

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS
DA CROMOBLASTOMICOSE**

VÂNIA APARECIDA VICENTE

Bióloga

Orientador: Prof^a Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 2000

ERRATA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KNOW-CHUNG, K.J.; WICKES, B.L.; PLASKOWITZ, J. Taxonomic clarification of *Cladosporium trichoides* Emmons and its subsequent synonyms. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.27, p.413-426, 1989.
- MEIJER,G.;MEGNEGNEAU,G.;LINDERS,E.G.A. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycol. Res.**, v.98, p.267-276, 1994.
- NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; KAWAI, R. An isolate of *Phialophora dematitidis* isolated from a humidifier. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v.21, p.30, 1980.
- TIMOKHOVSHII, I.A. A case of chromoblastomycosis due to *Phialophora compacta* newly isolated in USSR. **Vestnik Dermatologii I Venerologii (Moskva)**, v.6, p.23-25, 1983.
- VARGA, J.; CROFT, J.H. Assignment of RFLP, RAPD and isoenzyme markers to *Aspergillus nidulans* chromosomes, using chromosome-substituted segregants of a hybrid of *A. nidulans* and *A. qusdrilineatus*. **Current Genetics, Berlin**, v.25, p.311-317, 1994.
- VASCONCELOS, M.J.V. et al. Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA. **Fitopatol. Bras.**, v.19, p.520-3, 1994.
- ZEPPENFELDT, G., RICHARD-YEGRES, N.; YEGRES, F.; HERNÁNDES, R. *Chadosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. **Revista Iberoam. Micol.**, v.11, p.61-63, 1994.

ERRATA

Referências Bibliográficas acrescentadas após a página 172:

Know-Chung *et al.*, 1985; Meijer *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 1980; Timokhovshii, 1983; Varga & Croft, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994; Zeppenfeldt *et al.*, 1994.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Vicente, Vânia Aparecida
Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose / Vânia Aparecida
Vicente. - Piracicaba, 2000.
181 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Classificação (biologia) 2. Filogênia 3. Fungo patogênico 4. Isolamento 5. Marcador genético 6. Micologia médica 7. Sequência de nucleotídeo I Título

CDD 616.969

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À Maria Mãe de Jesus, pela sua
intercessão junto a Deus e presença
constante em minha vida.

Dedico

A meus pais, Amador e Ednéia Vicente, pela minha formação.

À Vera e Manoel Andrade pelo apoio inestimável.

Ao meu esposo Guilherme e meu filho Lucas, pela paciência
e ajuda constante, sem a qual não haveria esta Tese.

Ofereço

Agradecimentos

- À Professora Dra. Aline A. P. Kleiner, pela sua amizade, orientação, dedicação e estímulo constantes, que muito contribuíram para a elaboração deste trabalho.
- À Dra. Derlene S. A. Angelis, pela amizade, seus ensinamentos sobre “dematiáceos”, colaboração constante nas diversas etapas deste trabalho e às valiosas sugestões na correção do manuscrito e também pelo companheirismo e paciência de seu esposo Abel.
- À Dra. Chirlei C. Glienke de Blanco, pelo incentivo incansável, dedicação, competência e disposição, com suas valiosas sugestões sobre os “RAPDs” e ao seu esposo Humberto pela agradável convivência.
- Ao Dr. Flávio Queiroz-Telles, pelas orientações iniciais neste trabalho, contribuindo com o fornecimento de amostras de fungos.
- Às minhas irmãs Margarete e Eliane e meus familiares pelo incentivo com palavras de conforto e carinho, principalmente nos momentos de dificuldade. E em especial ao meu cunhado Mário Sérgio, pelo companheirismo, sugestões e apoio.
- Aos colegas de pós-graduação, funcionários e amigos da ESALQ/USP, pelo convívio agradável e a acolhida durante o período deste curso, especialmente Cláudia, Victor, Nirlei, Carlos, Luciana e aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos.
- À Silvânia Machado, do Centro de Microscopia Eletrônica da ESALQ/USP, pela amizade e auxílio constante nas análises de microscopia.
- À bibliotecária Beatriz, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela valiosa correção das referências bibliográficas.

- À Clarice Foggiatto de Andrade e seu filho Rodrigo Foggiatto de Andrade pela grande contribuição prestada na digitação deste trabalho.
- Aos funcionários do Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio na realização das atividades de pesquisa.
- À Universidade Federal do Paraná pelo auxílio financeiro e o apoio concedido para a realização deste. Em especial, os Departamentos de Patologia Básica, Genética e Bioquímica pela acolhida nos laboratórios e empréstimo de equipamentos, que muito contribuíram para o andamento desta pesquisa.
- Às professoras Débora e Ida e a estagiária Ana pela amizade e contribuição nas atividades de laboratório, principalmente durante meu afastamento.
- Ao Biotério da Universidade Federal do Paraná pelo espaço concedido.
- Aos colegas e funcionários da Universidade Federal do Paraná, pela amizade e apoio. E em especial ao chefe do Departamento de Patologia Básica na vigência deste, Professora Rosângela, e todos os Professores pelo convívio e apoio inestimável nas lutas diárias.
- Ao estudante de doutorado Leonardo, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, por suas contribuições valiosas na análise dos dados.
- Ao Centro Nacional de Pesquisa de Florestas/EMBRAPA, pela oportunidade e apoio durante parte do desenvolvimento dessa pesquisa.
- À Maria Elisa C. Graça e a Maria Cristina Mazza, pela acolhida no Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio e incentivo constante.
- Ao Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn - Holanda, e em especial ao amigo Dr. Sybren de Hoog, pelo apoio e auxílio financeiro no desenvolvimento desta pesquisa.
- À FUNPAR pelo apoio financeiro na compra de material de laboratório.
- À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.
- Aos meus queridos amigos, que sempre me apoiaram, e sem os quais a minha vida não teria o mesmo sentido.

SUMÁRIO

	pg.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Fungos Dematiáceos.....	3
2.1.1. Posição Taxonômica	3
2.1.2. Importância Clínica.....	6
2.1.2.1. Cromoblastomicose	9
2.1.2.2. Agentes etiológicos da cromoblastomicose	14
2.1.3. Isolamento de fungos dematiáceos de interesse clínico da natureza	18
2.1.3.1. Nichos naturais e fatores de virulência dos fungos dematiáceos	20
2.2. Identificação, taxonomia e filogenia de fungos dematiáceos de importância clínica	22
2.2.1. Testes fisiológicos para identificação de fungos dematiáceos	24
2.2.2. Métodos moleculares	25
2.2.2.1. PCR (“Polimerase Chain Reaction”).....	26
2.2.2.2. RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39

3.1. Meios de cultura e soluções utilizadas	39
3.1.1. Ágar Extrato de Malte - MEA	39
3.1.2. Meio para identificação - OA	39
3.1.3. Meio de isolamento - ECA	39
3.1.4. Ágar Sabouraud Dextrosado	39
3.1.5. Ágar Sabouraud com Ciclohexamida e Cloranfenicol ("Mycosel")	40
3.1.6. Ágar Sabhi	40
3.1.7. Ágar Sabouraud	40
3.1.8. Ágar Sangue	40
3.1.9. Uréia Ágar Base	41
3.1.10. Meio para a produção de atividade protease	41
3.1.11. Ágar Arbutina	41
3.1.12. Czapeck-Dox Ágar – CD	42
3.1.13. Meio Butterfield – BF	42
3.1.14. Meio Mínimo – MM	42
3.1.15. Meio Batata-Glicose-Ágar – BDA	43
3.1.16. Solução salina	43
3.1.17. Solução de "Tween 80" (0,1 ou 10% v/v)	43
3.1.18. Solução reagente para atividade proteolítica	43
3.1.19. Solução de ciclohexamida	43
3.1.20. Solução base de nitrogênio para a assimilação de carbono	43
3.1.21. Soluções fontes de carbono	44
3.1.22. Solução base de carbono para a assimilação de nitrogênio	44
3.1.23. Soluções fonte de nitrogênio	44
3.1.24. Solução glicosada	45

3.1.25. Solução fonte de sais	45
3.1.26. Solução básica para a tolerância à ciclohexamida.....	45
3.1.27. Tampão fosfato 0,2 M pH 5,8	45
3.1.28. Tampão CTAB.....	46
3.1.29. Tampão (TE).....	46
3.1.30. Solução EDTA + 1% N-Laurilsarcosinato de Sódio (NaEDTA).....	46
3.1.31. Solução EDTA 0,5 M pH 8,0.....	46
3.1.32. Solução estoque de Tris-HCl 1 M pH 9,5	46
3.1.33. Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X).....	46
3.1.34. Tampão de amostra para gel de agarose (TEB 10X)	46
3.1.35. Solução corante para eletroforese	47
3.1.36. Gel de agarose 0,8%	47
3.1.37. Gel de agarose 1,4%.....	47
3.1.38. Tris-acetato (TAE) 50x	47
3.1.39. Brometo de etídio.....	47
3.1.40. “Primers”	48
3.1.41. Taq polimerase	48
3.1.42. dNTPs	48
3.2. Preparo de material.....	48
3.2.1 Esterilização.....	48
3.2.2. Incubação.....	48
3.3. Isolamento dos fungos no meio ambiente.....	48
3.4. Identificação das linhagens isoladas	49
3.5. Linhagens utilizadas	50
3.6. Estudo da patogenicidade dos isolados	51

3.7. Testes fisiológicos	52
3.7.1. Teste de assimilação de carbono.....	52
3.7.2. Teste de assimilação de nitrogênio.....	52
3.7.3. Atividade protease (liquefação de gelatina).....	53
3.7.4. Teste de assimilação de arbutina em meio sólido	53
3.7.5. DNASE extracelular	53
3.7.6. Produção de urease	53
3.7.7. Tolerância à ciclohexamida	54
3.7.8. Osmotolerância.....	54
3.7.9. Termotolerância.....	54
3.8. Avaliação do crescimento em propranolol	54
3.9. Extração e quantificação de DNA	55
3.10. PCR – amplificação e seqüenciamento.....	55
3.10.1 – PCR - Ribotipagem	55
3.10.2. Reação de seqüenciamento.....	56
3.10.3. Precipitação do DNA para ser seqüenciado	56
3.10.4. Seqüenciamento	57
3.10.5. Alinhamento das seqüências e construção da árvore filogenética	57
3.11. RAPD – Amplificação	57
3.12. Eletroforese dos produtos de RAPD	58
3.13. Análise do poliformismo obtido por RAPD.....	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1. Isolamento de fungos dematiáceos de fontes ambientais	59

4.2. Identificação e caracterização biológica de fungos dematiáceos isolados de fontes ambientais	70
4.2.1. Morfologia	70
4.2.2. Caracterização do crescimento	80
4.2.3. Testes Fisiológicos.....	82
4.4. Teste de patogenicidade dos isolados.....	86
4.5. Produção de corpos muriformes “in vitro”	88
4.6. Caracterização molecular dos isolados	89
4.6.1. PCR – Gene Específica.....	89
4.6.2. Seqüenciamento	95
4.6.3. RAPD	105
5. CONCLUSÕES	115
ANEXOS	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
APÊNDICES	173

LISTA DE FIGURAS

	pg.
Figura 1. Família Herpotrichiaceae: posição taxonômica dentro do reino fungi (adaptação: Hoog & Guarro, 1995).....	4
Figura 2. Lesões tumorais, aparência de couve-flor: (a) verruciforme; (b) lesões com linfodema e elefantíase do membro. Fonte: Queiroz-Telles, 1996.....	10
Figura 3. Corpos muriformes, células septadas encontradas no tecido do hospedeiro infectado. Fonte: “Medical Mycology Research Center”	14
Figura 4. Esporulação do tipo <i>Cladosporium</i> predominante em <i>F. pedrosoi</i> . Fonte: “Medical Mycology Research Center”	15
Figura 5. Diferentes tipos de esporulação do Gênero <i>Fonsecaea</i> : a - conidióforos simpodiais; b - conídios; c - sinanamórfico – <i>Phialophora</i> ; d - conidióforo ramificado e conídios de <i>F. compacta</i> . (adaptação: Hoog & Guarro, 1995).....	16
Figura 6. <i>Cladophialophora carrioni</i> : (a) conidióforo; (b) conídios em forma de limão à fusiformes com diâmetro médio de 4,5µm x 26µm; (c) fiálide com fialoconídios (adaptação: Hoog & Guarro, 1995).....	17
Figura 7. As regiões naturais do estado do Paraná e o local de início da infecção em pacientes com cromoblastomicose. (Fonte: Queiroz-Telles, 1996).....	50

- Figura 8. Amostras de isolamento de fungos dematiáceos em meio Mycosel.
 A) diluição de 10^7 células/mL e B) diluição de 10^3 células/mL62
- Figura 9. Capim “lambe-lambe”, folhas pilosas com margens ásperas, coletado no município de Campo Largo-PR (1º Planalto).....69
- Figura 10. Características micromorfológicas dos isolados: a) *Cladosporium* - conídios elípticos produzidos em cadeias ramificadas, presença de cicatrizes escuras nos disjuntores; b) *C. bantiana*, longas cadeias de conídios, fusiformes e cilíndricos, com ramificação lateral; c) *C. devriseii*, conídios ovalados em cadeia, presença de denticulos; d) *C. arxii*, conidióforo ramificado formando pequenas cadeias de conídios em forma de limão; e) *Cladophialophora* sp, longas cadeias de conídios fusiformes à forma de limão achatada; f) *Exophiala jeanselmei* var. *lecanii-comi*, conídios ovalados e em longas cadeias com presença de clamidosporos; g) *P. verrucosa*, presença de fiálides; h) *F. pedrosoi*, hifas septadas, formação de conídios primários e secundários a partir da célula conidiogênica; i) *Ramichloridium*, conidióforo ereto e conidióforo primário alongado; j) conidióforo acastanhado ereto com formação simpodial de conídios ovalados; k e l) *Veronea carbiniae*, formação simpodial, conídios acastanhados arredondados no ápice e presença de cicatrizes na base; às vezes septados..... 71
- Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). a) Esporulação do tipo *Cladosporium* : conidióforo ramificado; b) denticúlos observados na conidiogênese do tipo *Cladosporium*; c) *Cladophialophora bantiana* cadeias com denticúlos72
- Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de isolados *Exophiala*: a) e b) longas cadeias de conídios arredondados formados por gemulação sucessiva ; c) conídios arredondados formados em fiálides; d) desenvolvimento leveduriforme, presença de células cilíndricas e gemulação sucessiva 74

Figura 13. Observações de fiálides com produção de conídios ovais do isolado FB6 de <i>Exophiala</i> , sob Microscopia Ótica (aumento 1000 vezes)	75
Figura 14. Fotomicrografias dos isolados FE5P4 de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> : a) denticulo na conidiação do tipo simpodial, b) conidióforo, c) conidiogênese característica da espécie; e FE3 de <i>Phialophora verrucosa</i> : d) conidiogenise, e) fiálide com colarete, f) produção de conídios ovais.....	76
Figura 15. Observação ao Microscópio Ótico (400 vezes) do isolado FCL2, revelando a presença de fiálides, células conidiogênicas do tipo <i>Phialophora</i>	77
Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura de <i>Ramichloridium</i> sp, a e b) formação simpodial de conídios; c e d) presença de cicatrizes e denticulos distais.....	78
Figura 17. Conidiogênese terminal com conídios ovais característica de <i>Rhinocladiella</i> sp. Observada em Microscópio Ótico comum (1000 vezes)	79
Figura 18. Crescimento em meio mínimo dos isolados: a) FE9; b) FE5P4; c) CBS 271.37.....	81
Figura 19. Lesões (indicadas pela seta) em camundongos do tipo Balb C, produzidas a partir do inóculo dos isolados FE5P4 de <i>F. pedrosoi</i> e FE9 de <i>C. bantiana</i>	86
Figura 20. Teste de patogenicidade com a linhagem sapróbia FE5P4. Camundongo morto após 5 semanas do inóculo.....	87
Figura 21. Observação da diferenciação de hifas para formação de corpos muriformes “in vitro” sob Microscopia Ótica. a) hifas catenuladas com formação de corpos arredondados (400X); b) corpos arredondados acastanhados (400X); c) corpos arredondados (1000X).....	88

- Figura 22. Produtos de amplificação com os “primers” VG9 e LS266. A) 1 e 20 marcador de peso molecular (“Ladder” 200pb), 2 a 19 linhagens referência *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*; B) 1 e 20 marcador de peso molecular, 2 a 19 isolados do ambiente; C) 1 e 15 marcador de peso molecular, 2 a 14 linhagens referência *F. pedrosoi*; D) 1 e 10 marcador de peso molecular, 2 a 9 linhagem *F. pedrosoi* de pacientes90
- Figura 23. A) Amplificação com os “primers” ITS5-ITS4. 1,16 ,17, 26 marcador de peso molecular (“Ladder” 200pb); 2 e 18 branco; 3 a 8, 11,12, 19 a 23 linhagens com “intron”; 9,10, 13 a 15, 24, 25 sem “intron”. B) produtos de amplificação com os “primers” ITS1-ITS4. 1 e 18 marcador de peso molecular, 2 linhagem sem “intron”, 4 a 16 linhagem com “intron”, 17 branco92
- Figura 24. Representação gráfica dos sítios específicos de ligação dos “primers” ITS4 e ITS5, V9D e LS266 e suas localizações dentro do DNAr e a provável localização do “intron” dentro do domínio variável da sub-unidade menor 18S do DNAr, verificado nas linhagens CBS 212.77, Fp77, Fp37 e FP4IIB.93
- Figura 25. Árvore filogenética desenhada pelo método “neighbor-joining”, programa “PHYLP” (Felsenstein,1993) a partir das seqüências apresentadas no Anexo D. As distâncias foram calculadas pelo método Jukes & Cantor (1969) utilizando 100 reamostragens de “bootstrap”97
- Figura 26. Árvore filogenética da família Herpotrichiellaceae obtida à partir das comparações de seqüências ITS1, ITS2 e 5.8S do DNAr pelo método de “neighbor-joinng” do programa “Treecon” (Van de Peer & Wachter,1993) com 100 reamostragens de “bootstrap”. Somente valores acima de 80% foram indicados para os grupos (I-X) e subgrupos (A-Z) discutidos no texto. * Linhagem sapróbia CBS; ** Linhagem patogênica CBS; *** Isolado sapróbio (PR); **** Isolado de pacientes com cromoblastomicose (PR)..... 100

- Figura 27. Perfil de RAPD obtido com o “primer” Opx 11: marcador de peso molecular, 1 a 10 linhagens referência de *F. pedrosoi*, 11 a 18 linhagens isoladas de pacientes, 19 a 23 isolados sapróbios de *F. pedrosoi* e relacionados, 24 a 39 linhagens referência de *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*, 40 a 47 isolados sapróbios relacionados..... 105
- Figura 28. Perfil de RAPD obtido com o “primer” Opx 12 : marcador de peso molecular, 1 a 10 linhagens referência de *F. pedrosoi*, 11 a 18 linhagens isoladas de pacientes, 19 a 23 isolados sapróbios de *F. pedrosoi* e relacionados, 24 a 39 linhagens referência de *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*, 40 a 47 isolados sapróbios relacionados..... 106
- Figura 29. Perfil de RAPD obtido com o “primer” Opx 14: marcador de peso molecular, 1 a 10 linhagens referência de *F. pedrosoi*, 11 a 18 linhagens isoladas de pacientes, 19 a 23 isolados sapróbios de *F. pedrosoi* e relacionados, 24 a 39 linhagens referência de *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*, 40 a 47 isolados sapróbios relacionados..... 106
- Figura 30. Perfil de RAPD obtido com o “primer” Opx 17: marcador de peso molecular, 1 a 10 linhagens referência de *F. pedrosoi*, 11 a 18 linhagens isoladas de pacientes, 19 a 23 isolados sapróbios de *F. pedrosoi* e relacionados, 24 a 39 linhagens referência de *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*, 40 a 47 isolados sapróbios relacionados..... 107
- Figura 31. Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética entre linhagens referência de *Fonsecaea pedrosoi*, *Ramichloridium*, *Rhinocladiella* e isolados sapróbios relacionadas, a partir dos “primers” Opx 11, 12, 14 e 17, utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard. * CBS/Linhagens sapróbias; ** CBS/Linhagens patogênicas; *** Isolado sapróbio-Paraná; **** Linhagens patogênicas/cromoblastomicose-Paraná..... 108

Figura 32. Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética entre linhagens referências de *Fonsecaea pedrosoi*, *Ramichloridium*, *Rhinoctadiella* e isolados sapróbios correlacionados, a partir dos “primers” Opx 11, 12, 14 e 17, utilizando o coeficiente de similaridade simples. * CBS/Linhagens sapróbias; ** CBS/Linhagens patogênicas; *** Isolado sapróbio-Paraná; **** Linhagens patogênicas/cromoblastomicose-Paraná..... 109

