/SP	julho 1962
<i>Fonsecaea compacta</i>	T94	IMTSP 154	Argentina	Junho1973
<i>Fonsecaea compacta</i>	T95	IMTSP 885		—
<i>Fonsecaea compacta</i>	T96	IMTSP 373	Argentina	setembro 1976
<i>Fonsecaea compacta</i>	T116	CBS 285/47/ FMR 36	Paciente/Porto Rico	1935
<i>Cladophialophora. Carrionii</i>	T02	IMTSP 68/IHM 1367	Uruguai	—
<i>Cladophialophora. Carrionii</i>	T107	IMTSP 768	Brasília/DF	—
<i>Cladophialophora. Carrionii</i>	T108	IMTSP 690/CDC A984		—
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	T06	IMTSP 776/FMC 242	Belo Horizonte/MG	—
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	T103	IMTSP691/ATCC24410	Paciente/México	—
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	T112	ICB/UFMG 51	Belo Horizonte/MG	—
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	T111	ICB/UFMG 01	Belo horizonte/MG	—
<i>Phialophora verrucosa</i>	T01	IMTSP 73/IHM 536	Paciente/Uruguai	fevereiro 1976
<i>Phialophora verrucosa</i>	T03	IMTSP 78/IHM 1559	Solo/Uruguai	—
<i>Phialophora verrucosa</i>	T05	IMTSP 314/IOC 1332	—	—
<i>Phialophora verrucosa</i>	T07	IMTSP 800/ IHM 556	Solo/Uruguai	—
<i>Phialophora verrucosa</i>	T09	IMTSP 887	—	março 1973
<i>Phialophora verrucosa</i>	T10	IMTSP 943/ IHM 1553	Solo/Uruguai	fevereiro 1967
<i>Phialophora verrucosa</i>	T109	IMTSP 2214		—
<i>Exophiala jeanselmei</i>	T92	IMTSP 178	Argentina	1976
<i>Exophiala jeanselmei</i>	T93	IMTSP 382	Curitiba/PR	1986

<i>Exophiala jeansemei</i>	T114	ICB/UFMG 45	Belo Horizonte/MG	—
Tabela 4. (continuação)				
<i>Exophiala spinifera</i>	T97	IMT1036/CDC B1439		setembro 1973
<i>Exophiala spinifera</i>	T98	IMTSP 976	Paciente/SP	—
<i>Exophiala dermatitidis</i>	T99	IMTSP 67/CDC B1793		1973
<i>Exophiala dermatitidis</i>	T100	IMTSP 581	Paciente/HC/SP	08/08/1985
<i>Exophiala dermatitidis</i>	T113	ICB/UFMG 14; WC 1096	Paciente	—
<i>Exophiala wernecki</i>	T101	IMTSP 53	Paciente/HC/SP	julho 1983
<i>Exophiala wernecki</i>	T102	IMTSP 911	Paciente/HC/SP	27/07/1983
<i>Cladophialophora bantiana</i>	T105	IMTSP 977	Paciente/HC/SP	novembro 1984
<i>Cladophialophora bantiana</i>	T106	IMTSP 307/CDC A1980		março 1960
<i>Cladophialophora bantiana</i>	T115	ICB/UFMG 13		—
<i>Piedraia hortae</i>	T104	IMTSP 164	Paciente/HC/SP	—
<i>Exophiala spp</i>	T49	PUCCAMP	Campinas/SP	Maior 1999
<i>Rhinochlamydia sp</i>	T62	IALSP	Campinas/SP- Rondônia	20/09/2000
Fungo não esporulante	T15	IALSP	Paciente/IIER/SP	20/03/1996

Legenda:

HC: Hospital das Clínicas

IIER: Instituto de Infectologia Emilio Ribas

IMTSP: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo;

IAL: Instituto Adolfo Lutz São Paulo;

UFMS: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul;

LACEN/BA: Laboratório Central de Saúde Pública – Bahia;

PUCCAMP: Pontifícia Universidade Católica de Campinas;

CDC: Centers for Disease Control, Atlanta, EUA;

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA;

ICB/UFMG: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;

WC: Wardsworth Center, USA;

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda,

FMR: Facultat de Medicina de Réus, Espanha.

IHM: Instituto de Higiene e Medicina

FMC: Faculdade de Medicina

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

2. Estudos morfológicos macroscópicos e microscópicos

As cepas de fungos demácios foram repicadas em agar-dextrose-batata (Difco, Sparks, EUA), contido em tubos de ensaio (20 mL/tubo). Após sete dias de incubação a 30 °C, um pequeno fragmento da colônia foi transferido para uma placa de agar-dextrose-batata (20 mL/placa). As colônias desenvolvidas foram analisadas, durante quatro semanas, quanto ao tempo de crescimento, tamanho e aspectos macromorfológicos. Foram incluídas nesse estudo apenas as cepas isoladas de pacientes do HU/USP e as enviadas para identificação por outros centros.

As análises micromorfológicas foram realizadas a partir de microcultivo em lâmina (RIDDELL, 1950) utilizando-se agar-dextrose-batata. As lâminas foram montadas em lactofenol-azul-algodão (CECON) entre o sétimo e o décimo dia de incubação a 30°C, dependendo do desenvolvimento da cepa. A identificação morfológica foi efetuada com base na conidiogênese do fungo (McGINNIS, 1980; LACAZ *et al.*, 1991; LACAZ *et al.*, 1998; Hoog *et al.*, 2000). Todas as cepas foram incluídas nesse estudo.

Para as cepas que não apresentaram conidiogênese, foi realizado o microcultivo em agar-água (McGINNIS, 1980), um meio mais deficiente em nutrientes que o agar-batata, com a finalidade de estimular ainda mais a esporulação.

Os resultados das pesquisas macroscópicas (velocidade de crescimento, topografia, pigmento, exsudato e textura) e microscópicas (aspectos relacionados a conidiogênese) foram anotados em uma ficha de identificação morfológica, incluindo-se também a procedência, data de entrada, data de isolamento e observações sobre a cepa em estudo (**Anexo 1**).

3. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico das cepas foi realizada com base no método descrito por HOOG e cols. (1999) com modificações. As cepas foram cultivadas por sete dias em caldo malte 2% a 30°C. Em seguida foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, esterilizados, onde foram adicionados 500 µL do tampão de lise (EDTA a 1mM pH 8,0; Tris-HCl a 10 mM pH 8,0; SDS a 1%; proteinase K a 100 mg/mL) e pérolas de vidro. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos durante 5 segundos e incubada em banho de água a 37°C durante 1 hora. Em seguida foram adicionados 200 µL de NaCl a 5 M e os tubos foram mantidos em banho de água a 65°C durante 10 min. A seguir, 100 µL da solução de cetiltrimetilbrometo-amônio (CTAB) a 10% e NaCl a 4,1% foram adicionados e a suspensão foi homogeneizada por inversão e novamente incubada a 65°C durante 20 min. O volume foi dividido em dois tubos. A extração do DNA genômico foi realizada pela adição de 400 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). A seguir, a fase aquosa foi transferida para outro microtubo esterilizado e o DNA foi precipitado com 800µL de isopropanol gelado. O sedimento foi lavado com etanol a 70% e suspenso em tampão TE (Tris a 10mM, EDTA a 1mM, pH 8,0).

4. Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico

A integridade das amostras de DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE [TRIS-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM (pH 8,0)] utilizando-se uma cuba eletroforética horizontal da Gibco BRL (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA).

As amostras de DNA foram preparadas da seguinte forma: 10 μ L de DNA e 2 μ L de tampão de amostra para ácido nucléico (azul de bromofenol a 0,25 %, xilenocianol FF a 0,25 % e glicerol a 30%). Foi também utilizado o padrão de tamanho molecular de DNA de 1 Kb (Amhersham Pharmacia Biotech do Brasil, São Paulo, Brasil) diluído no tampão de amostra 1:6 (v/v). O gel foi submerso em tampão TBE e foram aplicados 12 μ L de cada amostra de DNA e 5 μ L do marcador de peso molecular.

A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 30 min, utilizando fonte de energia (Amhersham Pharmacia Biotech LKB modelo EPS 200 – Uppsala, Suécia). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 mg/L por 10 min e as bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV, utilizando-se o sistema de captura de imagens Multimagen Light Cabinet (Alpha Innotech Co., EUA), e documentadas utilizando-se com o programa de análise de imagens Chemilmager 4400 v 5.5 (Alpha Innotech Co., EUA).

A quantificação e análise de pureza (razão A260/A280) das amostras de DNA foram realizadas em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EUA), após diluição das amostras a 1:20 em tampão TE (pH 8,0) (SAMBROOK *et al*, 2001). O DNA de todas as amostras foi extraído e avaliado quanto à integridade e quantidade.

5. Identificação molecular de *F. pedrosoi* por PCR - *duplex*

Na identificação molecular das cepas de *F. pedrosoi*, por meio da técnica da *reação em cadeia da polimerase* (PCR), foram utilizados dois iniciadores universais para fungos, ITS1 e ITS4, que têm seqüências homólogas às regiões que flanqueiam os segmentos ITS1 e ITS2 do gene 5.8S

rRNA. A amplificação dessa região tem sido extensamente utilizada com finalidade taxonômica e filogenética por ser altamente conservada (WHITE *et al.*, 1990). Outros dois iniciadores foram desenhados com base na sequência interna à região ITS1 e ITS2 do genoma da *F. pedrosoi*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.gov>. Esses iniciadores são específicos para a *F. pedrosoi* e, portanto, permitem a identificação molecular da espécie. Esses iniciadores foram produzidos pela *Life Technologies* do Brasil (São Paulo), receberam a denominação de ITSA e ITSAS.

Para a execução da reação de PCR com iniciadores universais, foram adotadas condições iniciais previamente descritas (ATTILI *et al.*, 1998). Os constituintes da reação de PCR foram utilizados nas seguintes concentrações finais: 10 mM de deo-xinucleotídeos (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil, São Paulo, Brasil), tampão de PCR [Tris-HCl a 75 mM, pH 9,0; KCl a 50 mM; MgCl₂ a 2 mM e (NH₄)₂ SO₄ a 20 mM], 2 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools B & M Labs, Espanha), 10 mM de iniciadores universais e 200 ng de DNA genômico.

As reações de PCR com iniciadores universais foram realizadas no termociclador automático PTC-200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, EUA) programado com uma etapa inicial de: 96°C por 4 min; 30 ciclos de: 94°C por 1 min, 58°C (temperatura de hibridização) por 1 min, 72°C por 1 min e 30 s; e etapa final de: 72°C por 10 min.

As análises das concentrações finais dos iniciadores específicos e da temperatura de hibridização da reação de PCR tiveram como objetivo a obtenção de sinais de amplificação com sensibilidade e especificidade adequadas. As concentrações finais de iniciadores específicos variaram de 5

mM a 10 mM, e a temperatura de hibridização variou de 54°C a 62°C. Essas condições foram avaliadas tanto na reação de PCR individual (com iniciadores específicos), quanto na reação PCR-*duplex*, em que ambos os iniciadores estavam presentes na reação.

Os produtos de PCR foram diluídos 6:1 (v/v) no tampão de amostra para ácido nucléico e o padrão de tamanho molecular DNA de 100 bp (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil, São Paulo, Brasil) foi diluído em 1:6 (v/v). O gel foi submerso em tampão TBE e foram aplicados 12 µl de cada amostra de DNA e 5 µL do marcador de peso molecular.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 30 min, utilizando fonte de energia (Amersham Pharmacia Biotech LKB modelo EPS 200 – Uppsala, Suécia). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 mg/L por 10 min e as bandas de produtos de PCR foram visualizadas sob luz UV utilizando-se o sistema de fotodocumentação descrito no item 5.

Posteriormente, foi desenhado outro iniciador *na posição sense* (ITSA1) para aumentar a especificidade do ensaio de PCR-*duplex* para identificação de cepas de *F. pedrosoi*. Esse iniciador foi desenhado com base em resultados de sequenciamento de DNA de várias cepas de *F. pedrosoi*, conforme descrito na página 39.

As condições ideais encontradas na reação da PCR-*duplex* com os iniciadores universais (ITS1/ITS4) e específicos (ITSA/ITSAS), serviram de base para a padronização da reação com o iniciador específico ITSA1.

6. Genotipagem das cepas de *F. pedrosoi* por RAPD e RFLP

6.1. Genotipagem por RAPD

A tipagem de cepas de *F. pedrosoi* isoladas de pacientes do HC/USP foi realizada pelos métodos de *random amplified polymorphic DNA (RAPD)* e *Restriction fragment length polymorphism (RFLP)*. Esse procedimento foi executado na *Unitat de Microbiologia de la Facultat de Medicina da Univerditat Rovira i Virgili*, na cidade de Réus, Espanha, sob orientação do Prof. Dr. Josep Guarro.

No RAPD, os elementos *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)* e *Repetitive Extragenic Palindromic (REP)* foram amplificadas por PCR utilizando iniciadores pequenos e aleatórios de 17 a 21 pb (Gillings *et al*; Metha *et al*, 2002). Os iniciadores empregados nos ensaios de ERIC-PCR (sense: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGTTCAC-3' e anti-sense: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') e de REP-PCR (sense: 5'-IIICGICGICATCIGGC 3' e anti-sense: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC 3') foram sintetizados pela Sigma (Genosys- UK).

Os ensaios de ERIC-PCR e REP-PCR foram realizados em 50 µL contendo tampão de PCR (20mM TRIS - HCl, pH8,4; 50mM KCl) e 3 mM de MgCl₂, 10 mM dNTP (Roche, Madrid, ES), 1µM de cada iniciador, 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA), 1µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico.

As reações de amplificação foram desenvolvidas no termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkim Elmer, Forster City, USA). Para o ensaio ERIC-PCR, foi empregada a seguinte programação: 1 ciclo de 94°C 1 min; 30 ciclos de 52 °C 1 min, 65°C 8 min e 1 ciclo de 65°C 16 min. Para o REP-PCR,

foi utilizada a programação: 1 ciclo de 94°C 1 min; 30 ciclos de 40 °C 1 min, 65°C 8 min; e 1 ciclo de 65°C 16 min. Os produtos de ERIC-PCR e REP-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em tampão TBE durante 2 horas a 500 volts. Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5 mg/L durante 30 minutos. As reações foram realizadas em duplicadas e somente bandas reprodutíveis foram analisadas.

6.2. Genotipagem por RFLP

No RFLP, a região ITS1, o gene 5.8S e a região ITS2 do genoma da *F. fonseceae*, de aproximadamente 1800 pb, foi amplificada por PCR empregando o conjunto de iniciadores específicos ITS5/NL4 (WHITE *et al.*, 1990; O'DONNELL, 1993).

O ensaio de PCR foi realizado em 50 µL contendo tampão de PCR (20mM TRIS - HCl, pH8,4; 50mM KCl) e 1,8 mM de MgCl₂; 10 mM dNTP (Roche, Madrid, ES), 2U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, USA), 10 pmol de cada iniciador (Sigma - Genosys- UK), 100 ng de DNA genômico. A PCR foi realizada em termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Foster City, USA). Foi utilizada a seguinte programação: 1 ciclo de 95°C 5 min; 35 ciclos de 95 °C 1 min, 55°C 2 min e 72°C 2 min e 30 seg e 1 ciclo de 72°C 7 min. Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os produtos gerados foram purificados através do kit GFX PCR and GEL band Purification KIT (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England).

Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Dde*I (Promega, Madison, USA) e *Taq*I (Gibco, Madrid, ES). As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Após a digestão, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 17%

em tampão TBE durante 2 horas a 500 volts. O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 mg/L.

7. Identificação molecular de *F. pedrosoi* por sequenciamento de DNA

Para a identificação molecular das cepas de *F. pedrosoi* por sequenciamento de DNA, algumas regiões do complexo rDNA foram amplificadas por PCR empregando os conjuntos de iniciadores NS7/ITS2, ITS1/ITS4 e ITS3/NL4 (O'DONNELL, 1993; WHITE *et al.*, 1990), conforme mostrado na **figura 6**.

Figura 6. Representação do complexo rDNA com os genes 18S, 5.8S, 28S, as regiões espaçadoras transcritas internas (ITS1 e ITS2) e o conjunto de iniciadores NS7/ITS2, ITS1/ITS4 e ITS3/NL4 utilizados no sequenciamento.