LISTA DE TABELAS

	pg.
Tabela 1. Infecções causadas por fungos Dematiáceos	6
Tabela 2. Agentes causadores da cromoblastomicose, isolados de pacientes de diferentes regiões do Estado do Paraná	50
Tabela 3. Linhagens referenciais de fungos dematiáceos gentilmente cedidas pelo CBS	51
Tabela 4. Isolamento de fungos dematiáceos de interesse médico de fontes ambientais nos diferentes locais de coleta	59
Tabela 5. Frequência de isolamento de fungos dematiáceos de interesse médico em diferentes regiões do Estado do Paraná	63
Tabela 6. Reisolamento em regiões da ocorrência de fungos dematiáceos de interesse médico	65
Tabela 7. Frequência de fungos dematiáceos isolados de diferentes substratos, considerando todas as coletas realizadas (1º e 2º isolamentos)	67
Tabela 8. Fungos dematiáceos isolados de diferentes regiões do Estado do Paraná, depositados no CBS/Baarn/Holanda	80
Tabela 9. Sequência e posições específicas dos “primers” para a amplificação dos diferentes domínios do DNAr	94

Tabela 10. Lista das linhagens analisadas e origem geográfica, com os agrupamentos obtidos a partir do alinhamento das seqüências das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S e as variações de tamanho dos fragmentos destes domínios	96
--	----

SUMMARY

Dematiaceous Fungi represent a large and diverse number of species grouped by the characteristic of pigmented cell wall of the vegetative and reproductive cells. They are found in nature mainly in the soil and litter, spreading through regions of tropical and subtropical weather. Many of them are saprophytic and have a fast growing rate, although one of the groups exhibits an evolutionary tendency towards causing disease in vertebrate hosts and therefore are gathered within the family Herpotrichiellaceae. Among the main diseases caused by these agents, the chromoblastomycosis and phaeohyphomycoses stand out. In general, the infection occurs due to the traumatic implantation of these into the host tissue. In the case of the chromoblastomycosis, the fungus may stay at the site with the formation of muriform cells, but it may also grow deep inside and spread on the host tissue, with the development of non-differentiated fungal elements, characterizing the phaeohyphomycoses. Chromoblastomycosis occurs mainly among the rural population who live in tropical areas, and it has already been reported in Brazil, specially throughout the state of Paraná. Cuts with plant fragments are the main cause of infection. This research aimed to isolate dematiaceous fungi, related to chromoblastomycosis, from environmental substrates at sites where the diseases occurred in the state of Paraná, and to compare their morphological, physiological and molecular features with reference and clinical strains. DNA markers and ITS sequences were investigated. In total, 540 samples were analyzed, which resulted in 81 (15,0%) isolates of dematiaceous fungi morphologically similar to classic agents of chromoblastomycosis (*Fonsecaea pedrosoi* and *Phialophora verrucosa*) and phaeohyphomycoses (*Cladophialophora bantiana* and *Exophiala jeanselmei*). The higher number of agents were recovered from the region of the first Platen. *Ramichloridium* and *Cladophialophora* were the most frequent genera. A distinct group was formed among *Fonsecaea* isolates grouping chromoblastomycosis agents and

some saprophytic representatives. A subgroup was observed among pathogenic and saprophytic strains coming from the same regions and genetically related to the genus *Cladophialophora*. Strains similar to *Ramichloridium* morphology were found spread out through the family Herpotrichiellaceae. The formation of a complex named *C. arxii* was verified grouping the greatest part of the saprophytic strains. Elements of insertion, introns, inside the small subunit 18S of the rDNA, were observed in the species correlated with the genus *Cladophialophora*. *C. bantiana* and *E. spinifera*, which contain agents of systematic and potential infection, showed themselves clearly separated from the *Fonsecaea* group, indicating a possible distinction between the agents of traumatic infection, whose formation of muriform cells seems to be the main factor in the occurrence of disease in the human chromoblastomycosis, as well as, the introns are directly related to the evolution of agents responsible for systemic infections. The potential for the formation of introns and the genetic proximity to pathogen isolates demonstrate the pathogenic potential of the saprophytic isolates.

RESUMO

Os fungos dematiáceos compreendem um grande número de espécies agrupadas pela característica de apresentarem pigmentação na parede celular das células vegetativas e reprodutivas. São encontrados na natureza, integrando principalmente a microbiota do solo e a matéria orgânica em decomposição, distribuindo-se em regiões de clima tropical e subtropical. Muitos deles são sapróbios e de crescimento rápido, porém existem os que exibem tendência evolucionária à patogenicidade em hospedeiros vertebrados e são portanto reunidos dentro da família Herpotrichiellaceae. Entre as principais doenças causadas por estes agentes, destacam-se a cromoblastomicose e a feohifomicose. Em geral, a infecção ocorre devido à implantação traumática destes no tecido hospedeiro, podendo permanecer localizada com a formação de corpos muriformes no caso da cromoblastomicose ou interiorizar-se e disseminar-se com verificação de elementos fúngicos não diferenciados no tecido do hospedeiro, caracterizando a feohifomicose. A cromoblastomicose ocorre principalmente entre a população rural de zonas tropicais, relatada no Brasil e em especial distribuindo-se por todo o Estado do Paraná, onde o traumatismo por fragmentos vegetais é a principal causa da infecção. Desta forma, o presente trabalho foi realizado com a finalidade de isolar fungos dematiáceos relacionados com a cromoblastomicose em locais de ocorrência da doença, no Estado do Paraná e compará-los por meio de micromorfologia, fisiologia, marcadores RAPD e seqüências ITS, com linhagens referência e de pacientes provenientes das regiões correspondentes aos locais de coleta. De um total de 540 amostras analisadas, foram recuperados 81 isolados dematiáceos (15,0 %) com morfologia semelhante a dos agentes clássicos da cromoblastomicose, como *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* e feohifomicose tais como *Cladophialophora bantiana* e *Exophiala jeanselmei*. Na região do primeiro planalto foi recuperado o maior número de agentes, sendo os gêneros *Ramichloridium* e *Cladophialophora* os mais freqüentes. Os isolados

sapróbios foram comparados com linhagens referência de *Rhinochlamydia*, *Ramichloridium*, *Fonsecaea* referência e isolados de pacientes com cromoblastomicose. Um grupo distinto foi formado para as espécies do gênero *Fonsecaea*, reunindo agentes da cromoblastomicose e alguns isolados sapróbios. Um subgrupo foi observado agrupando linhagens patogênicas e isolados sapróbios provenientes da mesma região, geneticamente relacionados com o gênero *Cladophialophora*. Linhagens com morfologia tipo *Ramichloridium* foram encontradas dispersas por toda família Herpotrichiellaceae. A formação de um complexo denominado *C. arxii* foi verificada reunindo a maior parte dos isolados sapróbios. Elementos de inserção, "intron", dentro da subunidade menor 18S do DNAr, foram observados nas espécies correlacionadas com o gênero *Cladophialophora*. As espécies *C. bantiana* e *E. spinifera*, contendo agentes de infecção sistêmica em potencial, apresentaram-se claramente separadas do grupo *Fonsecaea*, indicando uma possível distinção de agentes de infecção traumática cuja formação de corpos muriformes parece ser o principal fator de virulência em cromoblastomicose humana, assim como, os "introns" estão diretamente relacionados com a evolução dos agentes responsáveis por infecções sistêmicas. O potencial para a formação de corpos muriformes "in vitro", presença de "introns" e a proximidade genética com isolados patogênicos demonstram o potencial patogênico dos isolados sapróbios.

1. INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose caracteriza-se por uma infecção subcutânea, resultante da implantação traumática de propágulos originários de diversas espécies de fungos dematiáceos termotolerantes, promovendo uma infecção de curso crônico e manifestações clínicas polimórficas. Estes agentes provocam reação tissular inflamatória purulenta e granulomatosa, apresentando-se no tecido do hospedeiro em forma de estruturas globosas de parede espessa e acastanhadas, denominadas de corpos muriformes, os quais multiplicam-se pela formação de septos em um ou mais planos (Queiroz-Telles, 1996; Bittencourt *et al.*, 1994).

A doença em questão apresenta distribuição mundial, mas a maioria dos casos concentra-se nas regiões tropicais e subtropicais (Silva *et al.*, 1995; Al Doory, 1983; Carrion, 1947). Os fungos causadores da cromoblastomicose vivem saprobiamente, sendo isolados do solo, vegetais em decomposição e cascas de árvores. A doença ocorre em todas as faixas etárias, especialmente entre 30 a 40 anos, acometendo com maior frequência trabalhadores rurais, do sexo masculino, que sofrem traumatismos durante suas atividades, propiciando a penetração do agente (Silva *et al.*, 1995; Queiroz-Telles, 1996).

O número de espécies de fungos dematiáceos envolvidos na etiologia da cromoblastomicose ainda é matéria controversa. Embora haja consenso sobre o número de hifomicetos dematiáceos causadores da doença, outras espécies têm sido apontadas como agentes, por apresentarem elementos muriformes nas lesões. Os agentes classicamente envolvidos na etiologia desta doença são: *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Cladophialophora carrioni*, *Phialophora verrucosa*, e *Rhinocladiella aquaspersa* (Chandler *et al.*, 1980; Mc Ginnis, 1983; Rippon, 1988; Hoog & Guarro, 1995). No Brasil, esta infecção tem sido causada por *Fonsecaea pedrosoi* na maioria

dos casos. Raramente observam-se os agentes *F. compacta*, *P. verrucosa*, *R. aquaspersa*, *E. jeanselmei* e *E. castellanii* (Bittencourt *et al.*, 1994).

Devido à grande plasticidade morfológica das espécies de fungos dematiáceos patogênicos para o homem, sua classificação taxonômica não encontra-se totalmente definida. Hoog *et al.* (1977), sugeriram uma sinonímia entre *Rhinocladiella aquaspersa* e *Ramichloridium cerophilum*, porém McGinnis & Shell em 1980, propuseram trata-los separadamente. Masclaux *et al.* (1995), baseados na seqüência de rRNA de alguns fungos dematiáceos verificaram a afinidade dos gêneros *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Cladosporium* e *Exophiala* com espécies do gênero *Capronia*, membro da família *Herpotrichelaceae* dos *Ascomycetes*. Desta forma, a utilização de métodos de biologia molecular podem proporcionar uma caracterização mais refinada da taxonomia destes fungos superando as limitações morfológicas.

A evolução da patogenicidade desta família tem sido estudada através do gene ribossomal abrangendo os domínios fixos e variáveis. Uma hipótese supõe que os fatores de virulência podem ter sido adquiridos durante um episódio da evolução de um antepassado comum na forma de um ramo monofilético dentro da família *Herpotrichiellaceae* (Hoog *et al.*, 1999c). Estudos filogenéticos e taxonômicos de isolados sapróbios e patogênicos são de fundamental importância para a definição destes conceitos, assim como trabalhos de isolamento podem revelar a existência sapróbia destas espécies em regiões de ocorrência da doença. O conhecimento do nicho ecológico e da distribuição destas espécies na natureza pode elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da infecção e contribuir para o entendimento da sua possível rota.

Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou investigar a presença destes agentes na natureza em regiões de ocorrência da doença e estudar a relação dos isolados sapróbios com os de pacientes, visando o estudo da epidemiologia da doença e a obtenção de dados para o conhecimento da biodiversidade destas espécies. Seqüências ITS, marcadores de RAPD e fisiológicos foram utilizados para identificação e determinação das relações filogenéticas dos isolados dentro da família *Herpotrichiellaceae*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fungos Dematiáceos

Fungos dematiáceos constituem um grupo grande e heterogêneo, cuja principal característica é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas (Al-Doory, 1983; Bayles, 1989; Dixon & Polak-Wiss, 1991). Frequentemente, o pigmento acumulado é a melanina, especificamente dihidroxinaftaleno melanina-DHN (Dixon & Polak-Wiss, 1991).

2.1.1. Posição Taxonômica

Estes fungos estão amplamente distribuídos entre as divisões Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (Hoog & Haase, 1993). Estruturas morfológicas associadas às características do crescimento são critérios importantes, possibilitando o agrupamento de alguns gêneros.

O desenvolvimento filamentosos é caracterizado por colônias de aspecto escuro (marrom, verde oliva ou negras) onde microscopicamente observam-se hifas com septos escuros. Muitas espécies são sapróbias e de crescimento rápido, enquanto outras patogênicas desenvolvem-se lentamente em meios de cultura definidos (Hoog & Guarro, 1995).

Entre os dematiáceos de crescimento rápido alguns grupos são caracterizados por possuírem conídios multicelulares, septados transversalmente e longitudinalmente (dictioporos) tais como *Altemaria*, *Stemphylium*, *Epicoccum*, *Ulocladium*. Enquanto outros gêneros como *Curvularia* e *Drecheslera*, apresentam conídios multicelulares septados apenas transversalmente. Conídios unicelulares são característicos dos gêneros sapróbios *Cladosporium*, *Nigrospora* e *Aureobasidium*.

Os dematiáceos de crescimento lento produzem conídios por fiáldes com ou sem colaretes em cadeia ou simpodialmente, formando uma pequena família a Herpotrichiellaceae, a qual reúne especificamente agentes patógenos de humanos (Figura 1).

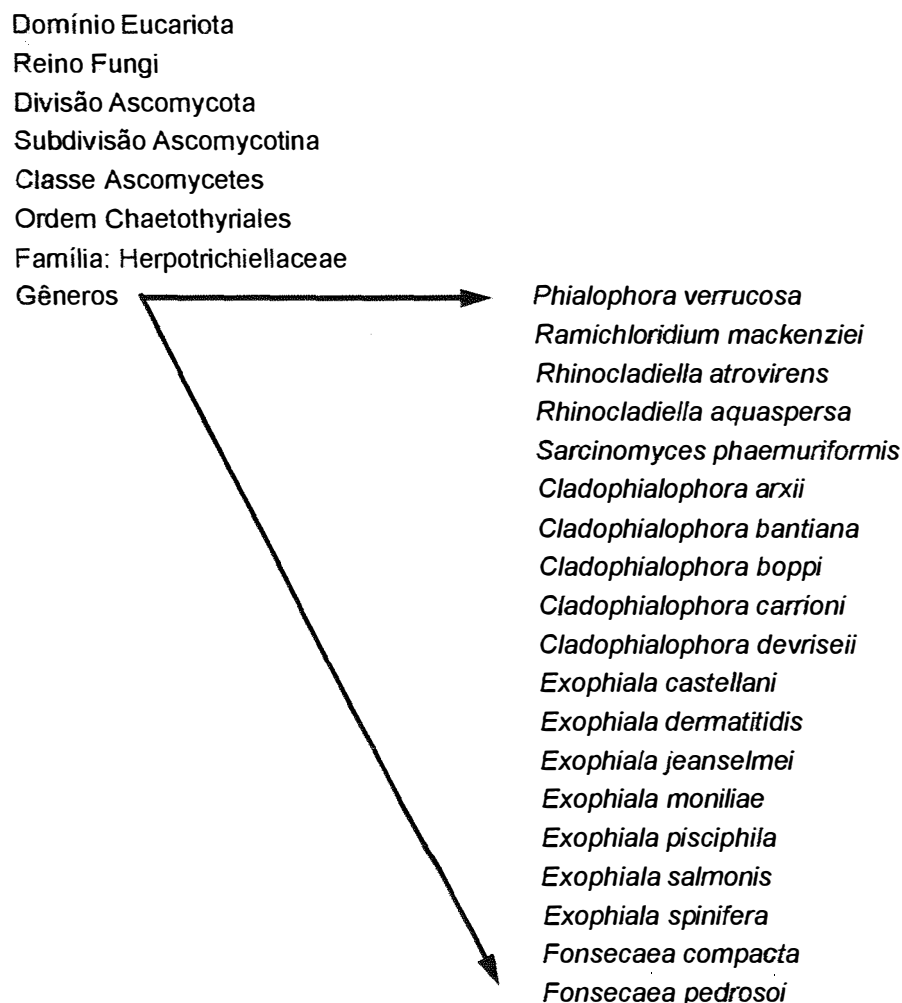


Figura 1. Família Herpotrichiellaceae: posição taxonômica dentro do reino fungi (adaptação: Hoog & Guarro, 1995).

Os fungos dematiáceos que durante parte do seu ciclo de vida apresentam desenvolvimento leveduriforme, são denominados de leveduras negras. A primeira descrição deste grupo foi feita por Marpmann em 1886, designada *Saccharomyces*

niger Marpmann. Posteriormente, foram descritas leveduras negras de importância industrial nos gêneros *Moniella*, Stolk & Dakin e *Trichosporonoides*, Haskins & Spencer da divisão Basidiomycota. Esses fungos são caracterizados pela fermentação da glicose e outros açúcares, ausência de crescimento na presença de trealose, presença do sistema de coenzima Q-9 ubiquinona, ocorrendo principalmente em substratos ácidos e gordurosos (Hoog, 1979).

As leveduras negras, Ascomycetes, compreendem dois principais grupos, anamórficos da ordem Dothideales (família Dothideaceae) e Chaetothyriales (família Herpotrichiellaceae), os quais são relacionados distantes um do outro a partir de conexões teleomórficas, morfologia de colônia e dados de filogenia baseado em seqüências do gene 18s do RNA ribossômico (Uijthof & Hoog, 1995).

Durante o ciclo de vida do fungo, denomina-se anamórfica a fase assexuada, característica dos deuteromicetos, teleomórfica a fase sexuada e o termo sinanamórfico é aplicado a qualquer um ou mais tipos de anamórficos que possam ter o mesmo teleomórfico. Enquanto que a denominação holomórfico é empregada quando se conhece as fases sexuada e assexuada do fungo (McGinnis & Shell, 1980; Hoog & Guarro, 1995).

Os anamórficos da família Dothideaceae apresentam cultura de crescimento rápido, hifas largas e multinucleadas e maturação intermediária “do talo” (Takeo & Hoog, 1991). As leveduras negras destas famílias são classificadas em *Hormonema* Lagerberg & Melin, *Aureobasidium* Viola & Boyer e gêneros similares (Yurlova & Hoog, 1997). *Hortea werneckii* (Horta), patógeno de humano, parece estar correlacionado com a ordem Dothideales (Nishimura & Miyaji, 1983). A maioria das espécies de Dothideaceae são epifitas ou patógenos de plantas (Uijthof, 1996).

O segundo grupo de leveduras negras de ascomicetos pertencem a ordem *Chaetothyriales* da família Herpotrichiellaceae (Figura 1), onde observa-se crescimento lento, inicialmente leveduriforme, porém com o tempo, a textura da colônia torna-se aveludada com hifas mononucleadas e maturação de talo determinada. Este desenvolvimento é freqüente em espécies de *Exophiala* e quando observado, nomes adicionais podem ser utilizados. Por exemplo, sinanamórficos de *Exophiala* podem ser acomodados no gênero *Phaeococcomyces*, lembrando que a fase leveduriforme, pode representar a fase transitória do ciclo de vida do fungo, como culturas de *P. exophialae* onde a fase micelial é designada de *Exophiala dermatitidis* (Dixon & Polak-Wyss, 1991).

2.1.2. Importância Clínica

Entre as infecções micóticas causadas por estes fungos, inclui-se Micetomas Eumicóticos, Feohifomicoses e Cromoblastomicose (Tabela 1), as quais podem permanecer nos locais de inoculação traumática, interiorizar-se ou disseminar-se (Montero-Gei *et al.*, 1970; Al-Doory, 1983; McGinnis, 1983; Rippon, 1988; Hoog, 1997).

Tabela 1. Infecções causadas por fungos Dematiáceos.

Micoses	Principais Agentes Dematiáceos
Micetoma	<i>Curvularia geniculata</i>
	<i>Curvularia lunata</i>
	<i>Exophiala jenselmei</i>
	<i>Pseudallescheria boydii</i>
	<i>Neotestudina rosatii</i>
Cromoblastomicose	<i>Cladosporium carrioni</i> (<i>Cladophialopora carrioni</i>)
	<i>Exophiala jeanselmei</i>
	<i>Fonsecaea compacta</i>
	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
	<i>Phialophora verrucosa</i>
Feohifomicose	<i>Rinocladiella aquaspersa</i>
	<i>Alternaria alternata</i>
	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	<i>Bipolaris</i> spp.
	<i>Chaetomium</i> sp.
	<i>Cladosporium</i> spp.
	<i>Curvularia</i> spp.
	<i>Dactylaria constricta</i> var. <i>gallopava</i>
	<i>Exophiala</i> spp.
	<i>Exserohilum</i> spp.
	<i>Hormonema dematioides</i>
	<i>Phialemonium</i> sp.
	<i>Lecythophora mutabilis</i>
	<i>Natrassia mangiferae</i>
	<i>Phaeoannellomyces werneckii</i>
	<i>Phialophora</i> spp.
	<i>Phoma</i> spp.
	<i>Sarcinomyces</i> sp.
	<i>Scedosporium inflatum</i>
	<i>Scytalidium dimidiatum</i>
<i>Wangiella dermatitidis</i> McGinnis (<i>Exophiala dermatitidis</i> (Kano) Hoog).	
<i>Cladophialophora arxii</i> Tintelnot <i>bantiana</i> (Sacc.) Hoog <i>et al.</i>	
<i>Cladophialophora boppi</i> (Borelli) Hoog <i>et al.</i>	
<i>Cladophialophora devriseii</i> Padhye & Ajello	

Adaptado de Dixon & Polak-Wiss, 1991.

A maioria dos fungos dematiáceos causadores de micoses humanas encontra-se agrupada na família Herpotrichiellaceae, ordem Chaetothyriales, mas

algumas espécies pertencem à ordem Dothideales. Em geral, a infecção por estes fungos ocorre devido à implantação traumática destes no hospedeiro (McGinnis, 1983; Montero-Gei, 1970; Rippon, 1988). Diversos desses agentes são considerados oportunistas (Hoog & Guarro, 1995), principalmente por habitarem nichos ecológicos não animais e ocorrerem em tecidos humanos por coincidência. Existem diversos relatos de infecções a partir de traumas (Hoog & Guarro, 1995) e também um aumento considerável no número de casos de micoses em pacientes portadores de doenças imunodebilitantes, tais como câncer e AIDS.

Os fungos dematiáceos podem ser encontrados em diversas formas nos tecidos do hospedeiro, variando de acordo com a micose.

A formação de nódulos contendo grãos nos tecidos é um indicativo de micetoma. Esta doença é caracterizada como uma infecção crônica, fibrosamente de longa evolução, predominantemente localizada nos pés (Lacaz, 1984). A doença pode ser causada por bactérias, especificamente actinomicetos e então denominada de actinomicetoma. Quando causada por fungos é conhecida por eumicetomas, relacionada com uma diversidade de agentes etiológicos, entre eles fungos dematiáceos (Tabela 1). A infecção ocorre a partir da inoculação traumática, seguida de edema, eritema e posterior fistulização, o processo inflamatório evolui para tecidos subcutâneo, como consequência há um aumento importante do volume do membro, com deformidade e limitação funcional. Nas evoluções prolongadas, ocorre comprometimento ósseo com osteosclerose e osteólise. A doença é classificada como subcutânea, localizada com disseminação rara (McGinnis, 1983).

A cromoblastomicose, caracteriza-se como uma infecção subcutânea, causada por diversos fungos dematiáceos, membros da família Herpotrichiellaceae (Tabela 1), os quais formam corpos septados nos tecidos, denominados de muriformes (McGinnis, 1983; Rippon, 1988). A doença apresenta uma evolução lenta de lesões nódulo verrucosas nos tecidos, atingindo freqüentemente membros inferiores, lesões nos membros superiores, nádegas e em outras regiões do corpo ocorrem com menos freqüência.

O termo feohifomicose abrange um amplo espectro de micoses oportunistas causadas por fungos dematiáceos (Tabela 1), que ocorrem desde forma superficial, cutânea, sub-cutânea até sistêmica. Estima-se que mais de 100 espécies

de fungos dematiáceos podem causar a doença, os quais podem apresentar-se nos tecidos lesados como células leveduriformes, pseudohifas, hifas verdadeiras ou qualquer combinação destas formas, sem a formação de corpos muriformes (McGinnis, 1992).

Sendo assim, a denominação feohifomicose surgiu devido ao aparecimento de inúmeros novos casos de patógenos dematiáceos associados a uma diversidade de casos clínicos. Em imunodeprimidos, a distinção entre cromoblastomicose e feohifomicose pode se tornar difícil devido a deficiência da resposta imune destes hospedeiros, a qual provavelmente não acarreta condições adequadas para a formação dos corpos muriformes (Hoog, 1997).

A feohifomicose subcutânea ocorre principalmente em indivíduos adultos, em países de clima tropical, subtropical e temperado, freqüentemente em pacientes entre 50 e 86 anos, porém existem alguns casos registrados em pacientes com menos de 16 anos de idade. Os pacientes de maior risco são aqueles que apresentam imunodeficiência. O agente mais freqüente é o *Exophiala jeanselmei* (Know-Chung & Bennett, 1992). Porém, recentemente, Padhye *et al.* (1999), relataram um caso clínico de uma paciente de 68 anos, identificado como feohifomicose subcutânea, causada por *Cladophialophora devrisei*.

A feohifomicose cerebral tem apresentado ampla distribuição geográfica, relatada desde a Europa, Ásia, África, América do Norte e Sul. Os principais agentes tem sido *C. bantiana*, *Exophiala dermatitidis* e *Ramichloridium mackenziei* (Walz *et al.*, 1997; Horrê & Hoog, 1999). Em animais, a doença tem ocorrido em gatos e papagaio (Know-Chung & Bennett, 1992).

Feohifomicose sistêmica tem sido descrita. Tintelnot *et al.* (1995), relataram o agente *C. arxii* Tintelnot como uma nova espécie causadora da feohifomicose sistêmica. Kravolic *et al.* (1998), descreveram um caso clínico de feohifomicose sistêmica em paciente transplantado, causado por *F. pedrosoi*, em agente clássico de cromoblastomicose.

Agentes etiológicos conhecidos como causadores de cromoblastomicose, tais como *F. pedrosoi* e *Phialophora verrucosa* (Tabela 1), têm sido descritos como agente causal de feohifomicose (McGinnis, 1983; Kravolic, *et al.*, 1998). Além disso,

fungos como *Exophiala jeanselmei*, tradicionalmente conhecidos como agente de eumicetoma podem causar feohifomicose (McGinnis, 1983) e cromoblastomicose (Naka *et al.*, 1986; Padhye *et al.*, 1999). Assim como agentes etiológicos de feohifomicose, como *Exophiala spinifera* (McGinnis, 1977), foi descrito causando cromoblastomicose (Barba-Gomes *et al.*, 1992).

De acordo com os objetivos do presente trabalho, maiores detalhes serão descritos a seguir sobre a cromoblastomicose.

2.1.2.1. Cromoblastomicose

A cromoblastomicose é causada por várias espécies de fungos dematiáceos, pertencentes à família Herpotrichiellaceae, os quais são encontrados principalmente no solo e materiais orgânicos em decomposição. Das espécies citadas na Tabela 1 as de: *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Cladophialophora carrioni*, *Phialophora verrucosa* e *Rinocladiella aquaspersa* são as classicamente envolvidas na etiologia da doença (Chandler *et al.*, 1980; McGinnis, 1983; Rippon, 1988; Hoog *et al.*, 1998).

A doença é o resultado da implantação traumática destes agentes e caracteriza-se pela formação de lesões unilaterais de evolução crônica. Inicialmente, observa-se no local da implantação a presença de lesão papular de superfície lisa e eritematosa que gradualmente evolui em tamanho, apresentando superfície descamativa. A lesão inicial pode ser única ou múltipla, transformando-se em nódulos superficiais, que podem expandir-se lateralmente formando placas. Nódulos e placas podem juntar-se originando lesões tumorais papilomatosas de aspecto semelhante à couve-flor denominada de verrucosa (Figura 2a). Com a evolução crônica da doença podem surgir áreas cicatriciais as quais se intercalam com lesões verrucosas, podendo ocorrer linfodema e elefantíase do membro (Figura 2b). Provavelmente o desenvolvimento da lesão depende de uma interação entre agente e paciente e não está relacionada isoladamente com um agente em questão (Al-Doory, 1983).

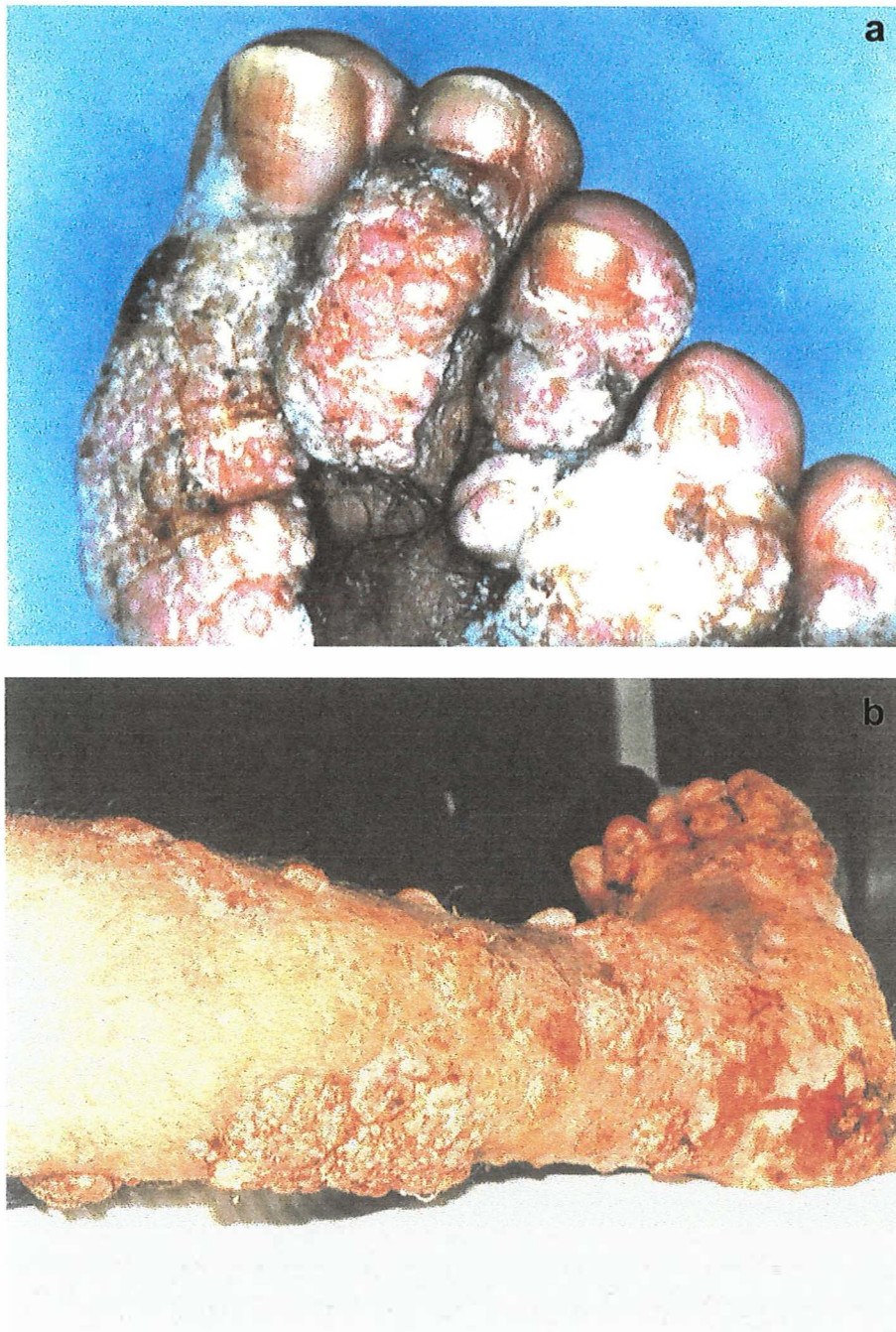


Figura 2. Lesões tumorais, aparência de couve-flor: (a) verruciforme; (b) lesões com linfoedema e elefantíase do membro. Fonte: Queiroz-Telles, 1996.

Antígenos de *Fonsecaea pedrosoi* foram caracterizados por imunoprecipitação. Imunoglobulinas circulantes (IgG) de soro de coelho, demonstraram

inibir em torno de 50 a 60% o crescimento do fungo. Alguns desses antígenos caracterizados existentes na parede celular de *F. pedrosoi*, podem estar relacionados com a estimulação da produção antigênica da doença (Ibrahim-Gianet *et al.*, 1988). Tsuneto *et al.* (1989), determinaram a distribuição de antígeno HLA em pacientes brasileiros portadores de cromoblastomicose, verificando diferenças significativas em relação a um antígeno em específico, o HLA-AZ9, o qual parece estar correlacionado com a susceptibilidade à doença.

A cromoblastomicose ocorre em todos os continentes nas regiões tropicais e subtropicais, situadas entre 30° N e 30° S (Montero-Gei, 1970). Estima-se que apenas 20 % dos casos ocorram em regiões de clima temperado (Carrion & Silva, 1947; Al-Doory, 1983). Existem casos relatados na América do Norte, Central e Sul, Jamaica, Europa, África, Madagascar, Indonésia, Austrália, Índia, Finlândia, Rússia. Esterre *et al.* (1996), relataram casos diagnosticados em Madagascar entre 1955 a 1994, demonstrando a alta incidência de casos 1/9.200 habitantes, provavelmente uma das maiores incidências mundiais, seguido do Brasil onde se concentram a maioria dos casos relatados. Uma alta incidência em relação a população total do país tem sido relatada na Costa Rica (Bayles, 1989).

A ocorrência de cromoblastomicose tem sido descrita em todas as raças, porém o aparecimento da doença inclui ocupação, sexo e idade. A transmissão de humano para humano e de animal para humano ainda não foi constatada (Al-Doory, 1983; Bayles, 1989). A infecção ocorre provavelmente a partir da implantação do agente por trauma cutâneo, sendo a maior prevalência entre trabalhadores rurais homens (Bopp & Bernard, 1981; Al-Doory, 1983; Bayles, 1989;).

Em geral, a prevalência da doença é maior em indivíduos do sexo masculino do que feminino para a maioria dos levantamentos realizados. (Carrion, 1950; Romero, 1953; Solanen, 1996; Montero-Gei, 1970; Cespedes, 1971; Bopp & Bernardi, 1981; Al-Doory, 1983; Londero & Ramos, 1989; Mello-Silva *et al.*, 1992; Queiroz-Telles, 1996; Silva *et al.*, 1999). Entretanto, no Sul da África a situação é reversa. Na Venezuela existe uma incidência em indivíduos do sexo masculino abaixo do esperado, enquanto no Japão ambos os sexos são equivamente afetados (Bayles, 1989).

De acordo com os autores, a percentagem de casos de cromoblastomicose em indivíduos do sexo feminino pode estar relacionada com a atividade profissional, porém, estes também sugerem que o hormônio estrogênio pode estar interferindo no desenvolvimento das células muriformes.

A maioria dos casos relatados de cromoblastomicose tem como agente *Fonsecaea pedrosoi* (Brygoo & Segretain, 1960; Oliveira *et al.*, 1977; Fukushiro, 1983; Restrepo, *et al.*, 1988; Londero & Ramos, 1989) ocorrendo em habitantes de regiões tropicais e subtropicais, porém esta espécie já foi isolada de fontes naturais nos países de clima temperado, Uruguai e Japão (Gezuele *et al.*, 1972; Iwatsu *et al.*, 1981).

Cladophialophora carrioni parece ocupar o 2º lugar em frequência, prevalecendo em regiões de clima árido ou semi-árido de Madagascar, Austrália, Venezuela e Equador (Coulanges & Locheron, 1981; Yegres, 1985; Esterre, 1996). O agente *Phialophora verrucosa* é isolado de pacientes ou de fontes ambientais localizados em regiões de temperaturas médias anuais baixas.

Fonsecaea compacta é um agente incomum de cromoblastomicose. Casos esporádicos da doença têm sido descritos na Rússia (Timokhovshii, 1983), Porto Rico (Carrion, 1936), Cuba (Font *et al.*, 1983), Colômbia (Duque, 1961) e Venezuela (Campins & Schary, 1952). No Brasil existem casos descritos em Minas Gerais por Oliveira *et al.* (1977) e no Paraná por Queiroz-Telles *et al.* (1992).

Rhinocladiella aquaspersa é o agente menos freqüente isolado, o primeiro caso foi descrito por Borelli (1972) num paciente mexicano e em Minas Gerais uma amostra foi isolada por Oliveira *et al.* em 1977. *Exophiala jeanselmei*, relacionado com micetoma eumicótico e feohifomicose (McGinnis, 1983), tem sido descrito como agente de cromoblastomicose (Naka *et al.*, 1986). Recentemente, *Exophiala spinifera* foi descrito como agente causal de cromoblastomicose (Barba-Gomez *et al.*, 1992; Padhye *et al.*, 1999).

Estima-se que a incidência de cromoblastomicose no Brasil seja de 1 caso para 196.000 habitantes (Al-Doory, 1983). Esses dados por serem baseados na literatura mundial indexada, dificilmente refletem a realidade. No Brasil existem trabalhos isolados. Também é importante ressaltar a dificuldade de diagnóstico da doença, principalmente nas baixas classes sociais.

Com o objetivo de verificar o comportamento clínico-epidemiológico da doença no Estado do Maranhão, Mello-Silva *et al.* (1992), realizaram um estudo de treze casos identificados no período de novembro de 1988 a julho de 1991, onde observaram uma maior prevalência na faixa etária entre 50 e 60 anos (46,5 %) e do sexo masculino (84,6 %). Quanto a profissão estes autores observaram que 92,3 % eram lavradores, e o agente etiológico isolado era *F. pedrosoi* em 100 % dos casos.

Em 1999, Silva *et al.* estudaram 325 casos em um levantamento realizado para os últimos 55 anos em 41 municípios, localizados na Bacia do Rio Amazonas, na Região Oeste do Pará e ilha de Marajó. Neste estudo, foi confirmada a prevalência da doença no sexo masculino em 93,2% contra 7,7% no sexo feminino. Em 66,5% dos casos os trabalhadores apresentaram uma faixa etária de 41 a 60 anos, porém foi ressaltado que o desenvolvimento das lesões não coincidia com o período de infecção. A identificação de *F. pedrosoi* como principal agente de cromoblastomicose na Região Amazônica está de acordo com dados epidemiológicos relatados para outras regiões tropicais (Banks *et al.*, 1985; Esterre *et al.*, 1986).

Na região sul a maioria dos casos é proveniente de locais situados no interior do Rio Grande do Sul, sendo o agente mais freqüente é o *Fonsecaea pedrosoi* (Londero & Ramos, 1989), freqüentemente isolado de regiões localizadas acima de 30° S. Em um estudo realizado a partir de casos clínicos diagnosticados em Curitiba - Paraná, por Queiroz-Telles (1996), foram identificados 71 casos de cromoblastomicoses, cujas lesões iniciaram-se nos estados: Paraná em 56 casos (78,8 %); Rondônia em 6 (8,4 %); Santa Catarina em 6 (8,4 %); Mato Grosso do Sul em 2 (2,8 %) e Alagoas em 1 (1,4 %). Em 32 (45 %) dos casos, o início da doença foi relacionado a traumatismo. Os vegetais e seus subprodutos foram relacionados ao início da infecção em 56,2 % dos casos, seguidos por ferimentos causados pelo manuseio de instrumentos agrícolas ou através do contato com animais.

De acordo com Silva *et al.* (1995), parece evidente a relação entre o tipo da atividade profissional e a infecção, onde a partir de uma investigação epidemiológica do tipo de exposição, os autores verificaram que a palmeira babaçu (*Orbignya phalerata martins*) é o provável fator de risco de infecção humana no Estado do Maranhão. Outros modos de transmissão tem sido incluído como partículas de metais, para pacientes traumatizados em acidentes automobilísticos (Bayles, 1989).

O desenvolvimento da doença ocorre no local da infecção quase na totalidade dos casos relatados (Al-Doory, 1983; Bayles, 1989; McGinnis, 1992; Queiroz-Telles, 1996). Porém, formas disseminadas da doença tem sido descritas como raras (Bittencourt *et al.* 1994).

2.1.2.2. Agentes etiológicos da cromoblastomicose

Os agentes causadores da cromoblastomicose são caracterizados pelo seu aspecto em vida parasitária, formando corpos acastanhados redondos com paredes grossas aparecendo de forma isolada ou agrupada. Estes corpos, apresentam divisão binária e são denominados de corpos muriformes, escleróticos ou corpúsculos fumagóides (Figura 3).

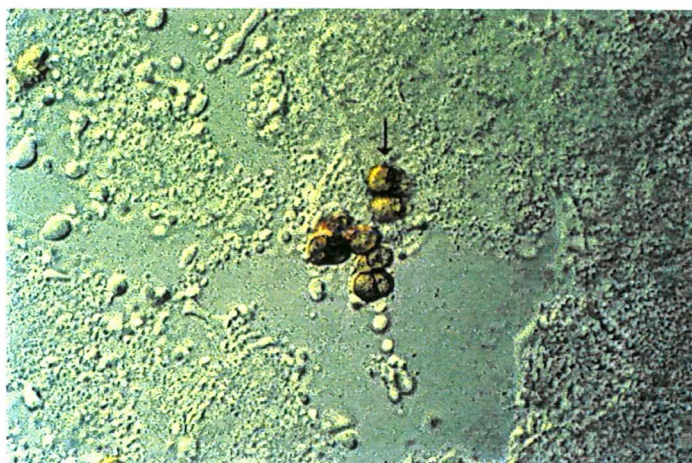


Figura 3. Corpos muriformes, células septadas encontradas no tecido do hospedeiro infectado. Fonte: "Medical Mycology Research Center"¹.

O gênero *Fonsecaea* foi estabelecido em 1930 por Negróni a partir do agente de cromoblastomicose *Hormodendrum pedrosoi* Brumpt, 1922. A primeira discussão da espécie foi baseada em características morfológicas. Negróni propôs o novo gênero *Fonsecaea* a partir da correlação destes agentes com os quadros clínicos de cromoblastomicose e a formação de corpos muriformes nos tecidos, associado às características morfológicas (McGinnis & Schell, 1980).