Os iniciadores universais NS7 e ITS2 (WHITE *et al.*, 1990) foram utilizados com a finalidade de gerar um produto que compreendesse uma sequência anterior a região ITS1(18S) e parte da região ITS1. Sendo possível, desta maneira, encontrar um ponto de homologia entre as sequências (ITS1 e ITS4; NS7 e ITS2) quando essas fossem comparadas. Excetuando-se a temperatura de hibridização, que neste caso foi de 66°C, foram empregadas as mesmas concentrações de reagentes e condições da reação de PCR utilizadas para o conjunto de iniciadores ITS1 e ITS4. Com a finalidade de encontrar um

ponto de homologia entre as seqüências (ITS1 e ITS4; ITS3 e NL4) foi também utilizado mais um conjunto de iniciadores, ITS3 e NL4 (WHITE *et al.*, 1990; O'DONNELL, 1993) e, neste caso, o produto amplificado seria parte da seqüência da região ITS2 e parte da região 28S. As concentrações dos reagentes e as condições da reação de PCR também foram as mesmas utilizadas para o conjunto de iniciadores ITS1 e ITS4, com temperatura de hibridização de 65°C.

Os equipamentos e condições utilizados para amplificação, eletroforese, revelação, captura e análises de imagens foram os mesmos utilizados nas reações com os iniciadores ITS1 e ITS4.

Além das amostras de *Fonsecaea pedrosoi*, algumas cepas de outras espécies de fungos demácios também foram amplificadas pelos iniciadores NS7/ITS2, ITS1/ITS4 e ITS3/NL4 para posterior sequenciamento.

Os produtos de PCR gerados foram avaliados por eletrofores em gel de agarose a 1% e purificados utilizando o sistema de purificação QIAquick® Spin Handbook (Qiagen, Madrid, ES), conforme orientação do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 2% no qual também foi aplicado o padrão de massa molecular, Low DNA mass ladder (Invitrogen) e sequenciados.

O sequenciamento das amostras foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano, que utiliza um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia Amersham Biosciences. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante para o sequenciador MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As

seqüências foram analisadas pelo *software Sequence Analyser* utilizando a *Base Caller Cimarron 3.12*.

As seqüências foram editadas utilizando o aplicativo *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 5.0.9 (Tom Hall, Department of Microbiology, North Caroline State University).

As seqüências foram pareadas e os pontos de homologia entre as cepas foram comparados com as seqüências disponíveis no banco de genes do endereço <http://www.ncbi.nlm.gov>.

8. Antifungigrama pela técnica de diluição em ágar

Considerando-se que quase todos os pacientes (tabela 1) encontravam-se sob tratamento com itraconazol, alguns durante anos, determinou-se, então, o perfil de suscetibilidade dos fungos sequencialmente isolados dos pacientes a droga em questão.

Os testes foram realizados pela técnica de diluição em ágar, segundo metodologia padronizada para esses fungos por Andrade e Cury (1999).

O itraconazol foi obtido sob a forma de pó (JANSSEN PHARMACEUTICA N.V., Beerse, Bélgica; lote ZR051211PUB381) e conservado em dessecador, a vácuo, a 4°C.

8.1. Diluições do antifúngico

A solução estoque de itraconazol (1000µg/mL) foi preparada em dimetilssulfóxido (DMSO; SIGMA, St. Louis, EUA), Volumes de 10 mL foram distribuídos em tubos de ensaio e conservados a -20°C. A partir dessa solução,

foram preparadas diluições seriadas, ao dobro, em caldo YNBP (Andrade e Cury, 1999) contendo 320µg/mL a 0,6µg/mL da droga (solução trabalho). As concentrações finais de itraconazol nos testes de sensibilidade variaram de 16µg/mL a 0,03µg/mL.

A partir de cada diluição da droga, foram transferidos 2 mL para um tubo contendo 1,0 mL de meio de reserva (Andrade e Cury, 1999). Após homogeneização, a mistura foi mantida a -20°C até o momento da execução do teste de sensibilidade.

8.2. Inóculo

Com base nos resultados obtidos em estudos preliminares (Andrade e Cury, 1999), adotou-se como inóculo, suspensão contendo, em cada mL, cerca de 4×10^4 células, com 14 dias de crescimento em ágar batata a 30°C. A cepa controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada com 24 horas de crescimento em ágar Sabouraud a 30°C.

Preparação

Com auxílio de alça em anel, a superfície da colônia do fungo em estudo foi cuidadosamente raspada e transferida para tubo contendo 5 mL de água e 4 pérolas de vidro. O tubo foi submetido à agitação vigorosa em agitador por 1 minuto, a fim de se obter separação ótima das células hifálicas. A suspensão resultante foi centrifugada a 1500 rpm. durante 15 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado duas vezes, sob centrifugação, com 3 mL de água e finalmente suspenso em 5 mL de tampão de fosfato 0,01M contendo Tween 80. Volume de 1 mL foi transferido para tubo com 9 mL desse

tampão e a suspensão foi ajustada para 200 células em 5 μ L ou 4 x 10⁴ células/mL. A partir de ensaios preliminares, foi possível verificar que essa concentração de células, alcançada com auxílio de câmara de Neubauer (Hirschmann Em Techolor, Eberstadt, Germany), possuía turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Assim, nos testes posteriores, o ajuste do inóculo foi realizado por meio de comparação da turvação com esse padrão.

8.3. Execução do teste de concentração inibitória mínima (CIM)

As diferentes diluições do antifúngico foram descongeladas e o ágar tampão fosfato (Andrade e Cury, 1999) foi fundido e estabilizado a temperatura de 56°C. Volume de 3mL de cada diluição foi adicionado a 17mL de meio; a mistura foi homogeneizada e vertida em placa de Petri. Após geleificação dos meios nas placas, foram aplicados 5 μ L de cada inóculo na superfície dos mesmos. Esse procedimento permitiu a aplicação de 24 inóculos por placa. Estas foram mantidas à temperatura ambiente até completa absorção dos inóculos e, em seguida, colocadas a 30°C até crescimento das cepas no controle sem droga (positivo). De modo geral, o desenvolvimento de colônias ocorreu entre o 3º e o 4º dia de incubação, alcançando crescimento máximo no 7º dia, quando, então, realizou-se a última leitura. A CIM para a cepa controle foi determinada com 24 horas de incubação.

Em cada teste foram incluídas três placas contendo, respectivamente, caldo YNBP-ágar YNBP(3:17), como controle de crescimento positivo, DMSO a 0,1%-ágar YNBP (3:17), para controle de interferência do solvente e formaldeído a 0,5%-ágar YNB (3:17), como controle de crescimento negativo

Foi considerada concentração inibitória mínima, a menor concentração da droga que impediu visível crescimento de um determinado fungo.

9. Análise dos resultados

Para a análise dos testes de sensibilidade, o valor final da CIM do itraconazol, frente a uma determinada cepa, foi obtido por meio da média geométrica dos valores encontrados no teste realizado em triplicata.

O estabelecimento de sensibilidade ou de resistência das cepas frente as drogas em estudo, foi baseado nos níveis séricos alcançados pelas drogas. Assim, foram consideradas sensíveis ao itraconazol as cepas que responderam a CIMs $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$ (Bennett, 1996; Richardson e Warnock, 1993).

Os dados das técnicas de genotipagem foram analisados considerando a presença ou ausência de bandas. A matriz distante foi construída pela média aritmética do pareamento de peso molecular (UPGMA), usando o coeficiente *band-matching Dice* (S_D), do aplicativo *Bionumerics*, versão 1.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os valores *bootstrap* acima de 76% foram considerados.

Os dados obtidos no seqüenciamento foram pareados utilizando o método *Neighbor-Joining* do aplicativo *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 5.0.9 (Tom Hall, Department of Microbiology, North Caroline State University).

V – RESULTADOS

RESULTADOS

1. Estudos fenotípicos macroscópicos

Nos estudos morfológicos macroscópicos, foram incluídas as cepas de pacientes HC/USP e cepas de pacientes provenientes de outros centros. As amostras de fungos demácios diferentes de *F. pedrosoi* não foram avaliadas neste item.

Os resultados dos estudos macroscópicos permitiram observar pouca variação entre as cepas de *F. pedrosoi* analisadas. Todas apresentaram taxa de crescimento considerada média (de três a sete dias), exceto a cepa T62 (Tabela 3) que apresentou crescimento lento (12 dias).

Quanto ao aspecto topográfico, todas as cepas desenvolveram colônias circulares, com centro saliente e aspecto seco; 57,3% tinham bordas lisas, 90% possuíam faixas concêntricas de cores diferentes (zoneado), 30% eram planas, 25% tinham sulcos ou pregas e 10% eram radiais. Todas as colônias apresentaram textura velutina e pigmento melanina. Nenhuma continha exsudato. Essas características correspondem às descrições de *F. pedrosoi* encontradas na literatura pertinente.

2. Estudos fenotípicos microscópicos

Todas as cepas (n = 104) de fungos demácios descritas no item 3.2 foram submetidas aos estudos morfológicos microscópicos. Observou-se conidiogênese do tipo cladosporium (**Figura 7**), conidiogênese mista dos tipos cladosporium e fialófora (**Figura 8**) e conidiogênese do tipo rinocladiela (**figura 9**).

Os estudos microscópicos possibilitaram a identificação de 64 isolados de *F. pedrosoi* das 104 analisadas. Todos os isolados primários (n=19) das cepas dos pacientes HC/USP (**Tabela 2 e 3**) foram identificados como *Fonsecaea pedrosoi*. Quatro cepas isoladas de amostras sequenciais (**Tabela 2**) de dois pacientes, JDN (T28 e T32) e OP (T63 e T68), não puderam ser identificadas por meio de morfologia microscópica. Mesmo após microcultivo em agar-água, não produziram nenhum tipo de conidiogênese (**Figura 10**), embora os primeiros isolados desses pacientes (JDN, T12 e OP, T56) tenham sido do tipo cladosporium (**Figura 11**) e, portanto, identificados como *F. pedrosoi*. Outra cepa que também não pôde ser identificada morfologicamente devido a falta de conidiogênese foi a T15 (**Tabela 4**).

Nas cepas T54 (**Tabela 3**) e T59 (**Tabela 4**) foi observado um grande número de conidiogênese do tipo fialófora e rinocladiela, respectivamente. Entretanto, como em alguns campos foi observado o tipo cladosporium, os isolados foram considerados como sendo *F. pedrosoi*. A amostra T49 (**Tabela 4**) mostrou conidiogênese típica de *Exophiala* spp (**figura 12**), a amostra T62 (**Tabela 4**) apresentou morfologia típica de *Rhinocladiella* spp que, somada ao crescimento lento, característico do gênero, confirmou esse achado.

Figura 7. Fotomicrografia da cepa *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, com conidiogênese tipo cladosporium.

Figura 8. Fotomicrografia da cepa *Fonsecaea pedrosoi* T19, com dois tipos de conidiogênese: cladosporium e fialófora.

Figura 9. Fotomicrografia da cepa *Fonsecaea pedrosoi* T19, com conidiogênese do tipo rinocladiela.

Figura 10. Fotomicrografia da cepa T68 (terceiro isolado do paciente O. P.), com ausência de conidiogênese.

Figura 11. Fotomicrografia da cepa *Fonsecaea pedrosoi* T56 (primeiro isolado do paciente O. P.), com conidiogênese tipo cladosporium.

Figura 12. Fotomicrografia da cepa T49, com conidiogênese característica do gênero *Exophiala*.

As cepas provenientes de outros centros que não eram *F. pedrosoi* (n=33) (Tabela 3) apresentaram morfologia microscópica compatível com a descrita na literatura, sendo, então, identificadas como: *Phialophora verrucosa* (sete cepas; **Figura 13**), *Exophiala jeanselmei* (três cepas; **Figura 14**), *Exophiala spinifera* (duas), *E. dermatidis* (três), *Fonsecaea compacta* (duas), *Cladophialophora carrionii* (três) (**Figura 15**), *Cladophialophora bantiana* (três)

de *Rhinocladiella aquaspersa* (três) (**Figura 16**), *Exophiala wernecki* (duas), *Piedraia hortae* (uma) e *Rhinocladiella atrovirens* (uma). Duas cepas (IMTSP 373 e CBS 285/47), primeiro identificadas como *F. compacta*, não puderam ser confirmadas devido a falta de conidiogênese. Uma outra cepa (IMTSP 154), também inicialmente identificada como *F. compacta*, apresentou somente esporulação tipo fialófora, não correspondendo dessa forma com a identificação morfológica inicial.

Figura 13. Fotomicrografia da cepa *Phialophora verrucosa* IMTSP 73, mostrando conidiogênese fialídica com constricção na base do colarete em forma de taça e fialoconídios.

Figura 14. Fotomicrografia da cepa *Exophiala jeanselmei* IMTSP 178, apresentando conidiogênese anelídica com aneloconídeos.

Figura 15. Fotomicrografia da cepa *Cladophialophora carrionii* IMTSP 68, mostrando conidióforos longos, septados, que formam cadeias longas e ramificadas de conídios ovais.

Figura 16. Fotomicrografia da cepa *Rhinocladiella aquaspersa* IMTSP 776, mostrando conidióforos simples, simpodiais, com conídios acropleu-rógenos.

3. Identificação molecular da *F. pedrosoi* por PCR-*duplex*

3.1. Avaliação e quantificação do DNA genômico

Todas as cepas de *F. pedrosoi* analisadas por microscopia tiveram seu DNA genômico extraído pelo método proposto. As amostras de DNA de cepas isoladas de pacientes do HCFM/USP apresentaram integridade adequada, conforme pode ser observado na **figura 17**.

Quanto à pureza das amostras de DNA, a variação da razão A260/A280 foi de 1,4 a 1,8. A variação de concentração de DNA nas amostras foi de 48 a 292 $\mu\text{g/mL}$. As amostras que apresentaram concentrações inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ foram extraídas novamente.

Figura 17. Análise de DNA genômico de *F. pedrosoi* por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Linha 1: padrão de tamanho molecular de DNA de 1 Kb; linhas 2 a 14: amostras 12, 28, 19, 27, 29, 30, 20, 22, 41, 45, 46, 51 e 84, respectivamente.

3.2. Padronização da PCR individual

Para amplificação da região genômica de ITS1 a ITS2 de cepas de diferentes gêneros de fungos, foram empregados iniciadores universais, que permitem amplificar um segmento de 644 bp. Para amplificação da região genômica ITS1 a ITS2, específica para o gênero *Fonseceae*, foram empregados os iniciadores específicos ITSA e ITSAS que permitem amplificar um segmento de aproximadamente 200 bp.

Para o ensaio de PCR com iniciadores universais, a concentração final de iniciadores foi de 10 mM cada e a temperatura de hibridização foi de 58 °C, conforme previamente relatado (ATTILI *et al.*, 1998). Nessas condições, foi

possível produzir o produto de PCR de 644 pb, que corresponde a amplificação da região genômica ITS1 a ITS2 da cepa *F. pedrosoi* (ATCC46428), conforme pode ser observado na **figura 18, linhas 1 e 2**.

Na PCR com iniciadores específicos para *Fonsecaea*, foram utilizadas as mesmas condições da PCR com iniciadores universais, variando-se a temperatura de hibridização entre 54°C e 62°C. Conforme pode ser observado na **figura 19 (linhas 1 a 6)**, houve amplificação da amostra de DNA de *F. pedrosoi* ATCC46428 nas temperaturas de hibridização de 54°C a 60°C. Adicionalmente, não foram observados produtos inespecíficos (produtos de tamanho diferente do esperado) nessas temperaturas. Determinamos que a temperatura de 58°C era a mais adequada, por ser a utilizada com sucesso na PCR com iniciadores universais, e por possibilitar a geração dos dois produtos PCR nas mesmas condições de amplificação.

Figura 18. Análise dos produtos de PCR com iniciadores universais para fungos por eletroforese em gel de agarose a 1%. Linha 1: produto de PCR da cepa *F. pedrosoi* ATCC46428; linha 2: produto de PCR da cepa *F. pedrosoi* T 12; linha 3: controle dos reagentes; linha 4: padrão de tamanho molecular de DNA de 100bp.

Figura 19. Análise dos produtos de PCR gerados em diferentes temperaturas de hibridização com iniciadores específicos para *F. pedrosoi* (cepa ATCC 46428), por eletroforese em gel de agarose a 1%. Linhas 1 a 7 e 9: temperaturas de hibridização de 54°C, 55°, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C e 62°C, respectivamente; linha 10: controle dos reagentes; linhas 8 e 16: padrão de tamanho molecular de DNA de 100 bp.