¹ Medical Mycology Research Center: www.utmb.edu/mycology/Fonsecaea.html

O gênero compreende duas espécies *F. pedrosoi* e *F. compacta*, ambas correlacionadas com cromoblastomicose. A presença de conidióforo ramificado do tipo *Cladosporium*, denticulos e variação da forma predominante de morfologia, são características do gênero.

O agente *Fonsecaea pedrosoi* apresenta colônia aveludada plana ou elevada de crescimento lento, coloração preta, olivácea ou cinza escura de reverso escuro. Microscopicamente apresenta três tipos de conidiogênese: *Cladosporium*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* (Chandler *et al.*, 1980; Al-Doory, 1983; Hoog & Guarro, 1995). A esporulação do tipo *Cladosporium*, a qual é predominante nesta espécie, é ramificada, com cadeias de esporos originando-se a partir de uma célula que possui três disjuntores (Figura 4). Sendo assim, esta conidiogênese é denominada de acrógena (desenvolvimento apical) e catenulada (em cadeia).



Figura 4. Esporulação do tipo *Cladosporium* predominante em *F. pedrosoi*. Fonte: "Medical Mycology Research Center".

Na conidiogênese do tipo *Rhinocladiella* os conídios se desenvolvem no ápice e ao longo do conidióforo e é, portanto, denominada de acropleurógena. Os esporos são ovais deixando uma cicatriz no ponto de inserção (Figuras 5a e 5b). A conidiogênese do tipo *Phialophora* é semi-endógena onde o conidióforo é denominado de fiálide, em forma de vaso, constrito na parte superior, formando um colarete. Os esporos são ovais sem cicatrizes, dispostos ao redor de fiálide (Figura 5c).

A espécie *Fonsecaea compacta* é microscopicamente similar à *F. pedrosoi* mostrando três tipos de conidióforos, porém o conidióforo ramificado apresenta cabeça

compacta e mais escura com conídios subesferios à ovóides (Figura 5d).

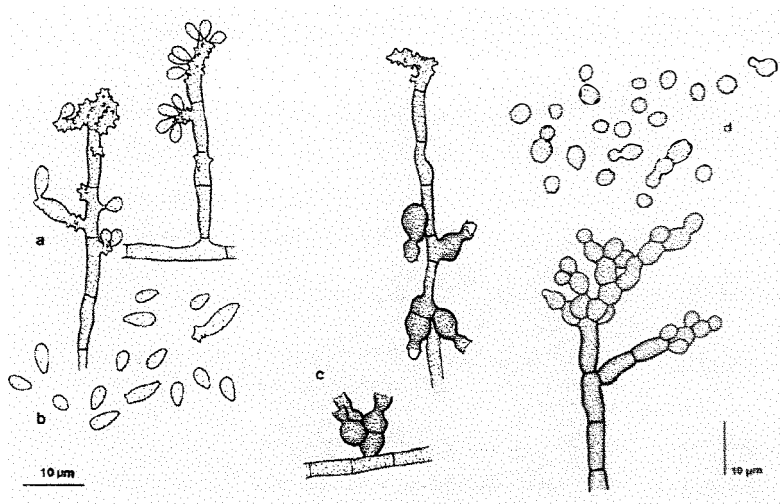


Figura 5. Diferentes tipos de esporulação do Gênero *Fonsecaea*: a - conidióforos simpodiais; b - conídios; c - sinanamórfico – *Phialophora*; d - conidióforo ramificado e conídios de *F. compacta*. (adaptação: Hoog & Guarro, 1995).

O gênero *Phialophora* foi introduzido em 1915 por Medlar com a descrição da espécie de *P. verrucosa* isolada de uma lesão de pele humana (Hoog *et al.* 1999b). O gênero foi caracterizado pela presença hifas pigmentas septadas e de fiálides. De acordo com estudos de genética molecular conexões teleomórficas com espécies do gênero *Capronia* vem sendo relatada para algumas espécies do gênero (Untereiner & Naveau, 1999).

O agente *Phialophora verrucosa*, apresenta colônias de crescimento moderadamente rápido, lisas, lanosas, pretas oliváceas com reverso negro. Microscopicamente a conidiogênese predominante é do tipo *Phialophora* com colaretas (Figura 5c), com conídios elipsoidais medindo, 2,5 x 1,5 – 3µm de diâmetro. Na forma parasitária desenvolve corpos muriformes nos tecidos infectados.

Em 1980, Borelli descreveu o gênero *Cladophialophora* para um agente de cromblastomicose (*C. ajelloi* Borelli) a espécie foi caracterizada pela presença de fiálides além da conidiogênese acropeta, posteriormente este agente foi identificado como idêntico ao *Cladosporium carrioni*, sendo assim, as espécies com morfologia *Cladosporium* correlacionadas às infecções em humanos passaram a ser acomodadas

no gênero *Cladophialophora* da família Herpotrichiellaceae (Hoog *et al.* 1995a).

O agente *Cladophialophora carrioni* é caracterizado por apresentar colônia de crescimento moderado, de textura aveludada e cotonosa, variando a tonalidade entre cinza-oliváceo, oliváceo esverdeado à negra. A temperatura máxima de crescimento é em torno de 37°C. Microscopicamente é caracterizado por apresentar conidióforo ramificado com cadeias de conídios eretos (Figura 6a). Os conídios apresentam-se em forma de limão para fusiformes (Figura 6b). Fiálides com colaretes largos, (Figura 6c), podem ocorrer em meios pobres de nutrientes (Hoog & Guarro, 1995).

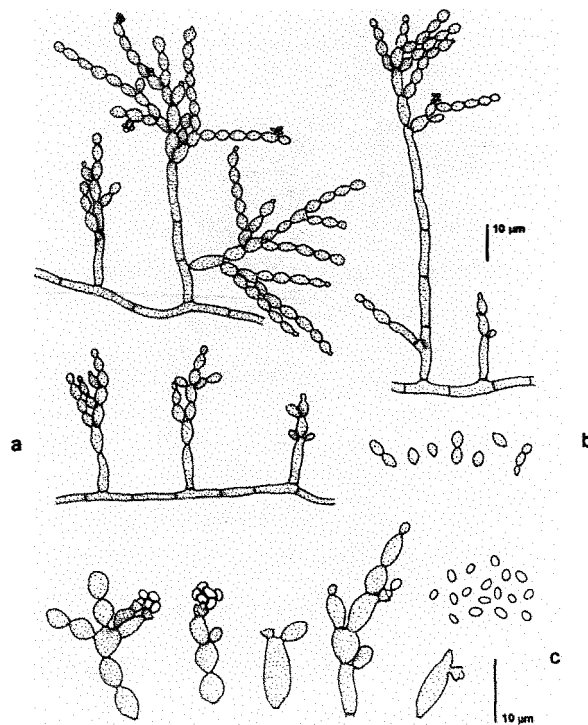


Figura 6. *Cladophialophora carrioni*: (a) conidióforo; (b) conídios em forma de limão à fusiformes com diâmetro médio de 4,5µm x 26µm; (c) fiálide com fialoconídios (adaptação: Hoog & Guarro, 1995).

De acordo McGinnis & Schell (1980), Nannfeldts em 1934, descreveu o gênero *Rhinocladiella*, acomodando a espécie *R. atrovirens* com esporulação simpodial predominante e a presença de denticulos. Posteriormente, foram descrito neste

gênero sinanamórficos com presença de fiálides. A espécie *R. aquaspersa* foi correlacionada como agente causal de cromoblastomicose, formando corpos muriformes nos tecidos infectados (Chandler *et al.*, 1980).

2.1.3. Isolamento de fungos dematiáceos de interesse clínico da natureza

O conhecimento da distribuição de fungos dematiáceos na natureza é incompleto. Existem poucos relatos do isolamento a partir de fontes ambientais, principalmente de isolamentos realizados em áreas endêmicas. Fungos dematiáceos patogênicos parecem estar limitados a áreas tropicais e sub-tropicais (McGinnis, 1992).

O conhecimento da ecologia e classificação de fungos dematiáceos é essencial para o entendimento do papel destes na micologia médica. A elucidação de fontes de fungos patógenos na natureza significa uma informação útil para o diagnóstico das infecções fúngicas, sendo que o conhecimento de uma determinada área geográfica endêmica pode facilitar no diagnóstico diferencial (Dixon *et al.*, 1980).

O agente *Phialophora verrucosa* tem sido isolado de fontes naturais tais como polpa de madeira (Wang, 1965), madeira de celeiro (Emmans, 1954), plantas em decomposição (Gezuele *et al.*, 1972), solo (Klite, 1965; Cristovão *et al.*, 1998) e madeira (Dixon *et al.*, 1980; Iwatsu *et al.*, 1981; Okeke & Gughani, 1986). *Phialophora* spp., foi isolada a partir de solo (Sampo *et al.*, 1997) e madeira (Dixon *et al.*, 1980).

Iwatsu *et al.* (1981), realizaram um estudo da ocorrência de fungos dematiáceos em áreas endêmicas de cromoblastomicose no Japão. Neste estudo, foram encontradas espécies sapróbias de *Fonsecaea pedrosoi* e *Phialophora verrucosa*. Os isolados foram comparados com linhagens patogênicas através da morfologia, sorologia e biologia (crescimento em diferentes meios e temperaturas). Testes de patogenicidade também foram realizados e não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens patogênicas e sapróbias testadas.

Gezuele *et al.* (1972), relataram uma freqüência constante de isolamento de *F. pedrosoi* de fontes naturais no Uruguai. Porém no Japão (Iwatsu *et al.*, 1981) o agente não foi recuperado com a mesma freqüência. Dixon & Shadomy (1980), realizaram um levantamento de fungos dematiáceos em madeiras, testando diferentes

métodos de isolamento e relataram que a técnica de inoculação em animal foi a melhor para a recuperação dos agentes *Cladosporium* sp., *Exophiala spinifera*, *P. verrucosa*, *Rhinoctadiella* sp. e *Exophiala dermatitidis* e acrescentaram que a variação dos organismos isolados dependem do método utilizado. Durante este estudo, foram utilizados meios seletivos, inóculo direto e a partir de diluição em água e óleo.

Iwatsu *et al.* (1981), verificaram o potencial efetivo do isolamento utilizando plaqueamento em meios seletivos a partir da diluição em água e óleo. Durante o isolamento foram recuperadas espécies de *Fonsecaea pedrosoi* e *Phialophora verrucosa*.

Em um isolamento realizado em armazéns da Virgínia, América do Norte, foram isoladas amostras de *F. pedrosoi*, *Cladosporium bantianum* e *Exophiala jeanselmei* e *E. dermatitidis*, onde os autores sugeriram a ocorrência ubiquitária destes agentes na região (Espinell-Ingroff *et al.*, 1982).

Isolados de *Cladosporium* e *Rhinoctadiella* tem sido recuperados de diferentes substratos. Sampo *et al.* (1997), obtiveram isolados de *Cladosporium cladosporoides*, *Rhinoctadiella spinifera* e *Ramichloridium anceps* em uma comunidade de solo de uma plantação de *Alnus viridis* em Piedmont, Itália.

Populações de *Exophiala* e *Cladosporium* foram verificadas em solo arenoso das praias de Manaus-AM-Brasil. Uma sazonalidade foi observada durante o período de inverno onde a taxa de recuperação destes agentes era maior (Cristóvão *et al.*, 1999).

A variação da diversidade de fungos isolados do solo foi estudada em uma área experimental do "Tai National Park" (sudoeste Story Cost, África) durante sete anos. A variação de precipitação e fatores intrínsecos da comunidade influenciaram no nível de diversidade. Entre as espécies encontradas foram isoladas *Cladosporium herbareum* e *Rhinoctadiella selenoides* de solo intacto, sendo que em solos classificados como alterados (cultivados) estes agentes não foram recuperados. Nos solos intactos, o período de maior precipitação foi o melhor para recuperação destes agentes (Persiani *et al.*, 1998).

Em um estudo realizado por Cotter *et al.* (1982) visando o levantamento da flora da casca de *Fagus grandifolia*, foi verificado que as espécies em maior frequência

eram *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichium*, *Modulosporium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhinocladiella* e *Trichoderma*. Demonstrando assim a ocorrência de *Cladosporium* e *Rhinocladiella* na superfície desta espécie vegetal, árvore típica do litoral dos Estados Unidos da América.

Hoog & Haase (1993), avaliaram um meio seletivo para o isolamento de *Exophiala dermatitidis*, contendo como principal fonte de carbono o meso-eritritol. Este meio demonstrou-se eficaz para o isolamento de leveduras negras a partir do pulmão de pacientes com fibrose cística, assim como para a recuperação destes agentes a partir de fontes ambientais.

2.1.3.1. Nichos naturais e fatores de virulência dos fungos dematiáceos

Poucos grupos de fungos podem causar uma diversidade de quadros clínicos divergentes como os dematiáceos. Especialmente as leveduras negras pertencentes a família Herpotrichiellaceae as quais causam micoses em humanos sem serem dependentemente parasitas animais (Hoog, 1993). Dentro deste grupo, observam-se micoses que se estabelecem após inoculação traumática independente do estado imunológico do paciente até micoses sistêmicas provenientes de inalação.

De acordo com Hoog (1993), o fato desses agentes causarem infecções oportunistas, indica que essas espécies provavelmente possuem fatores de crescimento nos seus nichos naturais, os quais devem favorecer a sobrevivência dentro de hospedeiros vertebrados, demonstrado através do caráter crônico dessas micoses após a implantação traumática. De acordo com Reiss & Nickerson (1974), a habilidade de sobrevivência em condições ambientais adversas parece servir como um fator de proteção contra a destruição intracelular por macrófagos. Farbiarz *et al.* (1990), demonstraram a capacidade de sobrevivência e proliferação de células de *F. pedrosoi* no interior de macrófagos residentes do peritônio de ratos.

Os constituintes do complexo de melanina de estruturas miceliais do fungo *F. pedrosoi* foram parcialmente caracterizados. O pigmento é acumulado principalmente em corpos citoplasmáticos conhecidos como melanossomos, e aparentemente, depositado posteriormente na superfície externa da parede celular. Através do estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi demonstrada a

existência do pigmento na periferia das células. A melanina compreende compostos aromáticos e alifáticos e estruturas glicosídicas. Os componentes alifáticos/glicosídicos constituem-se de ácidos graxos, proteínas com polissacarídeos (na proporção de 1/15 respectivamente); componentes lipídicos saturados (2:1), foram detectados (Alviano *et al.*, 1991). De acordo com os autores, a porção peptídica do complexo pode estar correlacionada com a quelação de cálcio, competindo com proteínas ligadas à metal no soro do hospedeiro. Além disto, a fração de carboidratos pode afetar o reconhecimento celular o que pode significar um importante papel na sobrevivência das formas infectadas deste fungo nos tecidos animais. Provavelmente, devem existir fatores correlacionados com micoses específicas. Em relação à fração lipídica, os autores sugerem que são estruturas similares aquelas que induziram reações granulomatosas em camundongos relatados por Silva & Ekizlerian, (1985).

O metabolismo “in vitro” tem sido relatado como um caminho importante para o entendimento da biologia da espécie e a revelação da interação destes agentes com o meio. Culturas submersas com diferentes pressões osmóticas, crescimento na presença de inibidores como ciclohexamida, são critérios freqüentemente avaliados (Untereiner *et al.*, 1999). De acordo com Sterflinger *et al.* (1999), a habilidade adaptativa dos membros da ordem Dothideales possibilitam a capacidade de sobrevivência destes agentes em condições hostis, o que também parece evidente na ordem *Chaetothyriales*.

A existência de crescimento meristemático é uma reação geral destes organismos aos diferentes tipos de “stress”. Este tipo de desenvolvimento é prevalente em leveduras negras freqüentemente encontradas em plantas de folhas coriáceas e em pedras (Titze & Hoog, 1990). Um estudo realizado por Sterflinger em 1998, demonstrou a extrema tolerância de fungos meristemáticos dematiáceos isolados de rochas, contra altas temperaturas, dissecação e estresse osmótico.

Os fungos dematiáceos são capazes de sobreviver sob condições extremas, tais como altas temperaturas e exposição à radiação ultra-violeta, devido as células melaninizadas (Wheeler & Bell, 1988), além de produzir caroteno quando incubadas na presença de luz (Geis & Szaniszlo, 1984). Sendo assim, a presença de pigmento nestes agentes pode neutralizar radicais livres e conseqüentemente favorecer uma capacidade de resistência à ação da fagocitose (Dixon & Polak-Wyss, 1991). Esses

agentes são capazes de alterar seus microambientes devido a produção de metabólitos extra-celulares (ácidos e básicos). Espinel-Ingroff *et al.* (1988), avaliaram a atividade proteolítica para a diferenciação de alguns dematiáceos patogênicos e sapróbios, a maioria absoluta dos fungos patogênicos testados não apresentaram atividade proteolítica.

A produção de corpos muriformes (forma parasitária) pode ser induzida em meios de pH ácido na presença de propranolol (Alviano *et al.*, 1992) ou Ca^{+2} (Mendoza *et al.*, 1993), possibilitando a diferenciação de espécies patogênicas, ou seja, com potencial para o desenvolvimento das formas parasitárias e ainda, demonstrando o papel do cálcio e da acidificação do meio, no dimorfismo destes agentes. Onde a acidificação do meio parece interromper o crescimento apical da hifa e favorecer pela presença do cálcio, a diferenciação celular devido ao aumento da taxa de divisão celular.

Alguns fungos dematiáceos apresentam habilidades para o crescimento em baixas tensões de oxigênio. Diversas espécies (*Exophiala salmonis*, *E. pisciphila*, *E. psychrophila*) foram encontradas em águas salgadas. Além disso, *E. dermatitidis* pode ocorrer em águas doce ou ligeiramente salobra, e em ar condicionado, biofiltros e encanamentos (Hoog & Haase, 1993). Esses fungos facilmente se disseminam em água devido a produção de polissacarídeos extracelular hidrofílicos. A ocorrência de *Exophiala dermatitidis* disseminada (Matsumoto *et al.*, 1984) pode ser facilitada pelo alto índice de ferro livre no sistema nervoso central, tais como o nível desses elementos em ar condicionado, eletrodos e biofiltros (Hoog, 1993).

De acordo com Kusenbach *et al.* (1992), provavelmente a ocorrência de *E. dermatitidis* em pulmão de pacientes com fibrose cística é determinada pela alta concentração de sais, uma vez que tais espécies também são encontradas em águas oceânicas.

2.2. Identificação, taxonomia e filogenia de fungos dematiáceos de importância clínica

Os fungos dematiáceos de importância médica são também cultivados em meio como Ágar Sabouraud, Ágar Batata e Dextrose e Extrato de Malte (Lacaz, 1984).

A maioria dos dematiáceos patogênicos desenvolvem-se na presença de ciclohexamida, enquanto que sapróbios podem ser inibidos, porém com numerosas exceções (Dixon & Polak-Wyss, 1991).

A morfologia microscópica deve ser criticamente avaliada, uma vez que a variação morfológica neste grupo é intensa, a presença de sinanamórficos, dificulta uma identificação apropriada. Presença de colaretes, anéis de crescimento, cicatrizes ou denticulos produzidos na célula conidiogênica são critérios adotados na diferenciação. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é utilizada na identificação de anéis de crescimento, cicatrizes na identificação de *Exophiala jeanselmei* e de *E. dermatitidis* (Dixon & Shadomy, 1980). Presença de fiálides de diferentes tipos de esporulação foram critérios utilizados na identificação de isolados sapróbios de *Phialophora verrucosa* e *F. pedrosoi* (Iwatsu *et al.*, 1981).

Wang *et al.* (1987), utilizaram Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para demonstrar a ultraestrutura e desenvolvimento de células conidiogênicas de *F. pedrosoi*. A presença de conídios primários maiores e secundários menores e a ocorrência de denticulos na célula conidiogênica foram verificados em *F. pedrosoi*, enquanto que, em *F. compacta* uma maior compactação da célula conidiogênica foi observada. McGinnis & Schell, (1980), demonstraram via observações micromorfológicas a relação entre o gênero *Fonsecaea*, *Cladosporium*, *Phialophora*, *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*, desde que o tamanho e coloração das estruturas reprodutivas e vegetativas, estruturas dos conidióforos e presença de conídios uni ou multicelulares, são características fundamentais na distinção de membros deste grupo.

Inicialmente a taxonomia destes grupos era baseada em caracteres morfológicos os quais são extremamente variáveis. Sendo assim, outros métodos vem sendo incorporados, tais como métodos fisiológicos (Steadham *et al.*, 1986; Hoog & Haase, 1993; Hoog *et al.*, 1995a; Hoog *et al.*, 1995b, Untereiner *et al.*, 1999) e moleculares os quais permitem a comparação de anamórficos com teleomórficos de *Capronia* (Haase *et al.*, 1995; Untereiner *et al.*, 1995, 1997; Untereiner & Naveau, 1999; Haase *et al.*, 1999). A taxonomia de leveduras negras de Dothideales também tem sido estudada através de métodos moleculares (Hoog *et al.*, 1999c; Sterflinger *et al.*, 1999).