3.3. Padronização da PCR - *duplex*

Com base na padronização dos ensaios de PCR com iniciadores universais e específicos isoladamente, foi realizada a PCR com os dois conjuntos de iniciadores (PCR-*duplex*). Foram utilizadas as mesmas concentrações dos constituintes e condições de amplificação (tempos, temperatura e número de ciclos) da PCR com iniciadores universais. Como pode ser observado na **figura 20**, foi possível amplificar os dois produtos (644 bp e 200 bp) na PCR-*duplex* (**figura 20, linhas 4 e 7**) e nas reações com iniciadores universais (**figura 20, linhas 2 e 5**) e específicos para *F. pedrosoi* (**figura 20, linhas 3 e 6**) isoladamente.

Ao analisar os sinais de amplificação, verificou-se a intensidade do produto específico (200 bp) para *F. pedrosoi* foi menor (**figura 20, linhas 4 e 7**) na PCR-*duplex* do que a dos produtos gerados na PCR individual com iniciadores específicos isolados (**figura 20, linha 3**). Além disso, observamos a presença de bandas de tamanho maior que o esperado (inespecíficas) nas reações em que estavam presentes os iniciadores universais (**figura 20, linhas 2, 4, 5 e 7**). Esses resultados indicam excesso de iniciadores na PCR-*duplex*.

Com a finalidade melhorar a sensibilidade da reação dos iniciadores específicos na PCR-*duplex*, foram reduzidas a concentração dos iniciadores universais (metade da dos iniciadores específicos) e a temperatura de hibridização. Assim, na PCR-*duplex*, foram testadas concentrações finais de 5 mM para os iniciadores universais e de 10 mM e 20 mM para os iniciadores específicos. A temperatura de hibridização selecionada nesse teste foi de 55°C, que gerou produto específico com maior intensidade que a 58°C na PCR com iniciadores isolados (**figura 21, linha 2**).

Como se observa na **figura 21**, os produtos de PCR individuais gerados na presença de 10 mM de iniciadores universais (**linha 4**) ou 10 mM de iniciadores específicos (**linha 5**) apresentaram sinais similares aos previamente mostrados (**figuras 19 e 20**).

Na PCR-*duplex*, quando se utilizou 5 mM de iniciadores universais (**figura 21, linhas 2,3,6 e 7**), o sinal do produto específico (200 pb) foi significativamente mais intenso que o observado anteriormente (**figura 20**).

Essa intensidade foi maior ainda quando se dobrou a concentração (20 mM) de iniciadores específicos na reação de PCR-*duplex* (figura 21, linha 3). Embora a redução da concentração de iniciadores universais tenha melhorado o sinal do produto específico, na PCR-*duplex*, ainda se observou presença de produtos inespecíficos (tamanho superior a 644 pb). Isso provavelmente ocorreu porque em temperaturas de hibridização mais baixas, como a testada (55°C), há maior probabilidade de formação de produtos inespecíficos.

Cabe ressaltar que nessas condições, a PCR-*duplex* permitiu discriminar cepas de *F. pedrosoi* (figura 21, linhas 6 e 7) de cepas de outras espécies de fungos, como a *E. dermatitidis*, que gerou um único produto de 644 bp na PCR-*duplex* (figura 21, linhas 8). Além disso, a reação de PCR-*duplex* permitiu a identificação da cepa T68 como *F. pedrosoi* (figura 21, linha 7), cepa que não foi possível identificar pelo estudo morfológico microscópico.

Quando as concentrações de iniciadores universais e específicos foram mantidas em 5 mM e 10 mM, e foi utilizada a temperatura de hibridização de 58°C, a PCR-*duplex* deixou de gerar produtos inespecíficos, revelando especificidade adequada, como se pode observar na figura 22.

Figura 20. Análise dos produtos de PCR gerados com iniciadores universais e específicos para *F. pedrosoi*, por eletroforese em gel de agarose 1%. Linha 1: padrão de tamanho molecular de DNA de 100 bp; linhas 2 e 5: produtos de PCR com iniciadores universais das cepas *F. pedrosoi* ATCC46428 e T12, respectivamente; linhas 3 e 6: produtos de PCR com iniciadores específicos das cepas *F. pedrosoi* ATCC46428 e T12, respectivamente; linhas 4 e 7: produtos de PCR-*duplex* das cepas *F. pedrosoi* ATCC46428 e T12, respectivamente.

Figura 21. Análise dos produtos de PCR para identificação de *F. pedrosoi*, por eletroforese em gel de agarose 1%. Linha 1: padrão de tamanho molecular de DNA de 100 bp; linhas 2 e 3: produtos de PCR-*duplex* (cepa *F. pedrosoi* ATCC46428) gerados com iniciadores universais (5 mM) e específicos (10 mM e 20 mM, respectivamente); linhas 4 e 5: produtos de PCR (cepa *F. pedrosoi* ATCC46428) gerados com iniciadores universais (10 mM) e específicos (10mM), respectivamente; linhas 6 a 8: produtos de PCR gerados com iniciadores universais (5 mM) e específicos (10 mM) das cepas *F. pedrosoi* T56, *F. pedrosoi* T68 e *Exophiala dermatitidis* (IMTSP 581), respectivamente.

Figura 22 – Análise dos produtos de PCR-*duplex* para identificação de *F. pedrosoi*, por eletroforese em gel de agarose 1%. Linha 1: padrão de tamanho molecular de DNA de 100 bp; linhas 2 a 6: produtos de PCR-*duplex* das cepas *F. pedrosoi* T21, T22, T33, T35 e T37, respectivamente; linha 7: produto de PCR-*duplex* da cepa *Exophiala spinifera* (IMTSP 976).

Com a finalidade de tornar o ensaio de PCR-*duplex* ainda mais específico, foi desenhado o iniciador ITSA1 a partir dos resultados de sequenciamento de DNA de 6 cepas de *F. pedrosoi*.

Para avaliar o desempenho do ensaio de PCR-*duplex* com o novo conjunto de iniciadores específicos, foram empregadas as concentrações de reagentes e condições de amplificação previamente padronizadas para a PCR-*duplex* com iniciadores ITS1/ITS4 e ITSA/ITSAS.

Na **figura 23**, são mostrados produtos de PCR, gerados em diferentes temperaturas de hibridização (55 a 59 °C), com iniciadores universais (ITS1/ITS4, linhas 8 a 13), iniciadores específicos (ITSA1/ITSAS), linhas 14, 16-20) e com ambos conjuntos de iniciadores (linhas 2 a 7). Como é possível

observar, o produto de PCR específico para *F. pedrosoi* gerado pelo conjunto ITSA1/ITSAS tem tamanho molecular aproximado de 117 pb.

Figura 23. Análise dos produtos de PCR para identificação de *F. pedrosoi*, por eletroforese em gel de agarose 1%. Linhas 1 e 15: padrão de tamanho molecular de DNA de 100 bp; linhas 2 a 7: produtos de PCR-*duplex* das cepas *F. pedrosoi* ATCC 46428 e T50; linhas 8 a 13: produtos de PCR com iniciadores universais; linhas 14 e 16 a 20: produtos de PCR com iniciadores específicos ITSA1/ITSAS. Temperaturas de hibridização de 55°C (linhas 2, 5, 8, 11, 14 e 18), 57°C (linhas 3, 6, 9, 12, 16 e 19) e de 59°C (linhas 4, 7, 10, 13, 17 e 20).

3.4. Estudos de identificação molecular por PCR – *duplex*

Todas as 64 cepas identificadas morfológicamente como *F. pedrosoi* foram positivas para *Fonsecaea* por PCR-*duplex* com os iniciadores ITS1/ITS4 e ITSA/ITSAS (43 amostras de pacientes HC/USP seqüenciais, 8 não seqüenciais e 13 provenientes de outros centros).

Quatro cepas (**Tabela 2, página 32**), duas do pacientes JDN (T28 e T32) e duas do pacientes OP (T63 e T68) que não foram passíveis de serem identificadas morfologicamente, também foram positivas na PCR-*duplex*. A **Figura 21, linha 7**, mostra a cepa T68 amplificada pelos iniciadores específicos para *F. pedrosoi*.

As amostras não *F. pedrosoi* (**Tabela 4, página 34 e 35**) apresentaram apenas o fragmento de 644 bp (**Figura 24, linhas 2 a 5**), gerado pelos iniciadores universais presentes na PCR-*duplex*, sendo, portanto, negativas para *F. pedrosoi*, inclusive para amostras de *Fonsecaea compacta* (IMTSP 154, IMTSP 885, IMTSP 373, CBS 285/47).

Por outro lado, três cepas (**Tabela 4, página 34 e 35**) que foram identificadas morfologicamente como *Fonsecaea compacta* (T8/IMTSP877), *Exophiala* spp (T49), *Rhinocladiella* spp (T62), também foram positivas para a PCR-*duplex* com o conjunto de iniciadores específicos inicialmente proposto.

Figura 24. Análise dos produtos de PCR utilizando iniciadores universais e específicos (ITSA/ITSAS) para *F. pedrosoi*, por eletroforese em gel de agarose 1%. Linha 1: padrão de tamanho molecular de DNA de 100 bp; linhas 2 a 5: amostras de *Phialophora verrucosa* (IMTSP 2214), *Cladophialophora carrioni* (IMTSP 690), *Rhinocladiella aquaspersa* (IMTSP 691) e *Phialophora verrucosa* (IMTSP 887), respectivamente; linhas 6 a 8: amostras de *Fonsecaea pedrosoi* (T11, T12 e T17, respectivamente).

Na reação com o conjunto de iniciadores ITS1/ITS4 e ITSA1/ITSAS, 62 amostras foram positivas para a PCR-*duplex*. Duas cepas T54 (Tabela 2) e T59 (Tabela 3) identificadas inicialmente como *F. pedrosoi* e que foram positivas com os iniciadores (ITSA/ITSAS) não amplificaram com os iniciadores específicos (ITSA1 e ITSAS), como mostra a **figura 25**, linhas 20 e 23. As cepas provenientes não *F. pedrosoi* também não amplificaram com os iniciadores ITSA1/ITSAS.

Também foram positivas para a PCR-*duplex* com o conjunto de iniciadores ITSA1/ITSAS as cepas dos pacientes JDN (T28 e T32) e OP (T63 e T68) que não apresentavam morfologia típica de *F. pedrosoi* e que foram positivas para a PCR-*duplex* com o par de iniciadores ITSA/ITSAS. Resultados similares foram observados para as cepas de: *Fonsecaea compacta* (T8/IMTSP877) *Exophiala* spp (T49) (**Fig 25, linha 14**), *Rhinocladiella* spp (T62) que apresentaram positividade para a PCR-*duplex* no ensaio com iniciadores ITSA/ITSAS.

Figura 25. Análise dos produtos de PCR utilizando iniciadores universais e específicos (ITSA1/ITSAS) para *F. pedrosoi*, por eletroforese em gel de agarose 1%. **Linha 1 e 15:** padrão de tamanho molecular de DNA de 100 bp; **linhas 2 a 14 e 16 a 28:** amostras de *Fonsecaea pedrosoi* T36, T37, T38, T39, T40, T41, T42, T65, T44, T45, T46, T47, T48, T49, T72, T51, T53, T54, T55, T57, T59, T66, T67, T69, T70, T71, respectivamente.

Portanto, podemos observar (tabelas 5 e 6) que a sensibilidade foi praticamente a mesma para os dois conjuntos de iniciadores, 90% para ITSA/ITSAS e 89,8% para ITSA1/ITSAS e a especificidade foi de 94% para ITSA1/ITSAS e de 100% para ITSA/ITSAS.

Tabela 5. Resultados da identificação morfológica e genética das cepas de *Fonsecaea pedrosoi* com os iniciadores ITSA/ITSAS, Total de cepas(n=104).

	PCR-duplex positiva	PCR-duplex negativa	Total
Identificação morfológica positiva	64	0	64
Identificação morfológica negativa	7	33	40
Total	71	33	104

Tabela 6. Resultados da identificação morfológica e genética das cepas de *Fonsecaea pedrosoi* com os iniciadores ITSA1/ITSAS, Total de cepas(n=104).

	PCR-duplex positiva	PCR-duplex negativa	Total
Identificação morfológica positiva	62	2	64
Identificação morfológica negativa	7	33	40
Total	69	35	104

4. Genotipagem das cepas de *F. pedrosoi* por RAPD e RFLP

Para as análises de genotipagem molecular com as técnicas de RAPD (ERIC/REP) e RFLP foram selecionadas 47 cepas de *F. pedrosoi* isoladas sequencialmente de 11 pacientes com cromoblastomicose em tratamento com itraconazol. (tabela 2, página 32)

4.1 ERIC-PCR

Nas reações ERIC-PCR foram gerados produtos de tamanho molecular de 154 pb a 1500 pb. Os perfis eletroforéticos apresentaram 14 (ATCC 46428) a 25 bandas (T57, T78, T71, dados não mostrados). De modo geral, as amostras isoladas do mesmo paciente revelaram perfis semelhantes. Na **figura 26** podemos observar alta similaridade no perfil eletroforético entre as amostras do paciente JZN (T26₁ a T72) praticamente um mesmo perfil, com apenas algumas bandas diferentes. A mesma análise pode ser aplicada nas amostras do paciente JRS (T82 e T83). Ainda nessa figura, podemos verificar o perfil gerado pelas cepas ATCC 46428 e T50, esta última aplicada em todos os géis como controle da reação.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Figura 26 - Análise dos produtos gerados pela técnica de ERIC-PCR separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% - Linhas 1 e 11: marcador de tamanho molecular de DNA marker *VI*. Linhas 2 a 10, amostras de *Fonsecaea pedrosoi* T26₁, T26₂, T41, T45, T72, T82, T83, ATCC 46428 e T50, respectivamente.

Os resultados da técnica de ERIC-PCR foram analisados com base na comparação do número de fragmentos com tamanhos moleculares similares entre as amostras (**Figura 27**). As que apresentaram 76% dos perfis similares foram agrupadas num mesmo tipo de perfil. Foram observados 11 tipos de perfis de ERIC-PCR. A maioria das amostras isoladas de um mesmo paciente apresentou o mesmo tipo de perfil ERIC-PCR. Esses resultados indicam a genética do elemento de repetição estudado entre as mesmas.

Figura 27 – Dendrograma construído com os dados do ERIC -PCR, mostrando a relação genética entre os 11 tipos de perfis, com 76% de similaridade, identificados em 46 isolados de *F. pedrosoi* de 11 pacientes.

5.2 REP- PCR

Nas reações REP-PCR foram gerados produtos de tamanho molecular de 154 pb a 1500 pb. Os perfis eletroforéticos apresentaram de 12 (T80) a 27 bandas (T60 e T63). Em 4 casos houve grande paridade entre as amostras de um mesmo paciente, dois deles estão demonstrados na **figura 28**, onde as amostras T60 e T63 do paciente OP e as amostras T64 e T67 do paciente AJO apresentaram perfis similares.

Figura 28 - Análise dos produtos gerados pela técnica REP-PCR separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% - Linha 1 e 8 marcador de tamanho molecular *marker* VI. Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, amostras de *Fonsecaea pedrosoi* T56, T60, T63, T68, T64 e T67, respectivamente.

Os resultados da técnica de REP-PCR foram analisados com base na comparação do número de fragmentos com tamanhos moleculares similares entre as amostras (**Figura 29**). As que apresentaram 76% dos perfis similares foram agrupadas num mesmo tipo de perfil. Foram observados 11 perfis de REP-PCR. Apesar da formação de 11 perfis, os mesmos não foram distribuídos por pacientes. As amostras do paciente AMJ apresentaram dois perfis diferentes: B (T19 e T29) e C (T27, T30, T75, T76, T80, T84), o mesmo ocorreu com as amostras do paciente OAS, que apresentou 3 perfis diferentes: D (T20, T31 e T50), E (T22, T57, T65 e T78) e F (T55, T70 e T71), outro paciente que apresentou mais de um perfil foi JMC: F (T36 e T46) e H (T43 e T47). Além disso, amostras de pacientes diferentes apresentaram um mesmo perfil, como por exemplo, amostras do paciente JZN com amostras do paciente JGL, amostras do paciente OP com as do paciente AJO e amostras do paciente JRS com as do JDN.

Quando os dados gerados pelos perfis obtidos por meio de ERICs e REPs foram combinados, obteve-se a formação de 15 genótipos (**tabela 7**). A maioria dos pacientes (n=8) teve suas amostras sequenciais classificadas como sendo de um mesmo genótipo. Entretanto, para as cepas sequenciais de outros três pacientes pode-se observar mais de um genótipo, sendo 2 tipos diferentes para as cepas dos pacientes AMJ e JMC e três para as cepas do paciente OAS.

Figura 29 – Dendrograma construído com os dados do REP - PCR, mostrando a relação genética entre os 11 tipos de perfis, com 76% de similaridade, identificados em 46 isolados de *F. pedrosoi* de 11 pacientes.

Tabela 7 - Análise dos dados gerados pelas técnicas de RAPD com 15 genótipos diferentes de 46 amostras sequenciais de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de 11 pacientes com cromoblastomicose.

Pacientes	n° cepa	REP	ERIC	genótipos
JDN	12	A	A	I
JDN	28	A	A	I
JDN	32	A	A	I
AMJ	19	B	B	II
AMJ	27	C	B	III
AMJ	29	B	B	II
AMJ	30	C	B	III
AMJ	75	C	B	III
AMJ	76	C	B	III
AMJ	80	C	B	III
AMJ	84	C	B	III
OAS	20	D	C	IV
OAS	22	E	C	V
OAS	31	D	C	IV
OAS	50	D	C	IV
OAS	55	F	C	VI
OAS	57	E	C	V
OAS	65	E	C	V
OAS	70	F	C	VI
OAS	71	F	C	VI
OAS	78	E	C	V
JZN	26	G	D	VII
JZN	41	G	D	VII
JZN	45	G	D	VII
JZN	72	G	D	VII
JGL	34	G	E	VIII
JGL	35	G	E	VIII
JMC	36	F	F	IX
JMC	43	H	F	X
JMC	46	F	F	IX
JMC	47	H	F	X
MFS	48	I	G	XI
MFS	51	I	G	XI
MFS	66	I	G	XI
MFS	77	I	G	XI
MFS	81	I	G	XI
OP	56	J	H	XII
OP	60	J	H	XII
OP	63	J	H	XII
OP	68	J	H	XII
AJO	64	J	I	XIII
AJO	67	J	I	XIII
FJO	73	K	J	XIV
FJO	79	K	J	XIV
JRS	82	A	K	XV
JRS	83	A	K	XV

4.3 PCR - RFLP

Os produtos de PCR para RFLP apresentaram tamanhos moleculares de 1400 pb (9 cepas) e de 1800 pb (37 cepas), (Anexo 2). A figura 30 mostra a diferença de tamanho molecular encontrada entre as cepas. Duas (T19 e T29) das 8 amostras do paciente AMJ apresentaram tamanhos moleculares diferentes, essa divergência também pôde ser observada para cepa T56 (1400pb) do paciente OP em relação as outras (T60, T63, T68) que mostraram pesos moleculares de 1800 pb. Para as amostras isoladas dos outros pacientes não houve variação de peso molecular, uma vez que todas apresentaram 1400 pb ou de 1800 pb.

Figura 30 - Análise dos produtos de PCR da região ITS gerados com os iniciadores ITS5 e NL4, em gel de agarose 1% - Linha 1, padrão de peso molecular de 100 bp linhas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 amostras de *Fonsecaea pedrosoi* T20, T19, T29, T31, T50, T76, respectivamente.

O perfil de restrição enzimática com *DdeI* revelou a presença de 6 fragmentos de restrição para 45 cepas analisadas (Figura 31). Para os produtos de 1400 pb o perfil apresentou dois sítios de restrição com tamanhos moleculares acima de 267pb, enquanto que, para os produtos de 1800pb,

foram observados três sítios de restrição. Apenas na amostra T56 do paciente OP foram observados 5 sítios de restrição, sendo 2 acima de 267 pb. A **figura 31** mostra dois perfis encontrados.

Figura 31 - Análise dos produtos gerados pela restrição enzimática *DdeI* em gel de poliacrilamida 17% - **Linha 1 e 8** padrão de peso molecular *marker V*. **Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7**, amostras de *Fonsecaea pedrosoi* T19, T29, T20, T31, T50, T76, respectivamente.

Na **figura 32**, podemos observar a presença de 3 a 7 sítios de restrição para a enzima *TaqI*. As amostras que apresentaram 1400 pb possuíam de 3 a 4 sítios de restrição, com exceção de 2 amostras (T81 e T68) com 1800 pb.

Figura 32 - Análise dos produtos gerados pela restrição enzimática *TaqI* em gel de poliacrilamida 17% - Linha 1 e 8 padrão de peso molecular *marker* V. Linhas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 amostras de *Fonsecaea pedrosoi* T19, T29, T20, T31, T50, T76, respectivamente.

Esses dados geraram o dendograma mostrado na **figura 33** para a enzima *DdeI*. Pode-se observar a formação de 4 grupos com similaridade de 100%. As amostras apresentaram 2 perfis gerais de restrição para essa enzima. Pode-se observar também que duas amostras dos pacientes AMJ (T29 e T19) e JZN (T26 e T41) ficaram em um outro grupo diferente das outras amostras desses pacientes. Um fato interessante foi observado para as amostras do paciente OP: o isolado T56 apresentou 87% de similaridade em relação aos isolados posteriores, que apresentaram 100% de similaridade entre si, porém foram agrupados no mesmo genótipo.

Para a enzima *TaqI*, foram gerados 4 perfis de restrição (**figura 34**) e verificou-se que 3 grupos apresentaram 100% de similaridade. Aqui, também observamos que as amostras T19 e T29 do paciente AMJ foram agrupadas

separadas das demais desse paciente. Esse fato também foi verificado para as amostras de outros pacientes: OP (T56 e T68), JZN (T26 e T41) e MFS (T51), agrupadas separadas das outras amostras desses pacientes.

Quando os dados gerados pelos perfis de RFLP *Ddel* e *TaqI* foram combinados, teve-se a formação de 6 genótipos (**tabela 8**). A maioria dos pacientes (n=7) teve suas amostras seqüenciais classificadas como sendo do mesmo genótipo. Porém, para as cepas seqüenciais de outros quatro pacientes pode-se observar mais de um genótipo, sendo dois tipos diferentes para as cepas dos pacientes JZN, MFS, OP e três para as cepas do paciente AMJ.

Figura 33 – Dendrograma construído com os dados do RFLP *Ddel* mostrando a relação genética entre os 11 tipos de perfis, com 76% de similaridade, identificados em 46 isolados de *F. pedrosoi* de 11 pacientes

Figura 34 – Dendrograma construído com os dados do RFLP *TaqI* mostrando a relação genética entre os 11 tipos de perfis, com 76% de similaridade, identificados em 46 isolados de *F. pedrosoi* de 11 pacientes.

Tabela 8 - Análise dos dados gerados pelas técnicas de RFLP com 6 genótipos diferentes de 46 amostras seqüenciais de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de 11 pacientes com cromoblastomicose.

Pacientes	n° cepa	Dde	Taq I	genótipos
JDN	12	A	A	I
JDN	28	A	A	I
JDN	32	A	A	I
AMJ	19	B	C	II
AMJ	27	A	A	I
AMJ	29	B	B	III
AMJ	30	A	A	I
AMJ	75	A	A	I
AMJ	76	A	A	I
AMJ	80	A	A	I
AMJ	84	A	A	I
OAS	20	A	A	I
OAS	22	A	A	I
OAS	31	A	A	I
OAS	50	A	A	I
OAS	55	A	A	I
OAS	57	A	A	I
OAS	65	A	A	I
OAS	70	A	A	I
OAS	71	A	A	I
OAS	78	A	A	I
JZN	26	A	B	IV
JZN	41	A	B	IV
JZN	45	A	A	I
JZN	72	A	A	I
JGL	34	B	A	V
JGL	35	B	A	V
JMC	36	A	D	VI
JMC	43	A	D	VI
JMC	46	A	D	VI
JMC	47	A	D	VI
MFS	48	A	A	I
MFS	51	A	A	I
MFS	66	A	A	I
MFS	77	A	A	I
MFS	81	A	B	IV
OP	56	A	B	IV
OP	60	A	A	I
OP	63	A	A	I
OP	68	A	B	IV
AJO	64	B	B	III
AJO	67	B	B	III
FJO	73	A	A	I
FJO	79	A	A	I
JRS	82	A	A	I
JRS	83	A	A	I

Na **figura 35**, é apresentado o dendograma gerado a partir dos resultados das quatro genotipagens realizadas. De modo geral, as amostras provenientes do mesmo paciente foram reunidas em um mesmo agrupamento, mesmo quando os genótipos eram diferentes. O grupo mais homogêneo foi o das amostras do paciente MFS que apresentaram similaridade de 95 a 88%. Apenas para as cepas T36 e T46 do paciente JMC foi observada similaridade de 100%.

Por meio da análise dos dados combinados, gerados pelas técnicas de RAPD e RFLP, foram identificados 20 genótipos diferentes (**tabela 9**) a partir de 46 amostras seqüenciais de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de 11 pacientes. Amostras de 6 pacientes (JDN, JGL, MFS, AJO, FJO e JRS) não apresentaram genótipos diferentes inter amostras. As do paciente AMJ apresentaram 4 genótipos diferentes, as dos pacientes OP e OAS apresentaram 3 genótipos diferentes e as dos pacientes JZN e JMC apresentaram 2 genótipos diferentes.

Figura 35 – Dendrograma construído com os dados do ERIC, REP - PCR, RFLP *Ddl* e *TaqI* mostrando a relação genética entre os perfis, com 76% de similaridade, identificados em 46 isolados de *F. pedrosoi* de 11 pacientes.

Tabela 9 - Análise dos dados gerados pelas técnicas de RAPD e RFLP com 20 genótipos diferentes de 46 amostras sequenciais de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de 11 pacientes

Pacientes	n° cepa	Dde	Taq I	REP	ERIC	genótipos
JDN	12	A	A	A	A	I
JDN	28	A	A	A	A	I
JDN	32	A	A	A	A	I
AMJ	19	B	C	B	B	II
AMJ	27	A	A	C	B	III
AMJ	29	B	B	B	B	IV
AMJ	30	A	A	C	B	V
AMJ	75	A	A	C	B	V
AMJ	76	A	A	C	B	V
AMJ	80	A	A	C	B	V
AMJ	84	A	A	C	B	V
OAS	20	A	A	D	C	VI
OAS	22	A	A	E	C	VII
OAS	31	A	A	D	C	VI
OAS	50	A	A	D	C	VI
OAS	55	A	A	F	C	VIII
OAS	57	A	A	E	C	VII
OAS	65	A	A	E	C	VII
OAS	70	A	A	F	C	VIII
OAS	71	A	A	F	C	VIII
OAS	78	A	A	E	C	VII
JZN	26	A	B	G	D	IX
JZN	41	A	B	G	D	IX
JZN	45	A	A	G	D	X
JZN	72	A	A	G	D	X
JGL	34	B	A	G	E	XI
JGL	35	B	A	G	E	XI
JMC	36	A	D	F	F	XII
JMC	43	A	D	H	F	XIII
JMC	46	A	D	F	F	XII
JMC	47	A	D	H	F	XIII
MFS	48	A	A	I	G	XIV
MFS	51	A	A	I	G	XIV
MFS	66	A	A	I	G	XIV
MFS	77	A	A	I	G	XIV
MFS	81	A	B	I	G	XV
OP	56	A	B	J	H	XVI
OP	60	A	A	J	H	XVII
OP	63	A	A	J	H	XVII
OP	68	A	B	J	H	XVI
AJO	64	B	B	J	I	XVIII
AJO	67	B	B	J	I	XVIII
FJO	73	A	A	K	J	XIX
FJO	79	A	A	K	J	XIX
JRS	82	A	A	A	K	XX
JRS	83	A	A	A	K	XX

5. Identificação molecular da *F. pedrosoi* por sequenciamento de DNA

Para as reações de sequenciamento, regiões do complexo rDNA foram amplificadas e geraram produtos de PCR empregando os conjuntos de iniciadores NS7/ITS2, ITS1/ITS4 e ITS3/NL4 (Figura 6).

Os produtos gerados nas reações de PCR com os conjuntos de iniciadores ITS1/ITS4 e ITS3/NL4, apresentaram tamanhos de 600 pb (Figura 36) e 980 pb (Figura 37), respectivamente, para as cepas *F. pedrosoi* e não *F. pedrosoi*. Por outro lado, quando se utilizou o conjunto de iniciadores NS7/ITS2, as amostras de DNA de cepas de *F. pedrosoi* apresentaram um produto de PCR de 900 pb, enquanto que as cepas não *F. pedrosoi* tiveram produto de 600 pb (Figura 38).

Figura 36. Análise dos produtos de PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 gerados com os iniciadores ITS1/ITS4, em gel de agarose 1%. Linhas 7 e 22: padrão de peso molecular de 100 bp. Linhas 1 a 6, 8 a 21 e 23 a 27: amostras de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, T43, T26, T49, T22, T19, T56, T60, T63, T68, T12, T20, T31, T50, T29, T75, T84, T41, T45, T34, T35, T30, T51, T64, T67, T73, respectivamente.

Figura 37. Análise dos produtos de PCR da região 5.8S-ITS2-28S gerados com os iniciadores ITS3/NL4, em gel de agarose 1%. Linhas 7 e 21: padrão de tamanho molecular de 100 bp. Linhas 1 a 6, 8 a 20 e 22 a 27: amostras de *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428, T43, T26, T49, T22, T19, T56, T60, T63, T68, T12, T20, T31, T50, T29, T75, T84, T41, T45, T34, T35, T30, T51, T64, T67, T73, respectivamente.

Figura 38. Análise dos produtos de PCR da região 18S-ITS1-5.8S gerados com os iniciadores NS7/ITS2, em gel de agarose 1%. Linhas 8 e 21: padrão de tamanho molecular de 100 bp. Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25 e 26: amostras de *Fonsecaea pedrosoi* T75, T84, T41, T45, T34, T35, T30, T51, T64, T67, T73, T82, *Fonsecaea compacta* IMTSP373, *Exophiala jeanselmei* IMTSP 178, *Exophiala jeanselmei* IMTSP 382, *Exophiala dermatitidis* IMTSP 581, *Rinocladiella aquaspersa* IMTSP 691, *Fonsecaea compacta* IMTSP 885, *Fonsecaea compacta* CBS 285/47, *Fonsecaea compacta* IMTSP 877, *Fonsecaea compacta* IMTSP 154, *Exophiala dermatitidis* IMTSP 67, *Exophiala spinifera* IMTSP 1036 e T43, respectivamente.

Foram selecionadas 18 cepas de *F. pedrosoi* de pacientes para a análise de sequenciamento de DNA (Tabela 10). Após o alinhamento das seqüências obtidas, foi selecionada uma seqüência de 530 pb que contém as regiões ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S. Esta seqüência foi selecionada por ser comum entre as seqüências obtidas e possibilitar o estudo comparativo entre as diferentes cepas.

Cepas de outras espécies de fungos demácios também foram seqüenciadas para posterior comparação: *Rinocladiella aquaspersa* (T103/IMTSP 691), *Exophiala dermatitidis* (T99/IMTSP 67), *Exophiala spinifera* (T97/IMTSP 1036). As seqüências obtidas com estas cepas confirmaram sua identificação morfológica, pois foram homólogas (99 a 100%) com seqüências das mesmas espécies após pesquisa em base de dados disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.gov>. A seqüência da cepa T49 apresentou 99% de homologia quando comparada com outras seqüências de *Fonsecaea pedrosoi*. As seqüências das cepas *Fonsecaea compacta* (T94/IMTSP154) e *Fonsecaea compacta* (T96/IMTSP373) tiveram suas seqüências homólogas com seqüências de *Phialophora verrucosa* (99% e 97%) e *Phialophora americana* (97% e 100%), respectivamente. A seqüência da cepa *Fonsecaea compacta* (T95/IMTSP885) apresentou homologia tanto para as seqüências de *Fonsecaea compacta* (99 a 97%) como para *Fonsecaea pedrosoi* (99 a 97%).