2.2.1. Testes fisiológicos para identificação de fungos dematiáceos

Testes fisiológicos para a distinção de leveduras negras e fungos filamentosos relacionados foram introduzidos por Steadham *et al.* (1986) e Espinel-Ingroff *et al.* (1988), a partir do método clássico para a identificação de leveduras descrito por Van der Walt & Yarrow (1984). Essas investigações demonstraram que os dados de fisiologia e termotolerância são importantes para a diferenciação de pleoanamórficos de fungos dematiáceos de interesse médico.

Dentro das leveduras negras, critérios fisiológicos têm sido utilizados para discriminar família e espécie. Por exemplo, anamórficos da família Dothideaceae diferem de *Exophiala* membros da família Herpotrichiellaceae por halotolerância (Kane & Summerbell, 1987) e pela produção de Dnase extracelular (Hoog & Yurlova, 1994; Hoog *et al.*, 1995a). Da mesma forma anamórficos *Cladosporium* membros de Mycosphaerellaceae (Dothideales) diferem das espécies de *Cladophialophora* (Chaetothyriales), morfologicamente similares quanto a habilidade de liquificação de gelatina (Know-Chung *et al.*, 1985; Hoog *et al.*, 1995b). Os membros da família Herpotrichiellaceae foram distinguidos de espécies de *Aureobasidium* e *Hormonema* (família Dothideaceae) devido a tolerância à ciclohexamida (Hoog *et al.*, 1995a). Variação intraespecífica e diferenciação entre as espécies de *Cladophialophora* e *Exophiala* foram determinadas por Hoog *et al.* (1995a).

Untereiner *et al.* (1999), avaliaram características fisiológicas de membros do gênero *Capronia*, que permitiu estabelecer um padrão de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, assim como para vários testes de tolerância "in vitro". O perfil fisiológico destas espécies foi comparado com membros do gênero *Exophiala* e, pelos critérios nutricionais e bioquímicos, foi possível discriminar anamórficos e teleomórficos Herpotrichiellaceae, dos gêneros *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Nadsoniella*, *Phaeococcomyces* e *Sarcinomyces*, porém, nenhuma espécie de *Capronia* fisiologicamente idêntica aos membros dos gêneros anamórficos estudados foi encontrada. A associação de parâmetros morfológicos aos fisiológicos podem ser empregados para a descrição de novas espécies, como a realizada para *Phialophora* (Hoog *et al.*, 1999b).

Os testes fisiológicos têm sido utilizados no estabelecimento de um perfil

para espécies previamente estabelecidas através da morfologia. No entanto, em alguns casos, a resolução é baixa devido ao grande número de resultados variáveis. A aplicação de métodos moleculares poderá auxiliar na definição de alguns grupos taxonômicos. De acordo com Hoog (1997), os métodos moleculares são ferramentas úteis no esclarecimento da posição das leveduras negras dentro do reino Fungi com maior precisão.

Os testes fisiológicos têm sido utilizados como um importante marcador, auxiliando na definição dos grupos delimitados pelos métodos moleculares (Uijthof *et al.*, 1998; Sterflinger *et al.*, 1999; Untereiner *et al.*, 1999). Por estes estudos foi estabelecida a importância destes testes para a taxonomia, demonstrando a eficiência do método, principalmente para a diferenciação interespecífica e similaridade intraespecífica.

Barnett *et al.* (1990), verificaram a alta variabilidade interespecífica entre *Chadophialophora bantiana* (Sacc.) e *Dothiora europaea* Froidevaux, as quais diferiram em 16 dos 50 caracteres analisados. Hoog & Haase (1993) listaram 57 caracteres fisiológicos para *E. dermatitidis* (Kano), e encontraram 4 caracteres variáveis, entre eles, a assimilação de nitrato.

De acordo com Untereiner *et al.* (1999), os testes fisiológicos suprem caracteres úteis para a taxonomia de fungos que morfologicamente não são distinguíveis.

2.2.2. Métodos moleculares

Métodos moleculares são utilizados em grande escala para o estudo da biodiversidade de fungos. No caso de fungos de importância médica, os métodos são aplicados em duas grandes áreas. A primeira envolvendo obtenção de dados mais precisos para taxonomia, uma vez que métodos clássicos apresentam uma limitada resolução. Principalmente, nos fungos leveduriformes que apresentam pouca variação morfológica e também para aqueles que são variáveis e com espécies até então pouco descritas e que agora, estão sendo reconhecidas, como uma gama de pequenas entidades. A segunda aplicabilidade é a filogenia, onde os métodos facilitam a construção de árvores filogenéticas as quais podem servir como um modelo do

suposto curso da evolução (Hoog *et al.*, 1998).

A classificação de leveduras negras pelos métodos morfológicos tradicionais é extremamente complicado, devido ao fato desses fungos exibirem um ciclo de vida pleoanamórfico. Uma identificação segura e confiável é urgente, uma vez que algumas destas são potencialmente capazes de causar diversas infecções em humanos e animais. Dessa forma os métodos moleculares vem sendo utilizados como auxiliares e complementares no estabelecimento de populações, variedades e espécies em fungos dematiáceos.

Entre os marcadores moleculares o RAPD (amplificação de DNA polimórfico ao acaso) tem sido usado no estudo da variabilidade entre espécies (Molnar *et al.*, 1996) e em nível de população (Uijthof *et al.*, 1994). O RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") do "amplicon" ITS do gene DNAr, e DNAm_t vem sendo empregado na delimitação de espécie e/ou distinção de populações dentro de uma mesma espécie. Porém, o seqüenciamento parcial de genes ribossomais parece ser o método de escolha no estudo de filogenia mostrando diferentes taxas de evolução de acordo com o domínio. Sendo assim, o número de substituição de bases dentro de uma única espécie deve ser determinado para cada domínio (Hoog, 1997). De acordo com Seifert *et al.* (1995), é importante determinar o nível de diversidade taxonômica revelado em cada método.

2.2.2.1. PCR ("Polimerase Chain Reaction")

A técnica de PCR consiste de uma reação de polimerização em cadeia para a amplificação de seqüências de DNA por uma reação enzimática "primer" dirigida (Erich, 1989). Sendo assim, através da PCR, pode-se obter "in vitro" um aumento da quantidade de uma determinada seqüência de DNA, representando assim um grande recurso para o estudo das seqüências de DNA "in vitro" e, conseqüentemente, uma série de aplicações nas mais diferentes áreas da ciência. Em microrganismos a PCR vem sendo aplicada na determinação de grupos taxonômicos, diagnoses de doenças infecto contagiosas e em estudos genéticos. Nesta revisão serão considerados principalmente as aplicações da técnica relacionada ao presente trabalho.

Diversos estudos tem proposto o uso da PCR para quantificar RNAm

(Becker-André & Halbrock, 1989; Wang *et al.*, 1989; Guilliand *et al.*, 1990). Os níveis de RNAm podem prever uma estimativa da expressão do gene. O método implica em converter o RNAm em DNAc através da transcriptase reversa onde os produtos obtidos na reação são comparados em gel eletroforese. Através deste método, diferenças significativas foram obtidas na quantificação de fragmentos de RNAm amplificados de linhagens selvagens e mutantes.

A síntese de proteínas depende da participação do RNA ribossômico (rRNA) no processo de tradução da informação genética. A codificação do rRNA é feita em regiões específicas do genoma pelo chamado DNA ribossômico (rDNA). O rDNA encontra-se em regiões cromossômicas, muitas vezes visíveis com auxílio de microscópios, as chamadas “regiões organizadoras de nucléolo” (NOR). O número de NOR é aparentemente característico para cada espécie.

O DNA ribossomal contido nas regiões organizadoras do nucléolo tem sido objeto de um grande número de estudos, com diversas aplicações em genética, evolução e melhoramento. Tal interesse está relacionado à estrutura destas regiões. O rDNA é caracteristicamente repetitivo, uma propriedade que permite uma série de aplicações. O fato de ser repetitivo, implica que uma certa estrutura ou seqüência de nucleotídeos (“core sequence”) se repita lado a lado (em “tandem”) inúmeras vezes.

Sendo assim, por ser repetitivo e por estar situado em regiões específicas do genoma, a proporção de rDNA é, em geral, alta em relação ao conteúdo total de DNA da espécie. O DNA total da espécie inclui DNA nuclear, cloroplástico, mitocondrial e ribossômico. O rDNA é encontrado no núcleo e também no citoplasma celular.

A função do rDNA, ao contrário de outras seqüências repetitivas que aparentemente não tem função conhecida no genoma, é a codificação do rRNA, implicado no processo de tradução de proteínas. Em geral, as regiões 28S, 18S e 5,8S das unidades de repetição não apresentam variação de seqüência, enquanto que as regiões internas que são transcritas (ITS) variam grandemente. Esta característica tem sido utilizada para obter polimorfismo de comprimento de fragmento nos locos de rDNA (RFLP) através do uso de enzimas de restrição. O número de cópias de uma determinada seqüência de rDNA, também tem sido utilizado em tais estudos, bem

como variações na seqüência de nucleotídeos das unidades de repetição. Os dados gerados através desta técnica têm sido utilizados para estudos de filogenia e evolução, bem como para caracterização de germoplasma e análise de diversidade genética (Ferreira, 1994).

Haynes *et al.* (1995), propuseram a identificação e detecção de diversos fungos patogênicos de humanos utilizando PCR específica a partir de “primers” de seqüência de DNAr. Os produtos de seqüenciamento para cada fungo analisado eram bandas de tamanhos diferentes, possibilitando a padronização para cada espécie em questão. Em 1996, Prariyachatigul e colaboradores utilizaram dois “primers” específicos para a região do gene ribossomal 18s de *Cryptococcus neoformans*, obtendo um produto de amplificação de 343pb onde sua especificidade foi verificada por análise Southern e o sistema desenvolvido foi proposto para diagnóstico de meningite criptocócica devido a sua sensibilidade e especificidade.

O uso de seqüências específicas de RNAr para a identificação das relações filogenéticas, tem representado um grande avanço no estudo de fungos dematiáceos de importância clínica. Anamórficos de *Exophiala* (leveduras negras) foram acomodados como Ascomicetos do gênero *Capronia* a partir de seqüências 18s e ITS de DNAr (Hoog *et al.*, 1998). Untereiner *et al.* (1995), desenvolveram um estudo baseado na seqüência SSU (subunidade menor) região 18s do DNAr, demonstrando a correlação existente entre espécies de *Exophiala* e leveduras negras anamórficas.

A levedura negra *Exophiala dermatitidis* (Kano) Hoog é um patógeno humano em potencial (Horré & Hoog, 1999). Na Europa o fungo tem sido caracterizado como um colonizador subclínico de pacientes com fibrose cística (Haase *et al.*, 1995). Em contraste, casos neurológicos fatais têm sido relatados no Japão em pacientes aparentemente saudáveis e imunologicamente normais (Hiruma *et al.*, 1993). Biologicamente, esta espécie apresenta um alto grau de poliformismo desde formas leveduriformes, pseudomicélio, micélio, corpos multicelulares, além da variação na forma dos conídios (Hoog *et al.*, 1994) com nenhum teleomórfico descrito. Entretanto, diversas espécies de Ascomicetos do gênero *Capronia* da família Herpotrichiellaceae apresentam anamórficos do tipo *Exophiala* em cultura (Untereiner *et al.*, 1995; 1997). Estudos taxonômicos realizados a partir de seqüência da região 18s do gene DNAr possibilitaram a reunião de *E. dermatitidis* e espécies do gênero *Capronia* (Haase,

et.al. 1999).

Uijthof *et al.* (1998), encontraram seqüências ITS1 idênticas entre uma linhagem tipo de *E. dermatitidis*, a qual apresentava um sinanamórfico de crescimento meristemático e a espécie meristemática de *Sarcinomyces phaeomuriformis*. Untereiner & Naveau (1999) avaliaram a posição sistemática de *Exophiala dermatitidis* dentro da família Herpotrichiellacea e verificaram que estes se agruparam consistentemente com *C. mansonii*, *C. Munki* e *Exophiala* sp., a partir de dados de seqüência de ITS e 28s respectivamente.

Exophiala spinifera é morfologicamente diferenciada dentro do gênero *Exophiala*, apresentando conidióforos multicelulares é uma das espécies de maior virulência dentro do grupo (Wang *et al.*, 1987). Haase *et al.* (1999), demonstraram que *E. spinifera* e *E. jeanselmei* constituem um grupo filogeneticamente delimitado dentro da família Herpotrichiellacea e distinto de outras espécies de *Exophiala*. Hoog *et al.* (1997), verificaram tal correlação analisando seqüências ITS e caracteres fisiológicos. Neste estudo, foi verificado a relação entre o sinanamórfico *Phaeococcomyces exophiale* com *Exophiala spinifera*, reunidos no mesmo grupo baseados nas distâncias do domínio completo da regiões interespaçadoras (ITS) e a região 5.8s do gene DNAr.

Rogers *et al.* (1999), também verificaram a correlação próxima de *E. jeanselmei* e *P. exophiale* através do mapa de restrição da região ITS seqüenciada. Ainda conexões teleomórficas através dos grupamentos formados entre *E. jeanselmei* e *C. acutiseta* e *C. spinifera* com *Wangiella heteromorpha* foi confirmada. De acordo com o observado, muitas espécies de *Exophiala* demonstraram ser monofilética, com exceção de *E. jeanselmei*. Os resultados também indicaram uma relação clara entre Hiphomycetes e Ascomycetes. Porém não foi definido se cada espécie de *Exophiala* possui um estágio teleomórfico correspondente. Outros trabalhos vêm demonstrando a relação estreita entre espécies de *Exophiala* e *Capronia* (ascomicetos) (Hoog *et al.*, 1999a; Ohkusu *et al.*, 1999).

A classificação de leveduras negras com filiação Ascomycetes por métodos morfológicos é muito difícil devido a existência de um ciclo de vida pleoanamórfico (Hoog *et al.*, 1994). As relações filogenéticas estabelecidas por PCR-ribotipagem têm possibilitado estabelecer conexões entre teleomórficos, anamórficos e

sinanamórficos.

O gene 18S RNA ribossômico foi quase todo seqüenciado em um grande número de linhagens tipo do gênero *Exophiala* (n = 13), incluindo linhagens de *Capronia* e linhagens esperadas próximas de *Exophiala* e linhagens tipo dos gêneros *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Ramichloridium* e *Rhinochadiella* (Haase *et al.*, 1995). Todas as linhagens do gênero *Exophiala* foram reunidas num grupo monofilético representando a família Herpotrichiellaceae (ordem Chaetothyriales). Dentro deste grupo foi distinguido uma "Clade" reunindo *Capronia epimyces*, *C. mansonii* e *C. moravica* com *E. dermatitidis* e espécies aliadas (*Sarcinomyces phaeomuriformis*, *Prototropha pullulans*, *E. jeanselmei* var. *heteromorpha*). Tal fato sugere uma conexão previamente afirmada (Untereiner, 1997), entre anamórficos e teleomórficos destes dois gêneros. A árvore filogenética obtida pela análise de seqüência ITS1 do DNA ribossomal exibe aproximadamente a mesma topologia obtida pela análise do gene RNA ribossomal 18S (Hoog *et al.*, 1998).

Os patógenos dos gêneros *Exophiala* e *Cladophialophora* parecem ser membros anamórficos da família Herpotrichiellaceae dos Ascomicetos (Masclaux *et al.*, 1995; Untereiner, 1997). Uma análise filogenética de 55 linhagens, todas membros da família Herpotrichiellaceae (ordem Chaetothyriales), incluindo 11 teleomórficos do gênero *Capronia*, foi realizada a partir do seqüenciamento do gene DNA ribossomal 18s. Neste estudo, foram encontradas novas combinações para espécies de *Exophiala* e *Cladophialophora*. A partir dos dados obtidos os autores concluíram que a família Herpotrichiellaceae surgiu durante um período evolucionário relativamente curto, a qual se encontra num processo ativo de evolução, principalmente para os agentes patogênicos de humanos (Haase *et al.*, 1999).

O gênero *Cladophialophora* tem apresentado uma significativa tendência para a patogenicidade em humanos (Hoog & Guarro, 1995; Haase *et al.*, 1999). As espécies *C. arxii* Tintelnot, *C. devriseii* (Padhye & Ajello) Hoog *et al.* e *C. bantiana* (Scc.) Hoog *et al.*, têm sido relatadas como agentes de micoses sistêmicas em humanos.

A análise do seqüenciamento da região ITS, indicou baixo grau de variabilidade entre espécies neurotrópicas de *Cladophialophora bantiana*. Dados

complementares de RFLP ITS e SSU, demonstraram que todas as linhagens estudadas pertenciam a uma única espécie de *Cladophialophora bantiana*. Nesse mesmo estudo foi verificada a evidente relação da presença de “introns” na região 18S e a patogenicidade de espécies neurotrópicas (Gerrits van den Ende & Hoog, 1999).

Linhagens isoladas do ambiente com morfologia semelhante a *C. bantiana*, foram identificadas como *C. minourae* Iwatsu. De acordo com Hoog *et al.* (1995a), a espécie deveria ser mantida inicialmente como *Cladosporium* devido a origem ambiental. Haase *et al.*, em 1999, a partir de dados de seqüenciamento, identificou-a como anamórfico de Herpotrichiellaceae. No entanto, análises de seqüenciamento e RFLP não permitiram a delimitação de espécie, devido a ocorrência de dois diferentes “introns”. Porém, de acordo com o padrão de agrupamento encontrado a espécie corresponde ao gênero *Cladophialophora*.

A estrutura taxonômica de *Cladophialophora* parece ser diferente de alguns outros grupos de fungos Herpotrichiellaceos os quais não são neurotrópicos. A presença de introns em linhagens originárias de diversos continentes sugere uma rápida adaptação para hospedeiros humanos (Gerrits van den Ende & Hoog, 1999).

Membros de *Exophiala* e espécies de *Phialophora* mostram um alto grau de variabilidade de dados RFLP-DNA. *Exophiala* e *Phialophora* foram relacionados próximos através de seqüências ITS1, onde *Phialophora verrucosa* agrupou-se entre *Exophiala* sp. (Yan *et al.*, 1995; Hoog *et al.*, 1999b).

A análise da subunidade menor (SSU) do DNAs e domínios ITS por RFLP associado a marcadores morfológicos e fisiológicos foram critérios adotados por Hoog *et al.* (1999b), para distinção de linhagens de *P. verrucosa* morfológicamente similares. Neste estudo foram comparadas 34 linhagens e identificadas duas novas espécies *P. reptans* Hoog e *P. sessies* Hoog, com características de *Exophiala* em cultura, enquanto que *P. america* e *P. verrucosa* são geneticamente muito próximas, porém, foram determinadas como espécies distintas. A distância encontrada entre espécies bem delimitadas de *P. verrucosa*, sugerem filogeneticamente espécies divergentes (Haase *et al.*, 1999).

De acordo com Haase *et al.* (1999), a árvore filogenética da família Herpotrichiellaceae baseada em seqüências SSU, demonstrou uma resolução pobre

quando comparada com outros fungos leveduriformes. Isso sugere a evolução recente desta família. Espécies de *Fonsecaea*, morfológicamente delimitadas apresentaram seqüências idênticas de ITS1 (Atilli *et al.*, 1998). Espécies como *Exophiala castellani* Iwatsu *et al.* e *Phialophora americana* (Namf.) Hughes, com morfologia e fisiologia indistinguíveis variaram em relação a seqüências ITS (Hoog, 1997).

Observando a família Herpotrichiellaceae, as espécies de *Exophiala* estão distribuídas por toda a árvore, assim como os teleomórficos de *Capronia*, os quais provavelmente possuem um espectro de anamórficos atribuídos aos gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Ramichloridium*. O grande número de espécies heterotática de *Capronia* identificada por Untereiner *et al.* (1995 e 1999), não exclui a possibilidade de uma propagação clonal desses agentes.

A ecologia dos membros Herpotrichiellaceae, reflete o processo evolutivo recente identificado por ribotipagem PCR. Originalmente, muitas das espécies do gênero *Capronia* foram descritas a partir de plantas, tais como *Fricaeae* (Barr, 1983). De acordo com a literatura existe uma diversidade de relatos de anamórficos Herpotrichiellaceos isolados de vegetais, por ex. *Ramichloridium anceps* (Sacc.) Hoog, de madeira, *Phialophora verrucosa* e *Fonsecaea pedrosoi*, de madeira em decomposição (Dixon *et al.*, 1980; Iwatsu *et al.*, 1981) e *Cladophialophora carrioni* em cactus (Zeppenfeldt *et al.*, 1994), os quais provocam cromoblastomicose quando inoculadas traumáticamente. É importante ressaltar que a doença nunca foi relatada fora da família Herpotrichiellaceae. A formação de corpos muriformes pode representar um mecanismo de adaptação em tecidos humanos. Em contraste, com desenvolvimento meristemático da espécie *Sarcinomyces phaeomuriformis* encontrado também em grupos irmãos de Herpotrichiellaceae (Haase *et al.*, 1999; Sterflinger *et al.*, 1999). De acordo com os dados de ribotipagem e testes fisiológicos (Hoog *et al.*, 1999c) foi verificado que a maioria dos fungos de crescimento merismático são membros da família Dothideaceae e poucos representantes pertencentes a família Herpotrichiellaceae.

Alguns autores sugerem a extrema tolerância "in vivo" como um dos fatores responsáveis para a adaptação em hospedeiros animais. Tal fato parece bem exemplificado para algumas espécies de *Exophiala* as quais parecem colonizar superfície de frutos doces e provocar infecções sistêmicas após a ingestão por

hospedeiros apropriados (Hiruma *et al.*, 1993; Hoog *et al.*, 1999b). Ainda dentro da família, as espécies neutrópicas *Cladophialophora bantiana* (Sacc.), *Exophiala dermatitidis* e *Ramichloridium mackenziei* Campbell & Al-Hedoithy, demonstraram a partir de seqüências ITS, a formação de grupos separados das linhagens sapróbias.

De acordo com Hoog *et al.* (1998), a evolução da família Herpotrichiellaceae pode ter sido dirigida pelas preferências ecológicas, refletindo um padrão de adaptação destes agentes para humanos, onde provavelmente a patogenicidade seria um processo evolutivo de múltiplos passos, cuja a pressão evolutiva seria a adaptação para a condição especial de sobrevivência no corpo humano. Em *Cladophialophora bantiana* a inserção de “introns” na subunidade menor do gene DNA ribossômico sugere a emergência dessas espécies em humanos (Gerrits van den Ende & Hoog, 1999).

Hoog *et al.* (1997), estudaram a diversidade de duas famílias de Ascomycetos, Pheosporaceae e Herpotrichiellaceae, através de variabilidade molecular e verificou uma alta heterogeneidade da família Herpotrichiellaceae, o que indica o rápido e recente processo evolutivo indicado pela especiação dinâmica ligado a inserções associado a uma diversidade de quadros clínicos. Em contraste com a família *Pleosporaceae*, bem estabelecida do ponto de vista evolutivo, apresentando baixo grau de variabilidade.

Estudos moleculares das Ordens Onygenales e Chaetothyriales reforçam os conceitos acima relatados. De acordo com Hoog (1997), a ordem Chaetothyriales é menos conhecida do que, por exemplo, a ordem Onygenales, onde são verificados uma grande diversidade de patógenos humanos, tais como: Dermatófitos, *Coccidioides* e *Histoplasma*. Tais patógenos são encontrados em associação com animais e humanos demonstrando diferentes taxas de aproveitamento de produtos animais e tecidos vivos. Os dermatófitos, por exemplo, são guiados pela melanina como um simples fator de dependência, enquanto que os dimórficos Onygenales são geralmente considerados como tendo altas taxas de adaptação em humanos dentro do reino fungi. Este grupo, apresenta um número relativamente baixo de espécies correlacionadas com casos clínicos específicos, o qual pode indicar um longo período de adaptação e evolução.

Ao contrário, os recentes estudos vem demonstrando que existe um número significativo de patógenos melaninizados, membros da ordem Chaetothyriales, que exibem uma grande diversidade de quadros clínicos, variando desde traumas cutâneos, subcutâneos até infecção cerebral. Isto pode indicar uma baixa taxa de especialização e um processo ativo de especiação e sugere um grupo taxonômico em evolução. Os dados de seqüenciamento vem possibilitando a reconstrução da filogênia deste grupo (Hoog *et al.*, 1988).

Sterflinger & Hain (1999) utilizaram a hibridização "in situ" com sondas para RNA ribossômico, visando a detecção de levedura negras e fungos meristemáticos, sugerindo a aplicação deste método na identificação da ocorrência destes agentes na natureza. Membros patogênicos deste grupo são dificilmente isolados, uma vez que seus nichos ecológicos, ainda não foram totalmente elucidados, devido a grande competição com espécies sapróbias de crescimento rápido. Além disso, fungos meristemáticos e leveduras negras são especialmente encontrados em habitats orgânicos e inorgânicos e então tal procedimento poderá ser aplicado nos diferentes substratos.

Sendo assim, os dados de seqüenciamento de diversos genes com interação dos diferentes métodos moleculares, permitirão a reconstrução segura da filogenia e conseqüentemente um melhor entendimento dos fatores essenciais os quais levaram a biodiversidade deste grupo, além de nortear estudos taxonômicos. A calibração com outros métodos pode facilitar o estabelecimento de entidades população, variedades, gêneros e espécies.

A tecnologia de PCR tem gerado diversas classes de marcadores moleculares que podem ser aplicados no estudo do DNA inteiro ou fragmentado. Em todos os métodos utilizam "primers" que amplificam pontos específicos ou não do genoma de um determinado organismo.

2.2.2.2. RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA")

A denominação RAPD (amplificação de DNA polimórfico ao acaso) foi sugerida por Williams *et al.* em 1990. Paralelamente, Welsh & McClelland, em 1990, descreveram o método AP-PCR ("Arbitrarily Primed Polimerase Chain Reaction"), ou

seja, reação de polimerização em cadeia por “primers” arbitrários. Ambos os métodos propõem que os oligonucleotídeos escolhidos ao acaso numa seqüência de DNA, misturados com DNA genômico e DNA polimerase termoestável, submetidos a ciclos de temperaturas controláveis como os descritos para PCR, iniciam a amplificação do DNA. Ou seja, os componentes necessários à reação de polimerização são os mesmos descritos pela PCR. Os fragmentos amplificados podem ser visualizados em gel de agarose revelado com brometo de etílio (Willians *et al.*, 1990) ou através da utilização de desorixibonucleotídeos (dNTPs) marcados radioativamente (Welsh *et al.*, 1991).

A origem dos fragmentos amplificados obtidos é dependente da seqüência do “primer” e do DNA genômico. Polimorfismos são identificados com a presença de um fragmento específico de DNA amplificado, num determinado local, comparado com a ausência do mesmo fragmento de um outro local. O fato das seqüências “primers” serem geradas arbitrariamente, permite a observação de perfis de “RAPDS” com vários produtos de amplificação, decorrentes da existência de vários sítios homólogos a esses “primers” espalhados pelo genoma. Sendo assim, o RAPD é um método altamente sensível para detectar polimorfismos distribuídos ocasionalmente no genoma, uma vez que os “primers” só reconhecem sítios específicos no genoma, se há uma certa homologia.

Fenótipos moleculares, gerados por RAPD, podem servir para diagnosticar diferentes níveis taxonômicos. Considerando-se um determinado “primer”, os produtos de amplificação, via RAPD, podem ser classificados em dois grupos: variáveis (polimórficos) e constantes (não-polimórficos). Perfis de RAPD de representantes de vários gêneros podem conter bandas comuns a um ou outro gênero, enquanto outras bandas podem ser exclusivas. Se várias espécies pertencentes a esse gênero forem analisadas e uma das bandas exclusivas do gênero estiver presente em todas elas, pode-se concluir que esta banda é um marcador gênero-específico. Da mesma forma, quando se tem o perfil de RAPD de espécies de um mesmo gênero, algumas bandas poderão ser compartilhadas por algumas espécies, enquanto outras poderão ser exclusivas de uma dada espécie. Se vários indivíduos dessa espécie forem analisados e essa banda estiver presente em todos eles, pode-se concluir que é um marcador espécie-específico (Fungaro & Vieira, 1998). Assim, os marcadores de RAPD podem

ser utilizados para diagnóstico molecular de diferentes níveis taxonômicos. Fragmentos polimórficos detectados entre indivíduos de uma população também podem ser utilizados para se determinar o que se chama de identidade clonal, o que normalmente é requerido em estudos envolvendo organismos de reprodução assexual (marcadores clone-específico).

A análise RAPD tem sido utilizada para estudos de variabilidade genética em espécies de fungos filamentosos de interesse agrônomo. Hayden *et al.* (1994) utilizaram marcadores RAPD para distinguir um biotipo de *Colletotrichum gloeosporioides* de manga de outros oito isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cinco espécies diferentes de frutas. Eles também distinguiram *C. acutatum* e *C. musae* um do outro, e de isolados de *C. gloeosporioides*.

O uso de RAPD no estudo de fungos patógenos de plantas tem possibilitado a classificação de linhagem de uma espécie, identificação de raças patogênicas, identificação de marcadores ligados a genes de interesse, e estudos de genética de populações e epidemiologia. No gênero *Colletotrichum* o uso de marcadores RAPD tem sido útil na identificação de diferentes raças de *C. graminicola* na antracnose do sorgo (Guthrie *et al.*, 1992), e na diferenciação de isolados de *C. truncatum* causador da antracnose em soja (Vasconcelos *et al.*, 1994). Em citros marcadores específicos tem sido usados como oligonucleotídeos para PCR e identificação de raças virulentas de *Colletotricum* (Liyanage *et al.*, 1992). A diferenciação de patógenos também foi possível via RAPD entre linhagens do fungo *Leptophaeria maculans* isoladas de crucíferas (Goodwin & Annis, 1991) e de *Brassica napus* (Schäfer & Wostemeyer, 1992). Manulis *et al.* (1994) distinguiram através de RAPD isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium oxysporum* recuperados de cravo.

Liew & Irwin (1994), detectaram alta divergência genética (80%) comparando isolados de *Phytophthora megasperma* isolados de grão de bico oriundos da Austrália e da Espanha. Meijer *et al.* (1994) encontraram alto coeficiente de similaridade entre isolados de *Phomopsis subordinaria*. Varga & Croft (1994) utilizaram marcadores de RAPD para estudar segregantes com substituição cromossômica de híbridos entre *Aspergillus nidulans* e *A. quadrilineatus*. Em leveduras, RAPD e cariotipagem eletroforética foram utilizados para a caracterização de produtos de fusão

de protoplastos e seus segregantes em leveduras, detectando uma banda cromossomal nos produtos de fusão presente nas linhagens parentais e segregantes (Martins *et al.*, 1999). Megnegneau *et al.* (1993) encontraram um alto nível de polimorfismo intraespecífico revelado pela análise RAPD no grupo *Aspergilli* "black". As 17 linhagens examinadas pelos autores puderam ser subdivididas em 15 subgrupos distintos.

A análise de RAPD-PCR foi utilizada para investigar a variação entre 35 isolados de *Alternaria solani*, patógeno oportunista de plantas. Onde foi analisado a distância genética entre isolados de origens geográficas e de plantas hospedeiras diferentes, sendo observado uma grande distância genética entre os isolados de diferentes hospedeiros sugerindo a possibilidade de uma especialização patogênica (Weir *et al.*, 1998).

Em fungos patógenos de humanos, Kersulyte *et al.* (1992) distinguiram entre isolados de *Histoplasma capsulatum*, um fungo patogênico sistêmico e de trato respiratório de uma única classe de RFLP. Cada um dos 29 isolados de classe 2 de RFLP (grupo endêmico da América Central) foi distinguido usando-se três primers arbitrários. Em contraste, colônias de variantes morfológicas S e E de duas linhagens não foram distinguidas de seus parentais R pelo uso de 18 primers. Assim, os isolados clínicos de *H. capsulatum* são bastante diversos, mas seus genomas permanecem estáveis durante cultura em laboratório. Estes resultados sugerem novas possibilidades para análise epidemiológica e estudos de populações fúngicas de hospedeiros infectados. A diversidade de isolados clínicos de *H. capsulatum* demonstrada por Kersulyte *et al.* (1992) está de acordo com o fato deste fungo residir em muitos tipos de solos e climas, e com sua capacidade de infectar muitas espécies animais. Sua estrutura genética populacional deve assim refletir deriva genética devido pressões seletivas diferentes nos seus vários nichos e mudanças genéticas seguindo cruzamentos em habitats naturais.

Em fungos dematiáceos, marcadores de RAPD tem sido utilizado como um critério de marcador adicional em análise molecular. Uijthof *et al.* (1994) utilizaram o marcador para estudar populações de *Exophiala dermatitidis* (Kano) Hoog, onde membros dessas populações apresentavam diferenças de 1 a 2 bases em seqüências ITS1, tais diferenças equívaleram a mudanças nos padrões de banda de RAPD,

formando grupos similares dos encontrados para seqüências ITS1.

Padrões de análise de restrição e seqüências ITS, foram comparados com os grupamentos obtidos por RAPD/DNAM de *H. wemeckii* (Zalar *et al.*, 1999) de diferentes origens ambientais, verificando uma correlação entre os diferentes métodos utilizados.

Uijthof *et al.* (1994) verificaram homogeneidade no padrão RAPD e ITS para espécies neurotrópicas de *C. bantiana* isoladas de humanos. Ainda Uijthof (1996) verificaram uma maior variação para linhagens do mesmo gênero isoladas do ambiente. Masclaux *et al.* (1996), também selecionaram linhagens de *C. bantiana* em grupo através de similaridade estabelecida por RAPD. A variação dentro de membros de uma mesma espécie originados de nichos ecológicos diferentes, vem sendo relatada para espécies neurotrópicas (Horré & Hoog, 1999), porém tal relação não parece específica para estas espécies, o mesmo foi observado em espécies halofílicas de *Hortea wemeckii* (Horta) Nishimura & Miyaji (Zalar *et al.*, 1999).

Caligiorme *et al.* (1999), investigaram o polimorfismo de algumas espécies de fungos dematiáceos usando RAPD. Neste estudo, foram avaliadas linhagens de diferentes origens geográficas. Os resultados obtidos revelaram um alto grau de polimorfismo entre espécies distintas e um baixo grau entre linhagens da mesma espécie. Linhagens de *F. pedrosoi*, *F. compacta*, *P. verrucosa*, *C. carrioni*, *Rhinochadiella aquaspersa*, *E. dermatitidis* e *C. bantiana*, foram estudadas e de acordo com o fluxograma as linhagens de *F. pedrosoi* e *F. compacta* foram reunidos em um mesma clade indicando grande similaridade entre essas linhagens e os autores sugerem que a classificação como espécies distintas pode não ser apropriada. Attili *et al.* (1998), verificaram os mesmos resultados com seqüências ITS1 / RFLP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura e soluções utilizadas:

3.1.1. Ágar Extrato de Malte - MEA (Gams et al., 1987)

Extrato de malte	20g
Glicose	20g
Peptona	1g
Água destilada	1000mL
Ágar	15g

3.1.2. Meio para identificação - OA (Gams et al., 1987)

Aveia em flocos	30g
Ágar	20g
Água destilada	1000mL

3.1.3. Meio de isolamento - ECA (Hoog & Haase, 1993)

Solução base de nitrogênio e levedura ("Bacto yeast nitrogen base")	30g
Mesoeritritol (1,2,3,4-butanetritol)	10g
Clorafenicol	0,5g
Ágar	25g
Água destilada	1000mL

3.1.4. Ágar Sabouraud Dextrosado

Dextrose	40g
Neopeptona	10g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

O pH final foi ajustado para 7,0 e a solução mantida em geladeira

3.1.5. Ágar Sabouraud com Ciclohexamida e Cloranfenicol (“Mycosel”)

Dextrose	20g
Peptona	10g
Ágar	20g
Água destilada	1000mL
Ciclohexamida	500mg
Cloranfenicol	50mg

O meio foi esterilizado e resfriado até 60°C, acrescentando os antibióticos previamente dissolvidos e esterilizados em filtro “Millipore”. A ciclohexamida foi dissolvida em 10mL de acetona e o Cloranfenicol em 10mL de álcool a 95°C.

3.1.6. Ágar Sabhi

Infusão de cérebro bovino	100g
Infusão de coração bovino	125g
Proteose peptona (DIFCO)	5g
Bacto neopeptona	5g
Bacto dextrose	21g
Cloreto de sódio	2,5g
Fosfato disódico	1,25g
Bacto ágar	15g
Água destilada	1000mL

O pH final foi ajustado para 7,0.

3.1.7. Ágar Sabouraud

Neopeptona	10g
Bacto dextrose	20g
Bacto ágar	20g
Água destilada	1000mL

O pH final foi ajustado para 7,0.

3.1.8. Ágar Sangue

Ágar de infusão de cérebro e coração	52g
Água destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH1N.

Em seguida, após autoclavagem e resfriamento do meio à 60°C, acrescentou-se sangue de carneiro para uma concentração final de 10%.

3.1.9. Uréia Ágar Base

Uréia	20g
Ágar	15g
NaCl	5g
KH ₂ PO ₄	2g
Glicose	1g
Vermelho de fenol	0,012g
Água destilada	1000mL

O pH final foi ajustado para 6,8.

Os componentes, exceto o ágar, foram dissolvidos em 100mL de H₂O destilada e esterilizado por filtração. Em seguida acrescentou-se 500mL de H₂O água/ágar esterilizados previamente em autoclave. O meio foi homogeneizado e distribuído em tubos previamente esterilizados e mantidos inclinados até a solidificação.

3.1.10. Meio para a produção de atividade protease

Triptona (Oxoid)	5g
Extrato de levedura	3g
Gelatina	4g
Ágar	8g

pH final foi ajustado para 7,0.

3.1.11. Ágar Arbutina

Arbutina	0,5g
Extrato de levedura	1g
Ágar	1g
Água destilada	100mL

O meio foi autoclavado e após a esterilização 2mL de solução de citrato de amônio férrico à 1% previamente esterilizada por filtração, foi acrescentada.

3.1.12. Czapeck-Dox Ágar - CD

Sacarose	30g
NaNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
FeSO ₄	0,01g

Após a autoclavagem foi acrescentado propranolol à 800µM/mL, esterilizado por filtração.

3.1.13. Meio Butterfield - BF

Glicerol	5mL
MgSO ₄	1,5mL
KH ₂ PO ₄	1,8g
Biotina	5 x 10 ⁻⁵ g
Thiamina HCl	1 x 10 ⁻⁴ g

O pH foi reajustado para 2,5; 3,0 e 4,0 respectivamente. Após a autoclavagem foi acrescentado propranolol à 800µM/mL, esterilizado por filtração.

3.1.14. Meio Mínimo - MM (Pontecorvo *et al.*, 1953)

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Glicose	10,0g
Água destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 5,8 cm NaOH 1N.

Para MM sólido acrescentou-se 1,5% de Ágar DIFCO.

3.1.15. Meio Batata-Glicose-Ágar - BDA

Infusão de batata	200g
Glicose	20g
Ágar	15g

A concentração foi de 3,9% e o pH final foi de 5,6.

3.1.16. Solução salina

NaCl 0,85% (p/v) em H₂O destilada.

Alíquotas de 9,0mL foram colocadas em frascos, autoclavadas e mantidas a 4°C.

3.1.17. Solução de "Tween 80" (0,1 ou 10% v/v)

"Tween 80"	0,1 ou 10mL
Água destilada	100mL

Alíquotas de 2,5mL foram colocadas em tubos de ensaio, autoclavadas e mantidas a 4°C.

3.1.18. Solução reagente para atividade proteolítica

HgCl ₂	45g
HCl 38% p.a	60mL
Água destilada	300mL

3.1.19. Solução de ciclohexamida

Ciclohexamida	66g
Acetona	5mL
Água destilada	300mL

A solução foi esterilizada por filtração.

3.1.20. Solução base de nitrogênio para a assimilação de carbono (Van der Walt & Yarrow, 1984).

Solução base de nitrogênio e levedura

("Bacto yeast nitrogen base")	20,1g
Água destilada	300mL

3.1.21. Soluções fontes de carbono

C1 – C18	1,68g
C19	3,36g
C20 – C22	1,68g
C24 – C37	1,68g
C39 – C40	1,68g

As soluções C1 à C5, C7 à C32, C38 à C40, após a homogeneização foram distribuídas no volume 4,5mL em tubos de ensaios e autoclavadas. O pH das soluções C38 à C40, foi acertado para 5.6 com NaOH. As soluções C6, C33 à C37 foram esterilizadas por filtração. Para as soluções C23 e C38 foram acrescentadas duas gotas por tubo antes da esterilização, e as soluções C41 e C42 foram acrescentadas três gotas após a esterilização. As fontes de carbono C1 – C42 estão sumarizadas na Tabela 1 do Apêndice 1.

3.1.22. Solução base de carbono para a assimilação de nitrogênio (Van der Walt & Yarrow, 1984).

Solução base de carbono e levedura

(Bacto yeast carb base)	11,7g
Água destilada	100mL

A solução foi dissolvida e esterilizada por filtração em filtro “Millipore” e conservada sob refrigeração.

3.1.23. Soluções fonte de nitrogênio

Nitrato de potássio	0,78g
Nitrato de sódio	0,26g
Etilamina hidrocloreídrica	0,64g
Dihidrocloreídrico de cadaverina	0,68g
L-lisina	0,56g

“Cada substância foi pesada e dissolvida separadamente em 100mL de água” e distribuída em tubos de ensaio num volume de 4,5mL e autoclavada.