De modo geral, das 18 cepas de *F. pedrosoi* seqüenciadas, observamos a formação de dois grandes grupos: **seqüência 1** (T19, T41, T45, T34, T35, T56, T29 e ATCC 46428) e **seqüência 2** (T30, T84, T75, T60, T68, T82, T20, T50, T51 e T12) (Figura 39).

Curiosamente, os primeiros isolados (T19, T29) do paciente AMJ apresentaram seqüência 1, enquanto que nos demais isolados (T30, T75, T84) foi observada a seqüência 2 (Tabela 10). Resultados similares foram observados para o paciente OP, cujo primeiro isolado (T56) é seqüência 1 e os demais isolados (T60 e T68) são seqüência 2 (Tabela 11). O grau de paridade entre os grupos 1 e 2 foi de 97%.

		10	20	30	40	50	60
<u>Seqüência 1</u>	1	CCCAACCCTT	TGCTTACTAG	ACCTCAGTTG	CTTCGGCAGG	CCCGTCTTAA	TCTGACCGCT
<u>Seqüência 2</u>	1	CCCAACCCTT	TGCTTACTAG	ACCTCAGTTG	CTTCGGCAGG	CCCGTCTTAA	TCTGACCGCT
		70	80	90	100	110	120
<u>Seqüência 1</u>	61	GGAGGACCGC	CTAATACGGG	TGTTGCCTCT	GGCCAGTGTC	TGCCGATAGC	CTCATCTCCT
<u>Seqüência 2</u>	61	GGAGGACCGC	CTAATACGGG	TGTTGCCTCT	GGCCAGTGTC	TGCCGATAGC	CTCATCTCCT
		130	140	150	160	170	180
<u>Seqüência 1</u>	121	AACTCTGGAT	CAATCATGAT	TTACAATGTC	TAAGTGATTT	TATTTAATTA	AAAGCAAAAA
<u>Seqüência 2</u>	121	AACTCTGGAT	CAATCATGAT	TTACAATGTC	TAAGTGATTT	TATTCAATTA	AAAGCAAAAA
		190	200	210	220	230	240
<u>Seqüência 1</u>	181	CTTTCAACAA	CGGATCTCTT	GGTCTGGCA	TCGATGAAGA	ACGCAGCGAA	ATGCGATAAG
<u>Seqüência 2</u>	181	CTTTCAACAA	CGGATCTCTT	GGTCTGGCA	TCGATGAAGA	ACGCAGCGAA	ATGCGATAAG
		250	260	270	280	290	300
<u>Seqüência 1</u>	241	TAATGCGAAT	TGCAGAATTC	CAGTGAGTCA	TCGAATCTTT	GAACGCACAT	TGCGCCCTTT
<u>Seqüência 2</u>	241	TAATGCGAAT	TGCAGAATTC	CAGTGAGTCA	TCGAATCTTT	GAACGCACAT	TGCGCCCTTT
		310	320	330	340	350	360
<u>Seqüência 1</u>	301	GGTATTCCGA	AGGGCATGCC	TGTTGAGCG	TCATTATCAC	CCCTCAAGC	CCCTGCGCTT
<u>Seqüência 2</u>	301	GGTATTCCGA	AGGGCATGCC	TGTTGAGCG	TCATTATCAC	CCCTCAAGC	CCCTGTGCTT
		370	380	390	400	410	420
<u>Seqüência 1</u>	361	GGTGTGGAC	GGCTTGGTGG	AGCGAGTTCA	CACCTTCCAC	CCCTCCTAAA	GACAATGACG
<u>Seqüência 2</u>	361	GGTGTGGAC	GGCTTGGTGG	AGCGAGTTCA	CACCTTCCAC	CCCTCCTAAA	GACAATGACG
		430	440	450	460	470	480
<u>Seqüência 1</u>	421	GCGGCCTGCG	GAACCCCGG	TACACTGAGC	TTCTTAACTG	AGCACGTATC	GGATGAAGGG
<u>Seqüência 2</u>	421	GCGGCCTGCG	GAACCCCGG	TACACTGAGC	TTCTTTATTG	AGCACGTATC	GGATGAAGGG
		490	500	510	520		
<u>Seqüência 1</u>	481	TGCCCCGGAC	TCGGTCTTCT	CCCTCACGGG	AACAC-TTTT	TTCTAAGGT	528
<u>Seqüência 2</u>	481	TGCCCCGACC	C-GGTCTTCT	CCCTCACGGG	AACACATTTT	TTTAAAGGT	528

Figura 37. Representação em forma de texto das seqüências de DNA 1 e 2 da região ITS1-5.8S-ITS2 do complexo rDNA detectadas em cepas de *F. pedrosoi*

Tabela 10. Amostras de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose selecionadas para o sequenciamento.

Pacientes	Número da cepa	Data de isolamento	Grupo de sequenciamento
ATCC	46428		1
JDN	12	Dezembro 1995	2
AMJ	19	26/08/97	1
AMJ	29	2/04/98	1
AMJ	30	7/04/98	2
AMJ	75	18/09/01	2
AMJ	84	08/08/02	2
OAS	20	26/08/97	2
OAS	50	25/04/99	2
JZN	41	03/09/98	1
JZN	45	Fevereiro de 1999	1
JGL	34	20/06/98	1
JGL	35	22/07/98	1
MFS	51	29/06/99	2
OP	56	01/10/99	1
OP	60	08/08/00	2
OP	68	07/11/00	2
JRS	82	28/09/01	2

6. Antifungigrama pela técnica de diluição em agar

De 11 pacientes foram isoladas, de modo seqüencial, 39 amostras de *F. pedrosoi*. Entre estas, 14 foram isoladas e avaliadas quanto à sensibilidade a antifúngicos entre dezembro de 1995 e dezembro de 1998 (Andrade *et al*, 2004), e os resultados obtidos foram considerados no presente trabalho. As 25 restantes, isoladas em período posterior, foram mantidas em ágar batata até a execução do teste.

Como podemos observar na **tabela 11**, houve uma visível diferença entre os resultados obtidos em trabalho anterior para as 14 amostras e os apresentados agora para as outras 25 amostras dos mesmos pacientes.

De acordo com o critério escolhido para estabelecer sensibilidade e resistência em nosso estudo, as cepas seriam consideradas sensíveis ao itraconazol quando respondessem a CIMs $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$. Portanto, frente aos resultados obtidos podemos verificar que 72% das cepas foram sensíveis.

Essa sensibilidade foi observada para os primeiros isolados de sete pacientes (JDN: T12; OAS: T20; JMC: T36; MFS: T48; AJO: T64; FJO: T73 e JRS: T82), porém, para os primeiros isolados de outros 4 pacientes (AMJ: T19; JZN: T26; JGL: T34 e OP: T56) as CIMs foram consideradas elevadas.

Para os isolados dos pacientes JDN, JGL, MFS, AJO, FJO e JRS não se observou alteração no perfil de sensibilidade, porém para os isolados dos pacientes AMJ, OAS, JZN, JMC e OP verificou-se alternância de resultados. Nesses casos, os primeiros isolados mostraram-se sensíveis, os seguintes resistentes e os últimos foram sensíveis ao itraconazol.

Também podemos observar que, para esses pacientes houve um intervalo no tratamento, sendo de 3 anos e nove meses para AMJ; de 1 ano

para OAS e de 1 ano e 5 meses para o paciente JZN. Apesar da sensibilidade demonstrada pelas cepas no presente estudo, não houve melhora clínica para os pacientes AMJ, OAS e OP, e entre os que melhoraram dois (JZN e MFS) apresentaram recidiva.

Além disso, podemos observar que dois pacientes foram tratados com terbinafina isolada (JRS) ou associada ao itraconazol (OP). Para 3 pacientes (JDN, JZN e MFS), a criocirurgia também foi utilizada em associação com o itraconazol. Para esses casos houve uma boa evolução, com melhora clínica, porém ocorreram pontos de recidiva após algum tempo de tratamento.

Também pode-se observar que para as cepas de sequência 1 as CIMs foram consideradas resistentes (exceção, cepa ATCC *Fonsecaea pedrosoi* 46428 e T45) e para as de sequência 2 (exceção, cepas T30) as CIMs foram consideradas sensíveis, **Tabela 12**.

Tabela 11 – Concentração inibitória mínima do itraconazol frente as 46 cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de amostras seriadas de pacientes com cromoblastomicose e evolução clínica desses pacientes.

Paciente	Terapia	Evolução clínica	Intervalo	Cepa	CIM/ μ ml
JDN				12	≤ 125 ¹
	Itra+Crio**	recidiva	2 anos	28	0,35 ¹
	Itra+Crio	melhora	4 meses	32	0,17 ¹
AMJ	Itra			19	1 ¹
	Itra	Sem melhora	4 meses	27	4 ¹
	Itra	Sem melhora	4 meses	29	4 ¹
	sem tratamento	Sem melhora	3 anos/9 meses	75	0,06 ²
	Itra	Sem melhora	2 meses	80	0,125 ²
	Itra	Sem melhora	9 meses	84	0,125 ²
OAS	Itra			20	0,3 ¹
	Itra	Sem melhora	7 meses	31	4 ¹
	Itra	Sem melhora	1 ano	50	0,25 ²
	Itra	Sem melhora	6 meses	55	0,125 ²
	Itra	Sem melhora	9 meses	57	0,125 ²
	Itra	Sem melhora	8 meses	78	0,125 ²
JZN	Itra+Crio			26	2,5 ¹
	Itra+Crio	melhora	10 meses	41	5,6 ¹
		melhora	5 meses	45	0,5 ²
		recidiva	17 meses	72	0,125 ²
JGL	sem tratamento			34	2,0 ¹
	Itra	melhora	20 dias	35	1,4 ¹
JMC	Itra			36	0,14 ¹
	Itra	melhora	20 dias	43	5,6 ¹
	Itra		4 meses	46	0,06 ²
	Itra		1 mes	47	0,125 ²
MFS	ITRA+Crio			48	0,125 ²
	ITRA+Crio	melhora	1 mes	51	0,125 ²
	ITRA+Crio	melhora	16 meses	66	0,06 ²
	ITRA	recidiva	1 ano	77	0,125 ²
	ITRA	recidiva	5 meses	81	0,06 ²
OP	ITRA+Terb	Sem melhora		56	2,0 ²
	ITRA		10 meses	60	0,06 ²
	ITRA		2 meses	68	0,06 ²
AJO				64	0,06 ²
	ITRA	melhora	2 meses	67	0,06 ²
FJO				73	0,125 ²
	ITRA		2 meses	79	0,125 ²
JRS	Terbinafina			82	0,125 ²
	Terbinafina		8 meses	83	0,125 ²

* Itra: itraconazol; Terb: terbinafina; Crio: criocirurgia

¹: isolado entre dezembro de 1995 e dezembro de 1998;

²: isolado em período posterior a dezembro de 1998.

Tabela 12. Amostras de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose grupos 1 e 2 do sequenciamento relacionados com perfis de sensibilidade.

Pacientes	Número da cepa	Data de isolamento	Grupo de sequenciamento	Sensibilidade ao Itraconazol (µg/ml)
ATCC	46428		1	¹ S (0,125)
JDN	12	Dezembro 1995	2	S (≤0,125)
AMJ	19	26/08/97	1	² R (1)
AMJ	29	2/04/98	1	R (4)
AMJ	30	7/04/98	2	R (5,6)
AMJ	75	18/09/01	2	S (0,06)
AMJ	84	08/08/02	2	S (0,125)
OAS	20	26/08/97	2	S (0,3)
OAS	50	25/04/99	2	S (0,25)
JZN	41	03/09/98	1	R (5,6)
JZN	45	Fevereiro de 1999	1	S (0,5)
JGL	34	20/06/98	1	R (2,0)
JGL	35	22/07/98	1	R (1,0)
MFS	51	29/06/99	2	S (0,125)
OP	56	01/10/99	1	R (2,0)
OP	60	08/08/00	2	S (0,06)
OP	68	07/11/00	2	S (0,06)
JRS	82	28/09/01	2	S (0,125)

¹S: sensível; ²R: resistente

VI – DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os fungos demácios possuem características macroscópicas similares, o que impede a identificação de gênero e espécie com base apenas nessas propriedades. No entanto, algumas características como velocidade de crescimento, aspecto da colônia, presença do pigmento melanina e textura, podem direcionar a identificação para determinados gêneros ou excluir outros. Por exemplo, culturas que apresentam aspecto seco, dificilmente poderiam pertencer ao gênero *Exophiala*, cujas colônias possuem aspecto úmido, sobretudo em cultivos com menos de 10 dias.

No presente trabalho, as observações macroscópicas relacionadas as cepas de *F. pedrosoi* indicaram várias características, incluindo taxa de crescimento moderada (98,5%), aspecto seco (100%), presença do pigmento melanina (100%) e textura velutina (100%), compatíveis com as descritas na literatura para essa espécie (McGINNIS, 1980; LACAZ *et al.*, 1991; LACAZ *et al.*, 1998).

Quando analisados microscopicamente, os fungos demácios podem apresentar uma variabilidade morfológica que, muitas vezes, dificulta a identificação correta e, na maioria das vezes, permite apenas a identificação do gênero.

Em nosso estudo, pudemos observar essa variabilidade em alguns casos, como no da cepa *F. pedrosoi* T19 (**Tabela 2**), que apresentou três tipos de esporulação (cladosporium, fialófora e rinocladiela), sendo o tipo cladosporium predominante. Essas observações morfológicas foram

compatíveis com as relatadas por diversos autores (McGINNIS, 1980; LACAZ *et al.*, 1991; LACAZ *et al.*, 1998).

As cepas T 54 (Tabela 3) e T59 (Tabela 4) também apresentaram mais de um tipo de esporulação. No entanto, nesses dois casos o tipo predominante foi fialófora e rinocladiela, respectivamente. A cepa T59 apresentou esporulação muito exacerbada, o que dificultou uma clara visualização de sua morfologia. Esse achado poderia ser indicativo de *Fonsecaea compacta*, porque, segundo a literatura (LACAZ *et al.*, 1991 e LACAZ *et al.*, 1998), essa espécie apresenta esporulação mais intensa do que a *F. pedrosoi*. A utilização de outros meios de cultura talvez proporcionasse resultados mais conclusivos para as cepas T54 e T59. Meios pobres em nutrientes, como AO (Oatmeal Agar) preparado à base de cereais; agar cenoura e batata; agar Czapek (utilizados para estimular a esporulação de fungos do gênero *Aspergillus*) e o ágar fubá, além do agar batata (utilizado em nosso estudo), são habitualmente empregados em centros de referência para a identificação de fungos demácios. (Hoog *et al.*, 2000). Curiosamente, as amostras (T54 e T59) foram negativas para a PCR-*duplex* na presença dos iniciadores específicos ITSA1 e ITSA para *F. pedrosoi*.

O uso de outros meios de cultura também poderia ser indicado para as cepas T49 e T62. Essas amostras foram identificadas como *Exophiala* spp e *Rhinocladiella* spp, respectivamente, pois apresentaram características macro e microscópicas compatíveis com esses gêneros. Entretanto, foram positivas para a PCR-*duplex* na presença dos iniciadores específicos ITSA1 e ITSA para *F. pedrosoi*. O resultado de PCR-*duplex* da cepa T49 foi confirmado por sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do complexo rDNA. Observou-se

que 99% da sequência analisada foi similar a outras sequências de *Fonsecaea pedrosoi*. Portanto, apesar dessa amostra não desenvolver conidiogênese típica de *F. pedrosoi* (**Figura 12**), foi identificada como tal pelo seqüenciamento dessa região, confirmando, assim, o resultado positivo na PCR-*duplex*, específica para *Fonsecaea pedrosoi*.

Esses resultados indicam que a PCR-*duplex* parece ser um teste mais específico que os testes morfológicos para a identificação de *F. pedrosoi* como agente da cromoblastomicose.

Entre as 49 cepas provenientes dos outros centros, apenas um isolado não correspondeu à identificação morfológica inicial. A IMTSP 154, identificada como *Fonsecaea compacta*, apresentou frutificação somente do tipo fialófora. Essa observação já havia sido realizada por McGinnis e Schell em 1980, quando analisaram várias amostras enviadas por diversos centros de pesquisa, incluindo o IMTSP. Esses pesquisadores utilizaram o método do microcultivo com meios de agar fubá e agar dextrose batata. As cepas de *Fonsecaea compacta* IMTSP 885, IMTSP 877, IMTSP 154 e IMTSP 373, incluídas nessa análise, apresentaram o seguinte resultado: IMTSP 885 foi a única considerada como sendo *Fonsecaea compacta*, IMTSP 877 foi reavaliada como *F. pedrosoi* e as cepas IMTSP 154 e IMTSP 373 foram reavaliadas como sendo *Phialophora verrucosa*. Em nosso estudo morfológico, as cepas IMTSP 885 e IMTSP 877 foram consideradas como *Fonsecaea compacta*, a IMTSP 154, conforme descrito anteriormente, foi considerada como *Phialophora verrucosa* e para a IMTSP 373 a análise morfológica não pode ser realizada, pois essa cepa não apresentou conidiogênese.

Pelo exposto, pode-se observar que os detalhes que envolvem a identificação morfológica das espécies de *Fonsecaea* ainda são controvertidos e, portanto, consideramos a necessidade de estudos adicionais. Entre os procedimentos realizados, a análise do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do complexo rDNA poderia nos fornecer algum dado referente a identificação da espécie, uma vez que essa região já foi utilizada por vários pesquisadores com essa finalidade.

Portanto, as cepas de *Fonsecaea compacta* IMTSP 885, IMTSP 154 e IMTSP 373 foram selecionadas para aquela análise. As seqüências das cepas IMTSP 154 e IMTSP 373 apresentaram homologia com amostras de *Phialophora verrucosa* e *Phialophora americana*, respectivamente, enquanto que a seqüência da cepa IMTSP 885 apresentou homologia tanto com as seqüências de *Fonsecaea pedrosoi* como de *Fonsecaea compacta*. Esses achados confirmaram as identificações morfológicas relatadas por McGinnis e Schell para a cepa IMTSP154 e para a cepa IMTSP 373, mas não para a IMTSP 885, cujo sequenciamento foi inconclusivo. Talvez o sequenciamento de outros genes como, por exemplo, os que codificam para algumas proteínas como quitina, β -tubulina, acetil coenzima A sintase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que também são utilizados na identificação de fungos, possa auxiliar nessa identificação (Guarro, et al 1999).

No presente trabalho, todas essas amostras de *Fonsecaea compacta*, também foram avaliadas utilizando-se o ensaio do PCR-*duplex*, mas somente a amostra IMTSP 877 (T8) foi positiva para os dois conjuntos de iniciadores específicos para *Fonsecaea pedrosoi*. Apesar dessa amostra não ter sido

seqüenciada, o fato de ser positiva na PCR-*duplex* pode indicar que se trata de *Fonsecaea pedrosoi*, assim como havia indicado McGinnis e Schell em 1980.

É importante salientar que, a ausência de conidiogênese em isolados seqüenciais de *F. pedrosoi* de um mesmo paciente foi, pela primeira vez, observada em nosso estudo. Nesse caso, a ausência de conidiogênese pode estar associada a alguns fatores como, por exemplo, o longo período de doença, no qual o fungo pode ter sofrido uma adaptação ao hospedeiro e deixado de produzir algumas características morfológicas. Outro fator poderia ser o longo período de tratamento com itraconazol, a que o paciente vem sendo submetido.

As amostras que não puderam ser identificadas por meio da morfologia foram positivas para a PCR-*duplex* com os dois conjuntos de iniciadores específicos. Quando essas amostras foram genotipadas (**tabela 10**) pudemos observar a presença de um único genótipo para as cepas do paciente JDN (I), enquanto que as cepas do paciente OP distribuíram-se em três genótipos diferentes: T56 (XVI), T60 e T63 (XVII) e T68 (XVIII). Quando o DNA do primeiro isolado do paciente JDN (T12) e o DNA de três isolados do paciente OP (T56, T60 e T68) foram utilizados no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, verificou-se que todas as seqüências foram homólogas a outras seqüências de *F. pedrosoi* disponíveis no endereço <http://www.ncbi.nlm.gov>. Apesar de todas as amostras serem consideradas *F. pedrosoi*, pudemos observar que, de modo geral, tanto para nossas seqüências como para as seqüências disponíveis havia dois perfis de sequenciamento. A cepa T56 (**Tabela 2**) apresentou perfil diferente das demais, mas como essa foi o primeiro isolado, é possível que a ausência de conidiogênese observada nas

amostras sequenciais desse paciente esteja associada com as alterações na sequência de DNA.

A ausência de conidiogênese, mais a diversidade morfológica encontrada entre diferentes cepas de *F. pedrosoi* ou de *F. compacta* ressaltam a necessidade de técnicas sensíveis e específicas para a identificação desses fungos. Como podemos observar, o teste de PCR-*duplex* proposto apresenta essas características, uma vez que, a sensibilidade foi de 90% na reação com os dois conjuntos de iniciadores específicos e a especificidade foi de 100% para o conjunto ITSA/ITSAS e 94,2% para o conjunto ITSA1/ITSAS. A menor especificidade observada para o último conjunto de iniciadores em relação ao primeiro conjunto deve-se à discordância entre a identificação morfológica e molecular para as cepas T54 e T59. É possível que, nesses dois casos, uma nova avaliação morfológica (utilizando-se outros meios de cultura, por exemplo) mais o sequenciamento dessas amostras esclareçam essa discordância entre as análises morfológicas e moleculares.

Neste trabalho, todas as cepas inicialmente identificadas como *F. pedrosoi* foram positivas para os iniciadores específicos (ITSA/ITSAS), na PCR-*duplex*. Além disso, cepas de outras espécies de fungos foram negativas para a PCR-*duplex* específica para *F. pedrosoi*, revelando a alta especificidade do teste que foi de 100% para este conjunto de iniciadores. Para comprovar esses resultados, foi realizado o sequenciamento das amostras de DNA de algumas cepas, cujos resultados mostraram alto grau de similaridade com sequências disponíveis no endereço <http://www.ncbi.nlm.gov>. Como descrito anteriormente, basicamente dois perfis de sequência foram encontrados: a sequência 1 e a sequência 2. Pudemos observar que as sequências das cepas

de dois pacientes (AMJ e OP) foram distribuídas entre as duas seqüências. Os primeiros isolados (T19 e T56) desses pacientes apresentaram a seqüência 1 e os isolados posteriores apresentaram a seqüência 2. Esses resultados comprovam a diversidade genética encontrada na análise morfológica desses isolados.

Outro dado interessante foi o obtido para as oito amostras que apresentaram a seqüência 1 (**tabela 11**). Quando amplificadas pelos iniciadores ITS5/NL4 para a realização do RFLP, essas cepas (exceto a T45) apresentaram um produto de 1400pb que posteriormente seria empregado na restrição enzimática, porém apresentaram diferentes perfis de RFLP.

Também pudemos observar que para as amostras com seqüência 1 (com exceção ATCC 46428 e T45) as concentrações inibitórias mínimas mostraram cepas consideradas resistentes e para as com seqüência 2 (com exceção T30) sensíveis. Apesar do gene estudado no sequenciamento não estar relacionado com a síntese da molécula alvo do itraconazol, esse dado pode indicar alguma alteração genética nas cepas estudadas. Esse fato foi mais bem evidenciado para alguns pacientes (AMJ e OAS) que estavam em tratamento durante anos. Nesse período, os isolados responderam a CIMs elevadas e após o mesmo, as amostras responderam a CIMs mais baixas. É importante ressaltar que no caso do paciente AMJ essas amostras foram isoladas após o tratamento ter sido interrompido por três anos e no caso do paciente OAS após um ano.

Para as cepas dos outros pacientes (MFS, OP, AJO, FJO e JRS) que não apresentaram resistência microbiológica, e mesmo assim os pacientes apresentam recidivas, deve-se levar em conta que fatores relacionados ao

hospedeiro podem estar interferindo na resposta a terapêutica. O itraconazol é uma droga com biodisponibilidade muito variável; as concentrações plasmáticas variam muito de paciente para paciente, sendo, portanto, recomendado em casos de falha terapêutica um acompanhamento das concentrações plasmáticas da droga (Espinell-Ingroff, 1997).

Para a confirmação das possíveis alterações genéticas relacionadas com a sensibilidade e a resistência das cepas dos pacientes AMJ e OAS, várias possibilidades devem ser exploradas: acompanhamento da concentração plasmática do itraconazol no paciente; aprimoramento e padronização de um teste de sensibilidade específico para o fungo em questão e estudo de outros genes que estão diretamente relacionados com a resistência microbiológica, como o *ergosterol biosynthetic enzymes (ERG) 11* e o *multidrug resistance (MDR)*.

A partir da análise de seqüências e estudo de homologia realizado com base no endereço <http://www.ncbi.nlm.gov>, desenvolvemos outros iniciadores (ITSA1/ITSAS) com a finalidade de se obter maior especificidade na identificação da espécie *Fonsecaea pedrosoi*. Das 64 amostras de *F. pedrosoi* analisadas, apenas duas (T54 e T59) não amplificaram com ITSA1/ITSAS. Embora essas amostras tenham apresentado, em estudo morfológico, raros campos com esporulação tipo cladosporium, o que norteou a identificação dessas cepas como sendo *Fonsecaea pedrosi*, elas podem pertencer à outra espécie ou mesmo outro gênero, como *Phialophora* ou *Rhinoctadiella*, pois esses fungos também são pleomórficos (McGinnis e Schell, 1980; Schell et al, 1999). Por isso, o sequenciamento da região estudada no desenho dos iniciadores poderia esclarecer essa dúvida.

Recentemente, pesquisadores japoneses (ABLIZ *et al.*, 2003) desenvolveram iniciadores específicos para serem utilizados na técnica de PCR para identificação do gênero *Fonsecaea* em amostras de cultura. Nesse estudo, foram utilizadas 51 espécies diferentes, sendo 18 de *F. pedrosoi*, e três de *F. compacta*. Os iniciadores utilizados também foram desenvolvidos a partir do complexo rDNA e geraram um produto de 333bp nas cepas que eram *F. pedrosoi*. A diferença entre esse trabalho e o nosso está na metodologia empregada e no desenho dos iniciadores. Em nosso estudo, desenvolvemos iniciadores e condições de reação de PCR-*duplex* que possibilitam a identificação molecular da espécie *F. pedrosoi* e permite discriminá-la de outras espécies de fungos demácios. Além disso, a reação negativa para ambos os iniciadores, na PCR-*duplex*, é um dado importante que pode indicar que o DNA não foi adequadamente extraído ou está degradado. Além disso, pode indicar a presença de inibidores na reação, visto que esse tipo de controle não está presente na técnica de PCR descrita por ABLIZ e cols. (2003), que contém apenas um conjunto de iniciadores que são específicos para o gênero *Fonsecaea*.

Os estudos de tipagem demonstraram uma grande variedade de genótipos, mesmo entre amostras seqüenciais. Em dois desses casos, onde foram encontrados de três a quatro genótipos diferentes, os pacientes encontravam-se em tratamento há muitos anos e com vários episódios de recidivas.

De modo geral, a técnica de ERIC-PCR mostrou poucos perfis diferentes entre as cepas estudadas, enquanto que a técnica de REP-PCR apresentou maior número de perfis, indicando maior poder de discriminação entre as

cepas. Porém, quando os perfis genéticos foram agrupados prevaleceu o agrupamento por paciente.

Os resultados de RFLP não geraram informações que possibilitassem associação com os dados dos pacientes (datas, procedência, lesões, etc.). Em estudo anterior, Attili et al (1998) encontraram variabilidade similar, uma vez que também não estabeleceram um perfil único para *F. pedrosoi*, apesar de a região estudada de 650pb ter sido menor do que a avaliada no presente trabalho (1400 a 1800pb). Ainda utilizando produtos gerados pelos iniciadores ITS1/ITS4 e oito enzimas diferentes na análise de amostras de *F. pedrosoi* e *F. compacta*, os autores também não conseguiram diferenciar as duas espécies. Com base nessas observações e em nossos achados, acreditamos que essa técnica possui pouco valor discriminatório, mas consideramos que pode ser empregada com outros propósitos, como, por exemplo, na classificação do gênero, como indicado por Caligiorne et al (1999).

Com base nos resultados obtidos, acreditamos que a diversidade morfológica e genética da *Fonsecaea pedrosoi* seja própria de cada cepa e não de um grupo de isolados (como, por exemplo, os de um mesmo paciente). Talvez essa propriedade esteja relacionada com a falha terapêutica comumente observada entre os pacientes com cromoblastomicose.

VII – CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

1. Os resultados da análise macroscópica das colônias foram compatíveis com os dados descritos na literatura para o fungo *Fonsecaea pedrosoi*, mas não foram suficientes para a identificação definitiva do fungo. A associação entre esses resultados e os da microscopia possibilitou a identificação de 64 isolados de pacientes com diagnóstico prévio de cromoblastomicose, porém para dois desses isolados (T54 e T59), os exames não foram conclusivos. Tais isolados poderiam ser considerados como espécies diferentes de *F. pedrosoi* ou mesmo classificados em outro gênero.
2. A identificação molecular por meio da PCR-*duplex*, com os iniciadores ITS1/ITS4 e ITSA1/ITSAS, mostrou-se altamente sensível e específica, sendo, portanto, passível de ser utilizada na identificação de *F. pedrosoi*. Essa análise possibilitou a identificação de 62 das 64 amostras de *F. pedrosoi*, incluindo as que não puderam ser identificadas nos estudos morfológicos.
3. Os resultados da genotipagem por RAPD e RFLP mostraram grande variabilidade genética entre as cepas de *Fonsecaea pedrosoi*, mesmo quando essas pertenciam a um mesmo paciente.

4. O sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do complexo rDNA de algumas cepas mostrou a presença de 2 seqüências, ambas homólogas com as disponíveis no endereço <http://www.ncbi.nlm.gov> para cepas de *Fonsecaea pedrosoi*. Essas seqüências também foram distribuídas entre os diferentes isolados, mesmo entre os recuperados de um mesmo paciente.
5. O teste de sensibilidade mostrou que as cepas com seqüência 1 tendem a ser resistentes ao itraconazol, enquanto que as de seqüência 2 tendem a ser sensíveis a esse azol.
6. O sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do complexo rDNA também possibilitou a confirmação de alguns achados na reação de PCR-*duplex* específica para *Fonsecaea pedrosoi*, incluindo cepas com reavaliação morfológica divergente de sua identificação de origem.
7. De modo geral, pode-se considerar que existe uma grande variabilidade entre as cepas de *Fonsecaea pedrosoi*, seja ela fenotípica ou genotípica. Estudos posteriores são necessários para comprovar se essa variabilidade pode estar relacionada à falha terapêutica ou a patogenicidade desse microrganismo, uma vez que a doença causada pelo mesmo não responde de forma satisfatória a nenhum dos antifúngicos disponíveis no comércio.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLIZ, P., FUKUSHIMA K., TAKIZAWA, K., NIEDA, N., MIYAJI, M. NISHIMURA, K. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 41, n.º2, p. 873-876, 2003.

ABLIZ, P., FUKUSHIMA K., TAKIZAWA, K.; MIYAJI, M. NISHIMURA, K. specific oligonucleotide primers for identification of *Hortaea wernwckii*, a causative agent of tinea nigra. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* V. 46, n.º 2, p. 89-93, 2003.

ABLIZ, P., FUKUSHIMA KAZUTAKA, TAKIZAWA, K., NIEDA, N., MIYAJI, M. NISHIMURA, K. Specific Oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carrionii*, a causative agent of chromoblastomycosis. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 42, n.º 1, p. 404-407, 2004.

AHMED, A.O.A.; MUKHTAR, M. M.; KOOLS-SIJMONS, M.; FAHAL, A.; HOOG, S; GERRITS, B.; ZIJLSTRA, E.; VERBRUGH, H.; BELKUN, A. Development of a species-specific PCR-restriction fragment length polymorphism analysis procedure for identification of *Madurella mycetomatis*. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 37, n.10, p. 3175-3178, 1999.

AL - DOORY, Y. *Chromomycosis*. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S.R.; SOUZA, R.W.; ANGLUSTER, J.:
TRAVASSOS, L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester. V.137, p. 837-844, 1991.

ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R.; HOLANDINO, C.;
ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L.
Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces production of human antifungal
antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect. Immun.* V. 72, n. 1, p. 229-237, 2004.

ANDRADE, T. S., CASTRO, L. G. M., HIRATA, M.H., HIRATA, R. D. C.,
Cury, A. E. Aplicação da *PCR-multiplex* na identificação molecular de cepas
de *Fonsecaea* isoladas de pacientes com cromoblastomicose. XXII
Congresso Brasileiro de Microbiologia, de 17 a 20 de novembro,
Florianópolis, 2003.