3.1.24. Solução glicosada

Glicose	10,1g
Água destilada	900mL

A solução foi homogeneizada e distribuída num volume de 150mL em elermeyers e autoclavada.

3.1.25. Solução fonte de sais

NaCl	3,75g (2,5%)
NaCl	7,50g (5,0%)
NaCl	15,0g (10%)
MgCl ₂	3,75g (2,5%)
MgCl ₂	7,50g (5,0%)
MgCl ₂	15,0g (10%)

Cada substância foi pesada e dissolvida separadamente em 150mL de solução glicosada (3.1.24) filtrada por esterilização e então distribuídas sob assepsia num volume de 4,5mL em tubos de ensaio previamente esterilizados, por 60 minutos à 1ATM.

3.1.26. Solução básica para a tolerância à ciclohexamida

A solução glicosada (item 3.1.24) foi utilizada para preparar diferentes concentrações de solução contendo ciclohexamida (0,01%; 0,05% e 0,1%) a partir da solução básica de ciclohexamida (3.1.19).

Após a homogeneização, 4,5mL de cada solução, foi distribuída em tubos de ensaio previamente esterilizados por autoclavagem durante 60 minutos à 1ATM.

3.1.27. Tampão fosfato 0,2 M pH 5,8

Solução A	
NaH ₂ PO ₄	0,2M
Solução B	
Na ₂ HPO ₄	0,2M

As soluções A e B foram autoclavadas e mantidas a 4°C, sendo o tampão fosfato preparado no momento do uso, acrescentando-se à solução A, volume suficiente da solução B até atingir o pH 5,8 (aproximadamente 920mL da solução A com 80mL da solução B).

3.1.28. Tampão CTAB

Tris-base	2,42g
Cloreto de sódio	8,2g
NaEDTA	2,0g
Água destilada	8,0mL

O pH final foi ajustado para 7,5 com HCL 1N.

3.1.29. Tampão (TE)

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
EDTA pH 8,0	20 mM

3.1.30. Solução EDTA + 1% N-Laurilsarcosinato de Sódio (NaEDTA)

EDTA pH 8,0	50 mM
N-Laurilsarcosinato de Sódio	1% (p/v)

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

3.1.31. Solução EDTA 0,5 M pH 8,0

O pH desta solução foi ajustado para 8,0 com NaOH 10N. Para obtenção de EDTA 50mM, diluiu-se esta solução dez vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

3.1.32. Solução estoque de Tris-HCl 1 M pH 9,5

Tris-base	1M
-----------	----

O pH foi ajustado para 9,5 com HCL p.a.

3.1.33. Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X)

Trizma base	0,89M
Ácido bórico	0,89M
EDTA	0,02M
PH 8,0	

3.1.34. Tampão de amostra para gel de agarose (TEB 10X)

Tampão de corrida TEB 10X	
Glicerol (v/v)	50,0%
Azul de bromofenol (p/v)	0,1%
Xifeno cianol (p/v)	0,1%

3.1.35. Solução corante para eletroforese

Azul de bromofenol	6mg
Ficoll	625mg
Água destilada	5mL

3.1.36. Gel de agarose 0,8%

Agarose	0,8g
Tampão TAE	10,0mL

3.1.37. Gel de agarose 1,4%

Agarose	0,14g
Tampão TAE	10,0mL

A agarose foi colocada em um erlenmeyer, adicionou-se o TAE 1x, aquecendo a suspensão até o início da ebulição. Em seguida, adicionou-se 0,1µl do estoque de brometo de etídio (10mg/mL) por mL de gel, misturando suavemente.

3.1.38. Tris-acetato (TAE) 50x

Tris- base	242g
Água destilada	800mL
Acido acético glacial	57,1mL
EDTA 0,5 M, pH 8,0	100mL

O volume foi completado para 1000mL com água destilada. A composição de uma solução 1x é de tris-acetato 0,04M e EDTA 0,001M.

3.1.39. Brometo de etídio

Brometo de etídio	1g
Água destilada	100mL

A solução foi agitada durante 1 hora em agitador magnético e armazenada em frasco âmbar sob refrigeração.

3.1.40. “Primers”

Os “primers” foram diluídos em tampão TE usando o peso molecular do “primer” individual dado pelo fornecedor. Os “primers” diluídos foram mantidos a -20°C.

3.1.41. Taq polimerase

A polimerase foi mantida em tampão apropriado com 50% de glicerol.

3.1.42. dNTPs

ATP, CTP, GTP, TTP foram armazenados em quatro soluções mantidas a -20°C.

3.2. Preparo de material

3.2.1 Esterilização

Os meios de cultura e soluções foram esterilizadas em autoclave, à pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. Vidrarias em forno Pasteur a 180°C por 4 horas. Seringas com lã de vidro, filtros de Büchner, papel de filtro, luvas, frascos vazios etc., foram autoclavados a 1 atmosfera por 15 minutos. Todo material contaminado era autoclavado antes do descarte. Métodos adequados de esterilização para substâncias termolábeis foram citados no item em questão.

3.2.2. Incubação

A incubação em meio sólido foi realizada a 28°C e a 36°C em incubadora tipo BOD com luz ininterrupta por 10 a 20 dias. Em meios líquidos, a incubação também ocorreu a 36°C, com rotação de acordo com o recomendado. Condições específicas de incubação foram devidamente relatadas.

3.3. Isolamento dos fungos no meio ambiente

Para o procedimento de isolamento foram testadas duas metodologias:

A primeira baseada nas metodologias desenvolvidas por Iwatsu *et al.* (1981) e Dixon & Shadomy (1980). Onde foram coletadas amostras do solo, água ,

madeira e folhas nas regiões onde vivem os pacientes infectados. Para cada amostra de material coletada, 20g, com exceção das folhas, foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente em 100mL de solução salina esterilizada contendo 200 unidades de penicilina, 200µg/L de estreptomicina, 200µg/L de cloranfenicol e 500µg/L de ciclohexamida por mL de meio utilizado. Em seguida, foi acrescentado 20mL de óleo mineral em cada frasco. A solução foi homogeneizada por agitação durante 5 minutos e mantida em repouso durante 20 minutos. Em seguida, a interfase da suspensão foi coletada e inoculada em Ágar Mycosel, Ágar Sabhi e ECA. O material foi incubado a 36°C, durante 4 semanas. Após o crescimento as colônias de coloração escura, observadas macroscopicamente foram repicadas em meio Ágar Mycosel.

A segunda metodologia, baseada em Glienke (1995), compreendeu na desinfecção superficial das amostras de folhas em álcool 70% por 30 minutos, em seguida o material foi fragmentado e inoculado diretamente na superfície dos meios citados, seguindo-se as mesmas condições de incubação.

3.4. Identificação das linhagens isoladas

A identificação foi realizada baseada na morfologia das colônias após o crescimento em Ágar Sabouraud Dextrosado na temperatura de 28°C e do estudo da conidiogênese realizado após o crescimento no meios OA e BDA. Como critério adicional na identificação foi realizado o estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando amostras fixadas, secas à vácuo e metalizadas com ouro por 180s, com metalizador MED 010 da Balzers. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 940), operando em 5KV.

A confirmação da identificação dos isolados foi gentilmente realizada por Attili, D.S.², Queiróz-Telles³ e Hoog, G.S.⁴.

² Dra. Derlene Silva Attili – Departamento de Genética, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

³ Dr. Flávio de Queiróz-Telles – Laboratório de Micologia, HC/UFPR, Curitiba-PR.

⁴ Dr. G. Sybren de Hoog, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) – Universiteit Van Amsterdam (UVA) – Baarn – Holanda.

3.5. Linhagens utilizadas

Nesse trabalho foram estudadas linhagens de fungos dematiáceos isolados do ambiente em diferentes regiões do Estado do Paraná indicadas na Figura 7 (cujas as características fisiogeográficas estão descritas no Apêndice 2), isolados de pacientes diagnosticados e tratados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, gentilmente cedidos por Queiroz-Telles, apresentados na Tabela 2 e linhagens referências do CBS apresentados na Tabela 3.

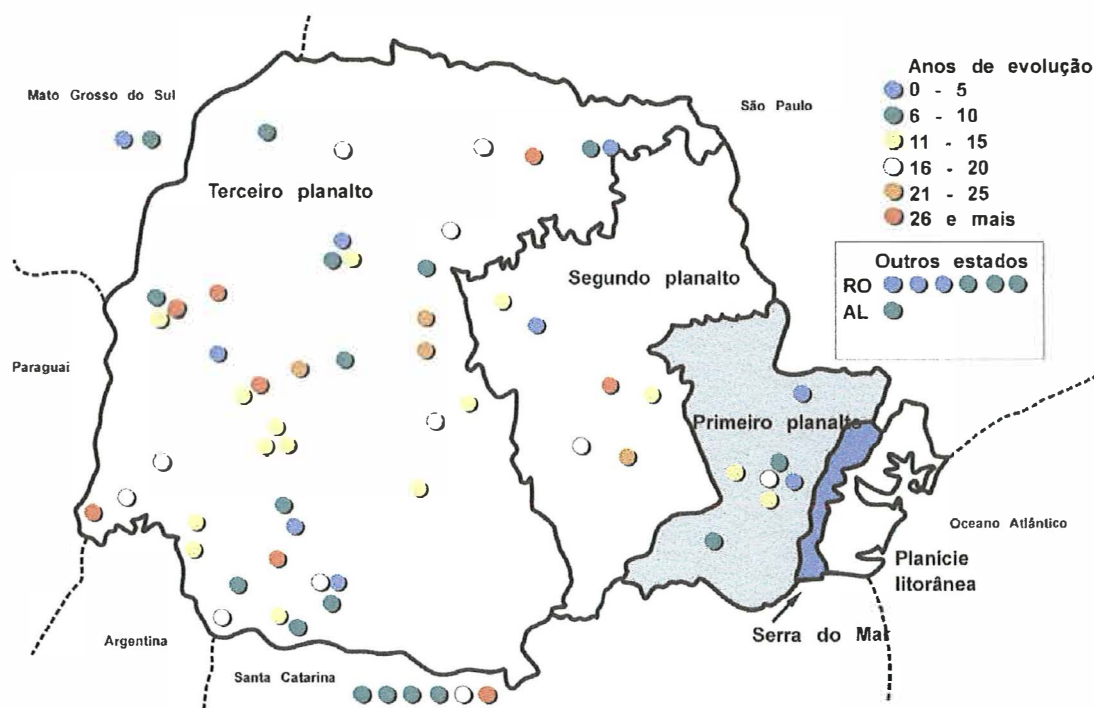


Figura 7. As regiões naturais do estado do Paraná e o local de início da infecção em pacientes com cromoblastomicose. (Fonte: Queiroz-Telles, 1996).

Tabela 2. Agentes causadores da cromoblastomicose, isolados de pacientes de diferentes regiões do Estado do Paraná.

Número de isolados	Sexo/Profissão do paciente ao adoecer	Domicílio ao adoecer
Fp28III	Masculino/Lavrador	Marmeleiro/PR (3ºp)
Fp31I	Masculino/ lavrador	Imbituva (2ºp)
Fp37	Masculino/Lavrador	Iporã/PR (3ºp)
Fp46I	Masculino/Lavrador	Ortigueira/PR (2ºp)
Fp63I	Masculino/Lavrador	Ampére/PR (3ºp)
Fp65	Masculino/Lavrador	Campo Largo/PR (1ºp)
Fp77	Masculino/Marceneiro	Ponta Grossa/PR (1ºp)
Fp82	Feminino/Lavadora	Piraquara/PR (1ºp)

Fonte: Queiroz-Telles

Tabela 3. Linhagens referenciais de fungos dematiáceos gentilmente cedidas pelo CBS.

Linhagens	Nº	Nomenclatura	Fonte	Origem Geográfica
<i>Ramichloridium cerophilum</i>	103.59	T	Vegetal	Japão
<i>Ramichloridium cerophilum</i>	283.92	-	Solo	Brasil
<i>Fonsecae compacta</i>	285.47	-	Cromoblastomicose	Porto Rico
<i>Fonsecae compacta</i>	659.76	-	Cromoblastomicose	Venezuela
<i>Fonsecae compacta</i>	212.77	-	Cromoblastomicose	Holanda
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	201.31	-	Antílope	Libia
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	342.34	T	Cromoblastomicose	Porto Rico
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	269.37	T	?	?
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	271.37	NT	Cromoblastomicose	América do Sul
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	397.48	T	Cromoblastomicose	América do Sul
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	253.49	-	?	Uruguai
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	444.62	-	Cromoblastomicose	Surinami
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	273.66	-	Solo	Venezuela
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	289.93	-	Areia	Holanda
<i>Ramichloridium anceps</i>	157.54	-	Vegetal	França
<i>Ramichloridium anceps</i>	181.65	NT	Solo	Canadá
<i>Ramichloridium anceps</i>	397.76	-	Vegetal	Czechoslovakia
<i>Ramichloridium anceps</i>	403.76	-	Vegetal em decomposição	Rússia
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	380.59	-	Vegetal	Canadá
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	291.65	-	Humano	Holanda
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	677.76	-	Pele humana	?
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	685.76	-	Vegetal	Canadá
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	686.76	-	Vegetal	Canadá
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	688.76	-	Vegetal	Austrália
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	689.76	-	?	Inglaterra
<i>Rhinochadiella phaeophora</i>	496.78	T	Solo	Colômbia
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	272.37	T	?	?
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	264.49	T	Mel	França
<i>Rhinochadiella atrovirens</i>	265.49	T	Mel	França
<i>Ramichloridium anceps</i>	101.460	-	Pele	Japão
<i>Ramichloridium anceps</i>	469.94	-	?	?

Abreviações usadas: T = tipo; NT = neotipo; ? = dados não fornecidos.

3.6. Estudo da patogenicidade dos isolados (de acordo com Iwatsu *et al.*, 1981)

Os isolados de humanos foram comparados com os isolados do ambiente em relação à patogenicidade. Conídios dos fungos cultivados a 27°C durante 4 semanas em Ágar Sabouraud Dextrosado, e em Ágar Sangue, foram lavados três vezes em solução salina por centrifugação. Em seguida foram homogeneizados em solução salina com Tween 80 contendo 2×10^7 células por mL e inoculados subcutaneamente no dorso da pata de camundongos isogênicos do tipo Balb C. Foram inoculados dois camundongos para cada isolado. O inóculo contendo apenas solução salina foi utilizado como controle negativo, para o controle positivo foram utilizadas

linhagens referência de *F. pedrosoi* (CBS 272.37) e os isolados de pacientes com cromoblastomicose (Fp65 e Fp82). Após cinco semanas, os animais foram sacrificados e os tecidos inoculados removidos. Parte desse material foi transferido para ágar Sabouraud dextrose a 28°C por duas semanas. O restante foi fixado em formalina 10% e utilizado em preparações histológicas (Hematoxilina e Eosina – HE).

3.7. Testes fisiológicos

Foram testadas habilidades fermentativas e de crescimento em meio líquido de acordo com Hoog *et al.* (1995a).

3.7.1. Teste de assimilação de carbono

Para cada amostra testada, foi preparada uma solução de 10^7 células/mL em solução base de nitrogênio (3.1.20). Após homogeneização, 0,5mL desta solução foi inoculada em tubos contendo as diferentes fontes de carbono (3.1.21). Os tubos foram mantidos em posição vertical sob agitação a 25°C. O controle negativo utilizado continha apenas a solução basal sem as fontes de carbono. Foram utilizadas duas repetições para cada amostra.

A produção de biomassa foi verificada durante 3 semanas, até a exaustão completa das fontes testadas. A fermentação da glicose foi realizada durante um período de duas semanas, em tubos verticais contendo tubos de Durham.

3.7.2. Teste de assimilação de nitrogênio

Para cada amostra testada foi inoculado 10^7 células/mL em solução base de carbono (3.1.22). Após homogeneização um volume 0,5mL desta solução, foi transferido para tubos contendo diferentes fontes de nitrogênio (3.1.23). Os tubos foram incubados a 25°C sob agitação em posição vertical. A produção de biomassa foi verificada durante duas semanas, até a exaustão completa das fontes testadas. Um controle negativo, contendo apenas a solução basal foi utilizado. Realizaram-se duas repetições para cada amostra.

3.7.3. Atividade protease (liquefação de gelatina)

Para a atividade de liquefação de gelatina, as amostras foram inoculadas por estria única no centro do meio (3.1.10) e incubadas por cinco dias à 24°C. Após a incubação foi realizada a leitura dos resultados, utilizando o reagente revelador (3.1.18). As placas com reagente foram incubadas por 10 minutos até a revelação de um halo transparente ao redor da estria. Na ausência do halo as placas foram mantidas em câmara fria durante 30 minutos e então nova observação foi realizada. A não revelação do halo foi considerada atividade protease negativa.

3.7.4. Teste de assimilação de arbutina em meio sólido

Para cada amostra foi realizado um inóculo por estria única no meio da placa contendo Ágar Arbutina (item 3.1.11). As placas foram incubadas à 24°C, durante 10 dias. Após o crescimento, a formação de um halo escuro ao redor da colônia estudada foi considerado como teste positivo.

3.7.5. DNASE extracelular

Os fungos testados foram inoculados por estrias no meio de placas contendo Ágar Teste DNASE (DIFCO) e então incubados durante seis dias à 28°C.

Após o crescimento as placas foram lavadas com EtOH à 96% e em seguida foi acrescentado HCl 1N e as placas mantidas por uma hora à temperatura ambiente e 30 minutos em câmara fria. A formação de um halo transparente ao redor do inóculo foi considerado positivo para produção de DNase extracelular.

3.7.6. Produção de urease

As amostras de fungos testados foram inoculadas na forma de estrias em meio para produção de urease (3.1.9). A incubação foi realizada à 24°C durante quatro dias. A alteração de coloração do meio (de amarelo para rosa) foi o indicativo da produção de urease.

3.7.7. Tolerância à ciclohexamida

Os fungos foram inoculados em meio líquido contendo diferentes concentrações de ciclohexamida (item 3.1.25). A incubação foi realizada sob agitação, à 24°C, utilizando duas repetições para cada amostra. Um controle negativo foi utilizado. O crescimento em ágar teste comercial (Mycosel item 3.1.5) também foi testado.

3.7.8. Osmotolerância

Os fungos foram inoculados em meio líquido contendo diferentes concentrações de sais (3.1.25). A incubação foi realizada à 24°C, sob agitação e os tubos mantidos em posição vertical. A avaliação do crescimento foi realizada com uma semana de incubação. Duas repetições para cada amostra e um controle negativo foram utilizados.

3.7.9. Termotolerância

A termotolerância foi testada em ágar extrato de malte à 4% (MEA – item 3.1.1). Para cada amostra foi realizado um inóculo por estria no centro da placa. A incubação foi realizada à temperaturas de 24, 28, 37 e 40°C respectivamente, durante 10 dias.

3.8. Avaliação do crescimento em propranolol

As amostras de fungos testadas foram previamente crescidas em meio CD (3.1.12). Após a observação do crescimento micelial, 10mL do meio CD cultivado foram transferidos para os meios CD (3.1.12) e BF (3.1.13), respectivamente. A incubação foi realizada sob agitação à temperaturas de 28°C e 30°C, respectivamente. Após 20 dias de incubação foram realizadas observações microscópicas em Microscópio Ótico comum, utilizando hidróxido de potássio a 40% para a confecção das lâminas.

3.9. Extração e quantificação de DNA

As amostras de fungo foram cultivadas em meio sólido, nas condições adequadas para cada isolado. Em seguida coletou-se aproximadamente 1cm² de micélio transferindo-se para “ependorf” contendo 300mL de tampão CTAB contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck/celite 2:1). O material foi triturado com o auxílio do equipamento “Eppendorfpestle” (Mörser) durante 1 a 2 minutos. Após a trituração acrescentou-se 200µL de tampão CTAB (item 3.1.28), agitando e incubando por 10 minutos a 65°C. Em seguida foi adicionado 500µL de clorofórmio obtendo-se fases, as quais foram misturadas cuidadosamente. Então realizou-se a centrifugação a 14000 rpm durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido quando necessário. A fase aquosa foi coletada e 2 volumes de etanol 96% gelado foram acrescentados, e a precipitação do DNA realizada a -20°C por 30 minutos ou tempo necessário. Após a precipitação do DNA, foi procedida a centrifugação a 14000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com álcool 70% gelado, submetido à centrifugação por 1 minuto e os tubos vertidos até a secagem completa do “pellet” à temperatura ambiente. Posteriormente, o DNA foi ressuspendido em 97,5µL de tampão TE (item 3.1.29), mais 2,5µL de RNase 20U/mg e a mistura incubada em banho-maria a 37°C durante 1 hora. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (260nm) e sua integridade verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio.