ANDRADE, T.S., KEIKO, L.; SANTOS, L.F.A; GIUDICE, M.C.,
Subcutaneous phaeohyphomycosis in patient with pulmonary neoplasy. In:
13^o TH CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN &
ANIMAL MYCOLOGY, Salsomaggiore - Parma, 1997. Abstracts, p.268

ANDRADE, T. S, CASTRO, L. G.M, NUNES, R. S, GIMENES, V. M.F,
CURY, A. E. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from
chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses*, V. 47, p. 216-
221, 2004.

ATTILI, D. S.; HOOG, G. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. rDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. *Med. Mycol.* Plymouth. V.36,p.219-225, 1998.

BARBA-GÓMEZ. J. F.; MAYORGA, J.; MCGINNIS, M.R.; GONZÁLES-MENDOZA, A. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *J. Am. Acad. Dermatol.* St. Louis. V.26, p.367-70. 1992.

BARROS, T. F. RESENDE, M. A. R. Partial Chemical Characterization of antigenic preparations of chromoblastomycosis agents. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* São Paulo, V. 41, n.º 6, p. 343-350, 1999.

BELKUM, A. V.; QUINT, W. G. V.; PAUW, B. E.; MELCHERS, W. J. G.; MEIS, J. F. Typing of *Aspergillus* Species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* Washington . V. 31, n.º 9, p. 2502-2505, 1993.

BONIFAZ, A.; MARTÍNEZ –SOTO, CARRASCO-GERARD, E.; PENICHE, J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and combination of both. *Int. J. Dermatol.* Philadelphia. V.36, p.542-547, 1997.

BOPP, C. New method for the treatment of chromoblastomycosis. In: FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES. Brasília, 1978. *The Black and white yeasts.* Washington. Pan Am. Health Organ. Sci. Publ. n.356, p.33-34.

BORELLI, D. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis.* Chigago. v.9, supl.1, p. 57-63, 1987.

BRUMER, E., CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an Update. *Clin. Microbiol. Rev.* Chicago. V. 6, n.º 2, p. 89-117, 1993.

BRUSH, L.; MONEY, N. P. Invasive hyphal growth in *Wangiella dermatitidis* is induced by inoculation and shows dependence upon melanin biosynthesis. *Fungal genet. Biol.* V. 28, n. 3, p. 190 – 200, 1999.

CAETANO-ANOLÉS, G.; BASSAN, G. J. GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*. V. 9, p. 553-557, 1991.

CALIGIORNE, R. B., RESENDE, M. A.; PAIVA, R., AZEVEDO V. Use of RAPD (random amplified polymorphyc DNA) to analyse genetic diversity of dematiaceous fungal pathogens. *Can. J. Microbiol.* V. 45, p.408-412, 1999.

CASTRO, L. G. M. Chromomycosis: A therapeutic challenge. *Clin. Infect. Dis.* Chigago. v.15, p. 553-554, 1992

CASTRO, L. G. M. Tratamento da cromoblastomicose pela criocirurgia com nitrogênio líquido. São Paulo, 1998. 78p. (Tese de doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo).

COSTA, M. R. E.; LACAZ, C. S.; KAWASAKI, M.; CAMARGO, Z. P. Conventional versus molecular diagnostic tests. In: PROCEEDINGS OF THE XIV CONGRESS INT. SOC. HUM. MYCOL. – ISHAM. Buenos Aires. 2000. *Medical Mycology*. Oxford, Restrepo, A. & Clemons, K. V. eds.. v. 38, sup. 1, p. 139-145, 2000.

CUEVA-PAZ, S.A. Reporte de caso tratado com anfotericina B intralesional. *Dermatologia (Mex.)*, v.13, p.139-146, 1969. Apud: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Cromomicose. In: *Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo: Savier., 1991. p. 376 - 386.

DE CLERCQ, D.; KAKIESSE, M.; DE VROEY, C.; MAZEBO, P. Traitement de la cromomycose par l'association 5-fluorocytosine et thiabendazole – A propos d'un cas zaïrois à *Fonsecaea pedrosoi*. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* v.65, p.95-97, 1985.

DIAZ, M.; NEGRONI, R.; MONTERO-GEI, F.; CASTRO, L.G. M.; SAMPAIO, S. A.; BORELLI, D.; RESTREPO, A.; FRANCO, L. BRAN, J. L.; ARATHOON, E. G.; et. al. A Pan - American 5-year study of fluconazol therapy for deep mycoses in the immunocompetent host. Pan - American Study Group. *Clin. Infect. Dis.* Chigago. v.14, supl.-1, p. 68-76, 1992.

DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A. - The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses.*, Berlin. v. 34, p. 1-18, 1991.

EDEL, V.; STEINBERG, C.; AVELANGE, I.; LAGUENE, G.; ALABOUVETTE, C. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology*. V. 85, p. 579-585, 1995.

ELIE, C. M.; LOTT, T. J.; E. REISS, MORRISON, C. J. rapid identification of candida species in blood. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V.36, p. 3260-3265, 1998.

ERLICH, H. A. *PCR Technology – principles and applications for DNA amplification*. New York, Stockton press. 1989. p. 1-31.

ESPINELL-INGROFF, A. Clinical relevance of antifungal resistance. *Infect. Dis. Clin. North Amer.* Washington. v. 11, p. 929-944, 1997.

ESPINELL-INGROFF, A.; SHADOMY, S.; DIXON, D.; GOLDSON, P. Exoantigen tests for *Cladosporium bantianum*, *Fonsecaea pedrosoi*, and *Phialophora verrucosa*. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 23, p. 305-310, 1986.

ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAMARCEL, E. R.; PECARRERE, J.-L. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 55, n.1, p. 45-47. 1996.

ESTERRE, P.; JAHEVITRA, M; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. Humoral Immune Response in Chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* V. 7, n.º3, p. 497-500, 2000.

ESTERRE, P.; JAHEVITRA, M.; RAMARCEL, E. R.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. Evaluation of the ELISA technique for the diagnosis and seroepidemiology of chromoblastomycosis. *J. Mycol. Méd.* V. 7, p. 137-141, 1997.

ESTERRE, P.; INZAN C. K.; RAMARCEL, E. R.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RATSIOHARANA, M.; PECARRERE, J.-L.; ROIG, P. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results

of an open pilot study. *Br. J. Dermatol.*, Oxford. v. 134, suppl.46, p. 33-36, 1996.

FENG, B.; WANG, X.; HAUSER, M.; KAUFMANN, S.; JENTSCH, S.; HAASE, G.; BECKER, J. M.; SZANISZLO. Molecular cloning and characterization of WdPKS,a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infect. Immun.* V. 69, n. 3, p. 1781-1794, 2001.

FRANCO, L.; GOMEZ, I.; RESTREPO, A. Saperconazole in the treatment of systemic and subcutaneous mycoses. *Int. J. Dermatol.* Philadelphia. v.31, p.725-729, 1992.

GARNER, A.; ARATHOON, E.; STEVENS, D.A. Initial experience in therapy for progressive mycoses with itraconazole, the first clinically studied triazole. *Rev. Infect. Dis.*, Chigago. v.9, suppl.1, p. 77-86, 1987.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Amplification of anonymous DNA fragments using pairs of long primers generates reproducible DNA fingerprints that are sensitive to genetic variation. *Electrophoresis*, Weinheim, V. 18, p. 1512-1518, 1997.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, V. 25, p.17-21, 1997.

GILSON, E., CLÉMENT, J. BRUTLAG, D. HOFNUNG, A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in bacteria. *EMBO J.* V. 3, p. 1417-1421, 1984.

GIRARDIN, H.; SARFATI, J.; TRAORÉ, F.; DUPOUY CAMET, J.; DEROUIN, F.; LATGÉ, P. Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol. Washington.* V. 32, p. 684-690, 1994.

GRÄSER, Y.; KUIJPERS, A. F. A.; PRESBER, W.; HOOG, G. S. Molecular Taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol. Washington,* V. 38, n.º 9, p. 3329-3336, 2000.

GREENE, J. N.; FOULIS, P.; YANGCO, B. G. Case report: Chromomycosis in a steroid dependent patient with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med. Sci. Thorofare.* v.299, supl.1, p.54-57, 1990.

GUARRO, J., GENÉ, J., STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* Chicago. V.12, n.º 3, p.454-500, 1999.

GUPTA, A. K.; TABORDA, P. R.; SANZOVO, A. D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Medical Mycology.* Oxford. V. 40, p. 529 -534, 2002.

HAASE, G.; SONNTAG, L.; MELZER-KRICK, B; HOOG, G. S. Phylogenetic interference by SSU-gene analysis of members of the herpotrichiellaceae

with special reference to human pathogenic species. *Studies in Mycology*, Baarn, n. 43, p. 80-97, 1999.

HALL, L.; WOHLTIEL, S.; ROBERTS, G. D. Experience with the MicroSeq D2 Large –Subunit Ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered in the clinically important yeasts species. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 41, p. 5099 –5102, 2003.

HALL, L.; WOHLTIEL, S.; ROBERTS, G. D. Experience with the MicroSeq D2 Large –Subunit Ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 42, n. 2, p. 622 –626, 2004.

HOOG, G. S.; ENDE, G.; UNTEREINER, W. A. Nutritional physiology of type isolates of currently accepted species of *Exophiala* and *Phaeococcomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, V.68, p. 43-49, 1995.

HOOG, G. S., QUEIROZ - TELLES, F., FERNANDEZ – ZEPPENFELDT G., HAASE, G.; ANGELLIS, D.A., GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G., MATOS, T., RAINER,J., RICHARD – YEGRES,N., VICENTE,V., YEGRES, F. black fungi: clinical and pathogenic approaches. In: PROCEEDINGS OF THE XIV CONGRESS INT. SOC. HUM. MYCOL. – ISHAM. Buenos Aires. 2000. *Medical Mycology*. Oxford, Restrepo, A. & Clemons, K. V. eds.. v. 38, sup. 1, p. 243-250, 2000.

HOOG, G. S, GUARRO, J.; Gené, J.; Figueras, M. J. *Atlas of clinical fungi*. 2. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, e Universitat Rovira i Virgili, Reus, 2000. p. 50 –52.

HOOG, G. S, GUARRO, J.; Gené, J.; Figueras, M. J. *Atlas of clinical fungi*. 2. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, , e Universitat Rovira i Virgili, Reus, 2000. p. 676 –680.

HOOG, G. S.; ZALAR, P.; URZI, C.; LEO, F.; YURLOVA, N. A.; STERFLINGER, K. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology*, Baarn, n. 43, p. 31-37, 1999.

HORRÉ, R. AND HOOG, G. S. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Studies in Mycology*, Baarn, n. 43, p. 176-193, 1999.

HULTON, C. S. J. HIGGIS, C. F.; SHARP, P. M. Eric sequences of short families of repeated elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiol.* V. 5, p. 825-834, 1991.

IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H.; RUPP, M. E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*. Oxford. V. 40, n.º 1, p. 87-109, 2002.

KULLAVANIJAYA, P.; ROJANAVANICH, V. Successful treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* by the combination of itraconazole and cryotherapy. *In. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.34, n.11, p. 804-807, 1995.

KUMAR, B.; KAUR, I.; CHAKRABARTI, A. SHARMA, V. K. Treatment of deep mycoses with itraconazole. *Mycopathologia*. The Hague. v.115, p.169-174, 1991.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Cromomicose. *In: Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo: Savier., 1991. p. 376 - 386.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico.*, 1. ed. São Paulo: Sarvier., 1998. p. 232-237.

LASKER, B. A. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *aspergillus fumigatus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 40, p. 2886-2892, 1986.

LAVALLE, P.; SUCHILL, P.; DE OVANDO, F. Itraconazole for deep mycoses: preliminary experience in Mexico. *Rev. Infect. Dis.* Chicago. v.9, supl.1, p. 64-70, 1987.

LINDSLEY, M.D.; HURST, S.; NUREEN, J. I.; MORRISON, C. J. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 39, p. 3507-3511, 2001.

Liu D.; Pearce L.; Lilley G.; Coloe, S.; Baird, R.; Pedersen, J. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. *J. Med. Microbiol.* V. 51, n.º2, p. 117-122, 2002.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Cromoblastomicose no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro. v.64, n.3, p. 155-8, 1989.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Chromomycosis: A clinical and mycologic study of thirty-five cases observed in the hinterland of Rio Grande Do Sul, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.25, p. 132-5. 1976.

LOPES, C. F.; ALVARENGA, R. J.; CISALPINO, E. O.; RESENDE, M. A. Casos de cromomicose resistentes à 5-fluorocitosina. *An. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro. v.53, p.1-9, 1978.

LOPES, C. F.; ALVARENGA, R. J.; CISALPINO, E. O.; RESENDE, M. A.; OLIVEIRA, L. G. Six years' experience in treatment of chromomycosis with 5-fluorocytosine. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia. v.17, n.5, p. 414-418, 1978.

LOPES, C. F.; RESENDE, M. A.; ALVARENGA, R. J.; MOREIRA, Y. K. Associação de 5-fluorocitosina e amphotericina B no tratamento da cromomicose. *Med. Cutan. Ibero Lat. Amer.*, v.7, n.1/3, p. 1-7, 1979.

LOUWS, F. J.; FULBRIGH, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUJIN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied Environmental Microbiology*. V. 60, n.º 7, p. 2286-2295, 1994.

MARTIN,C.; ROBERTS, D.; ROSSAU, R.; JANNES, G.; SMITH T.; MAHER, M. Developement of a PCR-based line probe assay for identification fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol. Washington*. V. 38, p. 3735-3742, 2000.

MCBURNEY, E. I. Chromoblastomycosis treatment with ketoconazole. *Cutis*. New York. v. 30, p.746-748, 1982.

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

MCGINNIS, M. R. *Laboratory Handbook of medical mycology*. New York: Academic Press, 1980, 661p.

MCGINNIS, M. R.; SCHELL, W.A. The genus *Fonsecaea* and its relationship to the genera *Cladosporium*, *Phialophora*, *Ramichloridium*, and *Rhinocladiella*. In: FIFTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES. *Superficial cutaneous and subcutaneous infections*. Caracas, 1980. Pan Am. Health Organ. Sci. Publ. 1980. n.396, p. 215-234.

MCGINNIS, M. R. Human Pathogenic species of *Exophiala*, *Phialophora*, and *Wangiella*. In: FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES. *The black and white yeasts*. Brasília, 1977. Pan Am. Health Organ. Sci. Publ. 1978. n. 356, p. 35-59.

METHA, Y; METHA, A. ROSATO Y. B. ERIC and REP –PCR banding patterns and sequence analysis of the internal transcribed spacer of rDNA of *Stemphylium solani* isolates from cotton. *Cur. Microbiol.* New York, V. 44, p. 323-328, 2002.

METHA, A; METHA, Y. ROSATO Y. B. ERIC and REP –PCR amplify non-repetitive fragments from the genome of *Drechslera avenae* and *Stemphylium solani*. *FEMS Microbiol. Let.* V. 211, p. 51-55, 2002.

MULLIS, K. B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R. A. PCR, The polimerase Chain reaction, Birkhauser, Masachussts, EUA, 1994.

NINET, B.; ISABELL, J., BONTEMS, LECHENNE, B.; JOUSSON, O.; PANIZZON, R.; LEW, D.; MONOD, M. identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 41, p. 826-830, 2003.

NOLLAU, P.; WAGENER, C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assement. *Clin Chems.* V. 43, p.1114-1128, 1997.

ODDS, F. C.; ARAI, T.; DISALVO, A. F.; EVANS, E. G. V.; HAY, R. J.; RANDHAWA, H. S.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J. Nomenclature of fungal disease: a report and recommendations from a sub-committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). *J. Med. Vet. Mycol.*, Dorchester. v.30, p. 1-10, 1992.

PADHYE, A. A.; HAMPTON, A. A.; HAMPTON, M. T.; HUTTON, N. W.; PREVOST-SMITH, E. AND DAVAS, M. S. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago. v.22, p. 331-335, 1996.

PADHYE, A. A.; MCGINNIS, M. R. Fungy causing eumicotic mycetoma. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. and Yoken, R. H. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7^o ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 1999. p. 1318-1326.

PEREZ-BLANCO, M.; HERNÁNDEZ VALLES, R.; ZEPPENFELDT, G. F.; APITZ – CASTRO, R. Ajoene and 5-fluorouracil in the topical treatment of

Cladophialophora carrionii chromoblastomycosis in humans: a comparative open study. *Medical Mycology*. Oxfordshire. V. 41, n. 6, p. 517-520, 2003.

PIRES, M.C.; COSTA, A. R.; MULLER, H.; GATTI, T. R. S.R.; REIS, V. M. S. Feo-hifomicose subcutânea por *Mycelia Sterila* com flebite local ascendente: relato de caso. *An. Bras. Dermatol.* V.71, p.323-325, 1996.

PIVETTA, M. Da malária às doenças emergentes. *Revista Fapesp*, 73, 2002.

QUEIROZ-TELLES, F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.30, n.4, p. 345-346., 1997.

QUEIROZ-TELLES, F.; PURIM, K. S. FILLUS, J. N.; BORDIGNON, G. F.; LAMEIRA R. P.; CUSTEM, J. V. CAUWENBERGH, G. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia. v.31, p. 805-812. 1992.

QUEIROZ-TELLES, F.; WANKE, B. W.; MONTEIRO, P. C. F.; BORDIGNON, G. F.; RAMOS, L. R.; LONDERO, A. T. Chromoblastomycosis caused by different species of *Exophiala*. In: XXXII CONGRESSO DA SBMT, 1996. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 29, supl 1, p.117.

RESTREPO, A. Treatment of tropical mycosis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis. v.31, supl. 3Pt2, p.91 -102, 1994.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*. v.42, p.265-270, 1950. Apud: MCGINNIS, M. R. *Laboratory Handbook of medical mycology*. New York: Academic Press, 1980, 661p.

RIPPON, J. W. The Subcutaneous Mycoses - Chromoblastomycosis. In: Rippon, J. W.- *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982. p. 276-296.

ROGERS, S. O.; MCKEMY, J. M., WANG, C. J. K. Molecular assessment of *Exophiala* and related black yeast genera. *Studies in Mycology*, Baarn, n. 43, p. 122-133, 1999.

ROSSMANN, S. N.; CERNOCH, P.; DAVIS, J. R. Dematiaceous fungi are increasing cause of human disease. *Clin. Infect. Dis.* Chicago, V.22, p.73-80, 1996.

SALGADO, C.G.; SILVA, J. P.; DINIZ, P. J. A.; SILVA, M. B.; P. F. C., TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev. inst. Med. Trop.* São Paulo, V. 46, p. 33-36, 2004.

SAM MILAM, R., GUINDÓS. G., GARAIZAR, J., SALESA, R., GUARRO, J. Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 35, p. 2270-2274, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANITS, T. Molecular Clonig: A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, CSH, 2002(3v).

SEVIGNY, G. M.; RAMOS – CARO, F. A. Treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* with low – dose terbinafina. *Cutis*, V. 66, p. 45-46, 2000.

SHELL, W. A.; PASARELL, L.; SALKIN, I. F.; MCGINNIS, M. R. *Bipolaris*, *Exophiala*, *Scedosporium*, *Sporothrix*, and other dematiaceous fungi. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. and Tenover, R. H. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6^o ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 1995. p. 852-846.

SHELL, W. A.; PASARELL, L.; SALKIN, I. F.; MCGINNIS, M. R. *Bipolaris*, *Exophiala*, *Scedosporium*, *Sporothrix*, and other dematiaceous fungi. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. and Tenover, R. H. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7^o ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 1999. p. 1295-1317.

SHELL, W. A.; MCGINNINS, M. R.; BORELLI, D. – *Rhinocladiella aquaspersa*, a new combination for *Acrotheca aquaspersa*. *Mycotaxon*. v.17, p.341-348, 1983.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated sequence located in the intergenic region of the bacterial chromosomes. *Acid Nucleic Res. Oxford*. V. 18, p. 6503-6508, 1990.

SHIN, J. H.; NOLTE, F. S.; HOLLOWAY, B. P.; MORRISON C. J. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5'exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* Washington. V. 37, p.165-167, 1999.

SILVA, A. C. M.; MORAES, M. S. C.; NASCIMENTO, J. L.; SILVA, C. C. M.; PORTELA, Y. M. C.; MARQUES, S.; CAMARGO, Z. P. E COSTA, J. M. L. Estudo epidemiológico da cromomicose na microrregião da baixada ocidental maranhense - municípios de Anajatuba e Alcântara. *Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Tropical*. 1991. p. 272,.

SILVA, A. C. M.; NETO, A. S.; GALVÃO, C. E.; MARQUES, S.; SALDANHA, A. C.; SILVA, C. C. M.; FISCHMAN, O.; SILVA, R. R.; COSTA, J. M. L. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão. I - Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. *Rev. Socied. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.25, n.1, p. 37-44, 1992.

SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; RONZENTAL, S. Cromoblastomicose no Estado do Pará: uma revisão (de 1942 à 1997) dos últimos 55 anos. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA., Rio de Janeiro. 1998. ANNAIS. p. 90.

SILVA, C. M. P.; ROCHA, R. M.; MORENO, J. S.; BRANCO, M. R. F. C.; SILVA R. R.; MARQUES, S. G.; COSTA, J. M. L. - O babaçu (*Orbignia phalerata* Martins) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente da cromoblastomicose no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.28, n.1, p. 49-52, 1995.

SILVA, C. M. P.; SILVA, A. C. M.; MARQUES, S.; SALDANHA, A. C.; NASCIMENTO, J. D'ARC L.; BRANCO, M. R. F. C.; SILVA R. R.; COSTA, J. M. L. Associação de cromoblastomicose e hanseníase: relato de dois casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.27, n.4, p. 241-244, 1994.

SILVA, J. P.; SOUZA, W.; RONZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). *Mycopathologia*. The Hague. v.143, p.171-175, 1999.

SPATAFORA, J. W.; MITCHEL, T. G.; VILGALYS, R. Analysis of genes coding for Small-Subunit rRNA Sequences in Studing Phylogenetics of dematiaceous Fungal Pathogens. *J. Clin. Microbiol.* Washington, V.33, p. 1322-1326, 1995.

SOLANO, A. E. - Tratamiento de la cromoblastomycosis con thiabendazole. *Med. Cut. ILA*. v.3, p.277-282, 1966.

STERN, M. J.; AMES, G. F. L. SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C. HIGGINS, C. F. Repetitive Extragenic Palindrome sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, V. 37, p. 1015-1026, 1984.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences I eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, Oxford, V. 19, n.º 24, p. 6823 – 6831, 1991.

VERWEIJ, P. E.; FIGUEROA, J.; VAN BURIK, J.; HOLDOM, M. D.; DEICAS, E.; GÓMEZ, B. L.; MENDES-GIANNINI, M. J. Clinical applications of non-culture based methods for the diagnosis and management of opportunistic and endemic mycoses. In: PROCEEDINGS OF THE XIV CONGRESS INT. SOC. HUM. MYCOL. – ISHAM. Buenos Aires. 2000. *Medical Mycology*. Oxford, Restrepo, A. & Clemons, K. V. eds.. v. 38, sup. 1, p. 139-145, 2000.

VIDAL, M. S. M.; CASTRO, L. G. M.; CAVALCANTE, S. M. C.; LACAZ, C. S. Immunoprecipitation techniques and Elisa in the detection of Anti-*Fonsecaea pedrosoi* antibodies in chromoblastomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. São Paulo. V.45, n.º6, p. 315-318, 2003.

VIDAL, M. S. M.; CASTRO, L. G. M.; CAVALCANTE, S. C. ; LACAZ, C. da S. A highly specific and sensitive, immunoblotting-detected 54 kDa antigen from *Fonsecaea pedrosoi*. *Medical Mycologi. in press*.

VILLALBA, E.; YEGRES, J. F. Detection of circulating antibodies in patients affected by chromoblastomycosis by *Cladosporium carrionii* using doublé immunodiffusion. *Mycopathologia*. The Hague. V. 102, p. 17-19, 1988.

VIVIANE, MARIE, S. GRAYBILL, J. R., YAMAGUCHI, H., ANAÏSSIE, E., CAILLOT, D. New approaches to antifungal chemotherapy. In: PROCEEDINGS OF THE XIII CONGRESS INT. SOC. HUM. MYCOL. – ISHAM. Parma. 1997. *Medical Mycology*. Glasgow, Polonelli, L. ° and Walsh, T. J. 1998. v. 36, sup. 1, p. 194-206.

WALTZ, R.; BIANCHIM, M.; CHAVES, M. L.; CERSKI, M. R.; SEVERO, L. C.; LONDERO, A. T. Cerebral phaeophyphomycosis caused by *Cladophialophora bantiana* in brazilian drug abuser. *Med. Mycol.* Dorchester. V. 35, n° 6, p.427-431, 1997.

WEED, M.; MULLER, D.; TINTELNOT, K.; DE HOOG, G. S.; STAHL, U. PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. *Med. Mycol.* Plymouth, V. 36. n.° 2, p. 61-67, 1998.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primed. *Nucleic Acids Res.* Oxford. V. 19, p. 303-306, 1990.

WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: McGinnis, M. R. ed. *Current topics in medical mycology*. V.2 New York: Springer - Verlag, 1987. p. 338-387.

WHET, L. J. Histoplasmosis: experience during outbreaks in Indianapolis and review of the literature. *Medicine*, V. 76, p. 339-334, 1997.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. S. & Gelfand, D. H. (eds): *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, p. 315-322, 1990. *Nucleic Acids Res. Oxford* . V. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K; LIVAK, A. R.; RAFASKI, J. A.; TINGSLEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res. Oxford*. V. 18, p. 6531-6535, 1990.

YANASE, K., YAMADA, M. Pocket warmer therapy of chromomycosis. *Arch. Dermatol.*, v.114, p.1095, 1978. Apud: RIPPON, J. W. The Subcutaneous Mycoses - Chromoblastomycosis. In: Rippon, J. W.- *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982. p. 276-296.

YU, R. Successful treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. *Mycoses*. Berlin. v.38, p.79-83, 1995.

YU, T. C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. *Clin. Infect. Dis.* Chicago. v.19, supl., p.54-58, 1994.

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

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas
Laboratório de Micologia Clínica

Ficha simplificada para análise morfológica de fungos filamentosos

Procedência da cepa:

Registro no.: _____

Data de isolamento: _____

Data de entrada no Laboratório: _____

Observações: _____

1. Estudios morfológicos

1.1 - Crescimento no meio de: agar Sabouraud dextrose () agar mycosel ()

1.2 Temperatura: _____

1.2 - Velocidade de crescimento: rápido (até 3 dias) ()
 médio (até 7 dias) ()
 lento (superior a 12 dias) ()

1.3 - Aspectos macroscópicos (método da colônia gigante):

1.3.1 - Em meio de ágar batata

1.3.1.1 - Velocidade de crescimento:	rápido	(até 3 dias)	()
	médio	(até 7 dias)	()
	lento	(superior a 12 dias)	()

Tamanho: cm, data _____

Tamanho: _____ cm, data _____

Tamanho: _____ cm, data _____

Tamanho: _____ cm, data _____

1.3.1.2 - Aspecto (topografia):

- a) circulares ()
- b) elevadas ()
- c) sulcadas ou pregueadas ()
- d) zonadas (faixas concêntricas de aspecto e cor diferentes) ()
- e) planas ()
- f) não sulcadas ()
- g) bordas lisas
- h) bordas onduladas ()
- i) elevadas, centro saliente ()
- j) sulcos radiais; bordas lisas ou onduladas ()
- k) cerebriformes, plana e/ou ondulada
- l) úmido ()
- m) seco ()
- n) micélio aéreo abundante ()

1.3.1.3 - Pigmento:

- a) anverso ()
- b) verso ()
- c) difuso no meio de cultura ()

cor do pigmento: _____

1.3.1.4 - Gotículas (exsudato)

- a) escassas ()
- b) abundantes ()
- c) transparentes ()
- d) opacas ()
- e) brilhantes ()
- f) coloridas ()

1.3.1.5 - Textura;

- a) granulosa (como areia fina) ()
- b) pulverulenta (como talco ou farinha) ()
- c) velutina (aveludada) ()
- d) cotonosa (aspecto de algodão) ()
- e) glabrosa (membranosa e/ou coriácea) ()
- f) feltrada (aspecto de feltro) ()
- g) lanoso (aspecto de lã) ()
- h) terroso ()
- i) camurça ()
- j) cremosa ()

1.4 - Aspectos Microscópicos (Ridell, 1950):

1.4.1 - Em meio de ágar dextrose batata

Tempo de desenvolvimento: _____ dias

Temperatura: _____

1.4.1.1 - Hifas:

- a) diâmetro: _____
- b) pigmento presente: _____
- c) pigmento ausente ()
- d) septadas ()
- e) não septadas ()

1.4.1.2 - Conidióforo:

- a) simples ()
- b) ramificado ()
- c) extremidades dilatadas (vesículas) ()

1.4.1.3 - Conídios:

presentes ()
ausentes ()
arranjo em cadeia ()
arranjo em cachos ()
pigmento _____

Observações: _____

Desenho

Tabela Resultados das análises dos fragmentos gerados pela técnica RFLP com as enzimas *DdeI* e *TaqI* das 46 amostras sequenciais de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de 11 pacientes com cromoblastomicose.

Pacientes	Número da cepa	Data isolamento	Tamanho ITS5-NL4	Número de bandas <i>DdeI</i>	Número de bandas <i>TaqI</i>
JDN	12	Dez/1995	≅ 1800pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
JDN	28	9/12/97	≅ 1800pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
JDN	32	02/04/98	≅ 1800pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
AMJ	19	26/08/97	≅ 1400pb	6 (2>267pb)	4 (2>267pb)
AMJ	27	02/12/97	≅ 1800pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
AMJ	29	02/04/98	≅ 1400pb	6 (2>267pb)	4 (2>267pb)
AMJ	30	07/04/98	≅ 1800pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
AMJ	75	18/09/01	≅ 1800pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
AMJ	76	16/10/01	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
AMJ	80	11/12/01	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
AMJ	84	08/08/02	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
OAS	20	26/08/97	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
OAS	22	30/09/97	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
OAS	31	28/04/98	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
OAS	50	25/04/99	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
OAS	55	14/10/99	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
OAS	57	06/07/00	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
OAS	65	10/10/00	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
OAS	69	10/01/01	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
OAS	70	20/03/01	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
OAS	71	27/03/01	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
OAS	78	08/11/01	≅ 1800 pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
JZN	26	12/12/97	≅ 1400pb	6 (2>267pb)	3 (2>267pb)
JZN	41	03/09/98	≅ 1400pb	6 (2>267pb)	3 (2>267pb)
JZN	45	02/1999	≅ 1800 pb	6 (3>267pb)	6 (3>267pb)
JZN	72	31/07/01	≅ 1800 pb	6 (3>267pb)	6 (3>267pb)
JGL	34	20/06/98	≅ 1400pb	6 (2>267pb)	3 (2>267pb)
JGL	35	22/06/98	≅ 1400pb	6 (2>267pb)	3 (2>267pb)

Tabela (continuação)

JMC	36	29/06/98	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
JMC	43	08/12/98	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
JMC	46	27/04/99	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
JMC	47	25/05/99	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
MFS	48	25/05/99	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
MFS	51	29/06/99	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
MFS	66	22/10/00	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
MFS	77	04/10/01	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
MFS	81	09/04/01	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	4 (2>267pb)
OP	56	01/10/99	$\cong 1400$ pb	5 (2>267pb)	4 (2>267pb)
OP	60	08/8/00	$\cong 1800$ pb	6 (3>267pb)	7 (3>267pb)
OP	63	14/09/00	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	7 (3>267pb)
OP	68	07/11/00	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	4 (2>267pb)
AJO	64	13/09/00	$\cong 1400$ pb	6 (2>267pb)	3 (2>267pb)
AJO	67	14/11/00	$\cong 1400$ pb	6 (2>267pb)	3 (2>267pb)
FJO	73	08/06/01	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
FJO	79	28/08/01	$\cong 1800$ pb	6 (3>267pb)	6 (3>267pb)
JRS	82	28/09/01	$\cong 1800$ pb	6 (3> 267pb)	6 (3>267pb)
JRS	83	07/05/02	$\cong 1800$ pb	6 (3>267pb)	6 (3>267pb)