3.10. PCR – amplificação e seqüenciamento

3.10.1 – PCR - Ribotipagem

Fragments de DNAr foram amplificados com os pares de “primers” V9G (5’TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-3’) e LS266 (5’- gCATTCCCAAACAACACTCgACTC – 3’) no termociclador “Biomed 60”. Para a reação de PCR foram utilizados um volume de 50µL contendo 10mM tris-HCl, pH 8,3; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂ 6H₂O; 200mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, 50pmol de cada “primer”, 10-100ng de DNA total e 0,5U de taq DNA polimerase (“Amplitherm, ITK Diagnostics, Maarsen, The

Netherlands”). O programa utilizado apresentava 30 ciclos (30s de desnaturação a 99°C; 60s, anelamento a 55°C; 60 de síntese a 72°C), utilizando 2 minutos para a desnaturação inicial e 3 minutos de extensão final.

Os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,6% (utilizando 8µL da amostra e 2µL de corante). Os fragmentos de amplificação obtidos foram visualizados no Analisador de Imagem “Master Video System” com o “software” da “Pharmacia”. O marcador de peso molecular “Ladder” de 200pb foi o utilizado.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação de bandas e DNA (GTX PCR DNA, “Pharmacia”).

3.10.2. Reação de seqüenciamento

Na PCR realizada para o seqüenciamento, foram utilizados os “primers” ITS1 (5'-TCCgTAggTgAACCTgCgg-3'); ITS4 (5'TCCTCCgCTTATTgATATgC-3'); ITS5 (5'-ggAAgTAAAgTCgTAACAAgg-3'). Para cada reação foi utilizado 4µL do “mix” “bigdie” terminador (“Terminator Ready Reaction Mix” da “Perkin-Elmer Applied Biosystem”), 30ng de produto de PCR purificado (item 3.10.1), 1µL do “primer” (25ng/µL), água Milli Q à completar 10µL. O programa de amplificação consistiu de 25 ciclos de 10 segundos à 96°C, 5 segundos à 50°C e 4 minutos à 60°C. Após 25 ciclos foi realizada a refrigeração à 4°C.

3.10.3. Precipitação do DNA para ser seqüenciado

Os 10µL do DNA amplificado de acordo com o item 3.10.2, foram transferidos para tubos tipo “eppendorfs” de volume 1,5mL e 1,0µL de acetato de sódio à 3M pH 4,6, foi adicionado. Em seguida, foi acrescentado 25µL de etanol 95% e a mistura incubada em gelo por dez minutos. O material foi centrifugado durante 20 minutos à 14000rpm. O sobrenadante obtido foi cuidadosamente removido visando a preservação do “pellet”. Posteriormente foi adicionado 250µL de etanol à 70%. A centrifugação foi repetida, o sobrenadante retirado cuidadosamente à vácuo e o “pellet”

mantido à temperatura ambiente, na ausência de luz até secagem completa (\pm 1 a 2 horas).

3.10.4. Seqüenciamento

Após a secagem completa do DNA precipitado (item 3.10.3), foi acrescentado 12 μ L da solução TSR (“Template Suppression Reagent” da “Perkin-Elmer Applied Biosystem”) indicada para o seqüenciador utilizado. Depois da dissolução completa, a solução de DNA foi transferida para tubos recomendados pelo fabricante e mantidos em banho à 90°C durante dois minutos e rapidamente transferidos para o banho de gelo até o momento da reação de seqüenciamento realizada no seqüenciador “Prism ABI” (310) automático da “Perkin-Elmer”.

3.10.5. Alinhamento das seqüências e construção da árvore filogenética

As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando diferentes programas indicado nas respectivas figuras. As árvores filogenéticas foram calculadas a partir de diversos métodos para o cálculo de distâncias indicados nas figuras correspondentes. A árvore final foi construída utilizando o método “Neighbor-Joining” do programa “Treecon package” (Van de Peer & de Wachter, 1994). Os valores de “bootstrap” acima de 75% foram indicados e discutidos.

3.11. RAPD - Amplificação

Para a amplificação do DNA (RAPD) foi empregada a condição experimental previamente testada para cada amostra utilizando uma mistura contendo além da amostra de DNA os seguintes elementos: 1,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase; 5 μ M para cada dNTP; 3,0mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,4 μ M de “primers”; 20mM de Tris-HCl pH 8,4; 5mM KCl e 10ng de DNA por 25 μ L de reação.

Foram utilizados 40 ciclos com as seguintes condições: 1 minuto a 92°C; 1,5 minutos a 37°C e 2 minutos a 72°C. Foram utilizados 4 minutos a 92°C para desnaturação inicial e 2 minutos a 72°C de extensão final.

3.12. Eletroforese dos produtos de RAPD

Separadamente, a mistura contendo 22 μ L de cada amostra e 3 μ L de corante foi aplicada no gel, além do marcador de peso molecular "Ladder" 100pb (MPM). A corrida do DNA no gel foi realizada sob voltagem constante de 3V por cm. O gel foi corado com brometo de etídio e exposto à luz ultra violeta para a visualização das bandas de DNA.

3.13. Análise do poliformismo obtido por RAPD

A análise da variabilidade genética foi realizada pelo agrupamento das linhagens segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Utilizou-se o coeficiente de similaridade Jaccard e coeficiente simples (simple matching), os quais permitem calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de banda). As bandas foram consideradas variáveis enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente Jaccard foi calculado segundo a fórmula $J = M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos concordâncias negativas, enquanto que o coeficiente simples foi calculado segundo a fórmula $SM = M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas mais concordâncias negativas e P o número total de variáveis (Sneath & Sokal, 1973). As unidades foram agrupadas através do método UPGMA ("Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average"), que é um modelo de agrupamento hierárquico que permite a construção de dendrogramas (Sneath & Sokal, 1973). Matrizes e dendrogramas foram elaborados com auxílio do programa NTSYS ("numerical taxonomy system of multivariate programs") (Rohlf, 1988).

A consistência dos agrupamentos foi verificada pela análise "bootstrap", segundo descrito por Felsenstein (1985), utilizando o "software Winboot" (Yap & Nelson, 1996). Foram utilizadas 2000 amostragens com reposição dos dados dos marcadores. Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 95%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições "bootstrap".

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de fungos dematiáceos de fontes ambientais

O isolamento revelou a presença e diversos fungos dematiáceos. Dentre eles gêneros como *Cladosporium*, *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Ramichloridium*, *Rhinocladiella*, *Stenella*, *Stachybotrys* e *Veronea*. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Isolamento de fungos dematiáceos de interesse médico de fontes ambientais nos diferentes locais de coleta.

Local de Isolamento	Substrato Utilizado	Nº do Isolado	Identificação	
1º PLANALTO				
EMBRAPA/CNPF Região Metropolitana de Curitiba	Madeira de Cambará (<i>Gochnatia polymorpha</i>) em decomposição	FE1	<i>Cladophialophora</i> sp	
		FE5P4	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	
		FE5P6	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	
		FE5	<i>Phialophora verrucosa</i>	
		FE4	<i>Exophiala jeanselmi</i> var. <i>Lecanii-corni</i>	
	Formigueiro	Madeira de <i>Araucaria angustifolia</i>	FE6	<i>Exophiala</i> sp
		Resíduo Vegetal acumulado na bainha da folha de palmeira Jerivá (<i>Syagrum romanzoffianum</i>)	FE7	<i>Ramichloridium</i> sp
	Casca de caule de palmeira Jerivá (<i>Syagrum romanzoffianum</i>)	Solo retido em raízes de Cambará (<i>G. polymorpha</i>)	FE9	<i>Cladophialophora bantiana</i>
			F3	<i>Phialophora verrucosa</i>
		Tronco de Cambará (<i>G. polymorpha</i>) em decomposição	FE10	<i>Ramichloridium</i> sp

Boqueirão bairro de Curitiba/PR (Zona Urbana - Área de Atividade Agrícola)	Madeira em decomposição	FB2D	<i>Stenella pseudoporiopes</i>	
		FB2C	<i>Veronea carbiniae</i>	
		FB3C	<i>Veronea carbiniae</i>	
		FB6	<i>Exophiala jeanselmi</i>	

Tabela 4 – continuação

Local de Isolamento	Substrato Utilizado	Nº do Isolado	Identificação	
Lapa-PR (Zona Rural)	Tronco em decomposição	FL1	<i>Cladophialophora</i> sp	
		FL2	<i>Cladophialophora</i> sp	

Colombo (Zona Rural-Fazenda)	Raízes de bambú em decomposição	FCL2	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	

Campo Largo (Zona Rural)	Capim Lambe-Lambe	FC2	<i>Stachybotrys</i> sp	
	Solo	FC3	<i>Cladosporium (Exophiala-Like)</i>	
	Raízes aderidas à pedra	FC4	<i>Cladophialophora</i> sp	

Piraquara (Zona Urbana- Chácara)	Solo com Esterco	FP7	<i>Rhinocladiella</i> sp	
		FP8A	<i>Phialophora</i> sp	
		FP9	<i>Cladophialophora devrisei</i>	
		FP8D	<i>Fonsecaea</i> sp	
	Cobertura vegetal - solo	FP4	<i>Cladophialophora</i> sp	
		FP2	<i>Veronea</i> sp	
		FP5	<i>Cladophialophora</i> sp	

2º PLANALTO				
Margens do Rio Tibagi	Solo	F1PLE	<i>Rhamichloridium</i> sp	
		F1PLD	<i>Rhamichloridium</i> sp	
		F1PLG	<i>Cladosporium</i> sp	
		FEH	<i>Cladosporium</i> sp	
		FPLI	<i>Cladosporium</i> sp	
	Cobertura vegetal em decomposição	F1PL	<i>Cladophialophora</i> sp	
		F1PLA	<i>Rhamichloridium</i> sp	
		F1PLB	<i>Rhamichloridium</i> sp	
		F1PLF	<i>Cladophialophora bantiana</i>	
		F1PLJ	<i>Exophiala</i> sp	
		F1PLC	<i>Rhamichloridium</i> sp	

Telêmaco Borba	Tronco em decomposição	F11PL	<i>Rhinocladiella</i> sp	
		F11PLA	<i>Rhamichloridium</i> sp	
	Cobertura vegetal em decomposição	F10PLA	<i>Rhamichloridium</i> sp	
	Tronco de cinamomo em decomposição	F10PL	<i>Rhamichloridium</i> sp	
		F10PLB	<i>Rhamichloridium</i> sp	
Solo	F9PL	<i>Exophiala</i> sp		

Tabela 4 – continuação

Local de Isolamento	Substrato Utilizado	Nº do Isolado	Identificação
Pinhalão	Cobertura vegetal	F2PLA	<i>Exophiala</i> sp
		F2PLA1	<i>Cladophialophora</i> sp
	Tronco em decomposição Cupinzeiro	F2PLB	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F8PLA	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F8PLB	<i>Cladosporium</i> sp
	F8PL	<i>Exophiala</i> sp	

Piraí do Sul	Solo	F3PLD	<i>Cladophialophora</i> sp
	Cobertura vegetal em decomposição	F3PL	<i>Cladophialophora</i> sp
		F3PLA	<i>Exophiala</i> sp
		F3PLB	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F3PLC	<i>Rhamichloridium</i> sp

Castro	Solo de cultura de café	F14PL	<i>Exophiala jeanselmi</i>
	Caule de café em decomposição	14PLA	<i>Rhamichloridium</i> sp

3º PLANALTO			
Candói	Solo – cobertura	F1PR	<i>Rhamichloridium</i> sp
	Cactus em decomposição	F2PR	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F2PRG	<i>Rhamichloridium</i> sp

Terra Roxa (Zona Rural)	Solo de mata com cobertura vegetal	F8PR	<i>Phialophora</i> sp
	Madeira de Grevilha (<i>Grevilha robusta</i>) colonizada	F9PR	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F9PRA	<i>Fonsecaea</i> sp
		F9PRB	<i>Rhamichloridium</i> sp
	Galho de Pinheiro Bravo (<i>Podocarpus lambertii</i>) Tronco em decomposição	F9PRC	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F9PRC2	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F9PRD1	<i>Cladophialophora</i> sp
	F9PRE	<i>Cladosporium</i> sp	

São Miguel do Iguaçú (Parque do Iguaçú)	Solo com material vegetal em decomposição	F12PR	<i>Cladosporium</i> sp
Santa Isabel (Zona Rural)	Cobertura vegetal em decomposição	F18PR	<i>Cladophialophora</i> sp
		F19PR	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F19PRA	<i>Cladophialophora</i> sp
	Palmeira em decomposição	F19PRB	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F19PRC	<i>Phialophora verrucosa</i>
		F19PRD	<i>Rhamichloridium</i> sp

Tabela 4 – continuação

Local de Isolamento	Substrato Utilizado	Nº de Isolados	Identificação
Jacutinga (Zona Rural)	Solo úmido	F20PR	<i>Exophiala</i> sp
		F20PR1	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F20PR2	<i>Rhinochadiella</i> sp
	Cobertura vegetal Madeira em decomposição Tronco em decomposição	F20PR3	<i>Cladophialophora</i> sp
		F20PRA	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F20PRB	<i>Veronea</i> sp
	F20PRC	<i>Cladophialophora</i> sp	
Francisco Beltrão Bairro Petrópolis (Região Urbana)	Cobertura vegetal	F26PR	Não identificado
		F26PR1	<i>Exophiala</i> sp
		F26PR2	<i>Rhinochadiella</i> sp
	Madeira em decomposição Cobertura vegetal	F26PRB	<i>Exophiala</i> sp
		F26PRA	<i>Exophiala</i> sp
		F26PRC	<i>Cladophialophora</i> sp
		F26PRD	<i>Rhamichloridium</i> sp
		F26PRE	<i>Cladophialophora</i> sp

Os meios de cultura utilizados mostraram-se bastante eficientes. O Ágar Mycosel é considerado um meio clássico de isolamento para fungos patógenos de humanos, que além das fontes de carbono e energia, é acrescido de antibióticos e do quimioterápico ciclohexamida de ação citostática, agindo principalmente sobre fungos contaminantes de crescimento rápido. O Ágar Sabbi além das fontes de carbono e energia é enriquecido com infusão de cérebro e coração. O resultado obtido a partir do cultivo nos diferentes meios citados podem ser visualizados na Figura 8.



Figura 8. Amostras de isolamento de fungos dematiáceos em meio Mycosel. A) diluição de 10^7 células/mL e B) diluição de 10^3 células/mL.

Dixon & Shadomi (1980), recomendaram a utilização dos dois meios para o isolamento utilizando a técnica do plaqueamento direto e não verificaram diferenças significativas na freqüência de isolamento para ambos os meios, da mesma forma que os resultados obtidos neste trabalho. O meio contendo mesoeritritol (item 3.1.3), como inibidor de fungos contaminantes, também foi utilizado, porém, o número de fungos dematiáceos isolados neste meio foi menor. De acordo com Hoog & Haase (1993), o mesoeritritol é um potente citostático, agindo inclusive sobre alguns fungos dematiáceos de crescimento rápido. Os autores verificaram que o meio é eficiente para o isolamento de leveduras negras do tecido hospedeiro e fontes ambientais. Sendo assim, os resultados observados podem ser consequência da ação citostática deste meio.

Neste trabalho, foram analisadas 540 amostras de substratos tais como, vegetal, vegetal em decomposição e madeira em diferentes regiões do Estado do Paraná. A seleção dos substratos e regiões analisadas foi de acordo com a distribuição dos casos de cromoblastomicose relatados (Figura 7).

Das 540 amostras coletadas, foram recuperadas um total de 81 gêneros (15%) de fungos dematiáceos de interesse médico. A freqüência de isolamento destes agentes, foi maior do que a relatada por Iwatsu *et al.* (1981), onde em 117 amostras examinadas, os autores encontraram 13 isolados de *P. verrucosa* e 1 de *F. pedrosoi* (11,1%). Na Tabela 5 pode-se verificar a freqüência de isolamento de acordo com as diferentes regiões do Estado.

Tabela 5. Freqüência de isolamento de fungos dematiáceos de interesse médico em diferentes regiões do Estado do Paraná.

Região de Coleta	No. de amostras investigadas	No. de fungos dematiáceos (%)
1º Planalto	140	26 (18,6%)
2º Planalto	170	26 (15,3%)
3º Planalto	230	29 (12,6%)
Total	540	81 (15,0%)

De acordo com os dados obtidos (Tabela 5), a região de maior frequência de isolamento de dematiáceos, de interesse médico a partir de fontes ambientais pertence ao primeiro planalto (Figura 7), especificamente a área do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – CNPF/EMBRAPA no município de Colombo-PR, Região Metropolitana de Curitiba-PR. A coleta foi realizada em um bosque manejado de espécies nativas arbóreas com predominância de pinheiro-bravo (*Podocarpus lambertii*) e ocorrência de cambará (*Gochnathia polymorpha*), pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*) e de jerivá (*Syagrum romanzoffianum*) em solo húmico, álico de textura argilosa. A primeira coleta foi realizada no mês de outubro de 1997 cuja a precipitação mensal foi de 166,64mm, temperatura média mensal de 16,7°C e a umidade relativa do ar em torno de 88% (média mensal), com um total em horas de insolação de 77,2 (média de 2,5h/dia). A partir dos dados observados acredita-se que tais condições ambientais podem ser favoráveis ao desenvolvimento desses agentes, uma vez que não foi verificado em outras regiões a mesma facilidade de isolamento.

Em Piraquara, embora região urbana, a recuperação de colônias de fungos dematiáceos foi semelhante. A coleta foi realizada em bosque com predominância de *Araucaria angustifolia*, solo com cobertura vegetal e a existência de animais domésticos. As características climáticas e geográficas coincidem com às descritas para a área da EMBRAPA/CNPF.

No local onde a frequência de isolamentos de fungos dematiáceos de importância médica foi alta, foi realizado um segundo isolamento visando confirmar os resultados obtidos. O segundo isolamento ocorreu um ano depois, sob condições ambientais muito similares, com precipitação mensal de 192,2mm, temperatura média de 16,5°C, umidade relativa do ar de 88% e 105,4 horas total de insolação (3,4 horas por dia). Os resultados estão reunidos na Tabela 6.

Tabela 6. Reisolamento em regiões da ocorrência de fungos dematiáceos de interesse médico.

Local de Coleta	Substrato Utilizado	Nº. do Isolado	Identificação
EMBRAPA/CNPF Região Metropolitana de Curitiba (Zona Rural) (1º Planalto)	Caule de Cambará em decomposição	FE1IIA	<i>Cladophialophora</i> sp
		FE1IIB	<i>Exophiala</i> sp
	Tronco de palmeira em decomposição	FE4IIA	<i>Cladophialophora</i> sp
		FE4IIB	<i>Exophiala jeanselmei</i> var. <i>lecanii-corni</i>
		FE5IIB	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
		FE6IIB	<i>Exophiala</i> sp
Tronco de araucária em decomposição	FE6IID	<i>Fonsecaea</i> sp	
	FE6IIC	<i>Veronea</i> sp	
	Folha de palmeira em decomposição	FE7IIB	<i>Veronea</i> sp
Material vegetal em decomposição (cobertura vegetal)		FE10IIA	<i>Cladosporium</i> sp
		FE10IIB	<i>R. cerophilum</i>
		FE10IIB1	<i>Ramichloridium</i> sp
		FE10IIB2	<i>Cladophialophora</i> sp
	FE10IIC	<i>Cladosporium</i> sp	
Piraquara (Zona Urbana de Atividade Agrícola) (1º Planalto)	Cactus	FP2IIA	<i>Ramichloridium</i> sp
		FP2IIB	<i>Ramichloridium</i> sp
	Solo/Horta	FP3IIA	<i>Exophiala</i> sp
		FP3IIB	<i>Exophiala</i> sp
	Madeira em decomposição	FP4IIA	<i>Cladophialophora</i> sp
FP4IIB		<i>Cladophialophora</i> sp	
Solo com esterco	FP7II	<i>Cladophialophora</i> sp	
Solo	FP9II	<i>Cladophialophora</i> sp	

De acordo com a descrição fisiográfica do Estado (Apêndice 2), o volume de chuvas diminui no sentido sul para o norte e oeste do Estado e a cobertura vegetal se diferencia de acordo com a formação geológica e conformação geomorfológica. Em direção ao 3º planalto o território situa-se entre altitudes de 300 e 600m, com temperatura média anual ao sul de 15°C elevando-se para 22°C ao norte. Tais fatores podem justificar a menor ocorrência destes agentes, ressaltando também que as regiões referentes ao 3º planalto foram intensamente desmatadas nos últimos 15 anos.

A variação na diversidade de isolamento destes fungos devido a fatores ambientais também foi relatada por Persiani *et al.* (1998). Os autores verificaram diferenças significativas na taxa de recuperação dos fungos *Cladosporium* e *Rhinocladiella* de acordo com o solo e precipitação, indicando que solos intactos e maiores níveis de precipitação possibilitaram uma frequência maior de isolamento. De acordo com Hoog *et al.* (1998), os fungos dematiáceos apresentam habilidade para o crescimento em baixas tensões de oxigênio e sendo assim, podem vencer a competição frente a fungos hialinos esporulantes. Além disso são capazes de sobreviver em condições extremas de altas temperatura e exposição à Ultra-violeta devido a presença de melanina (Wheeler & Bell, 1988). Tais relatos indicam que o fator umidade associado a temperaturas mais elevadas pode favorecer o desenvolvimento desses agentes. Da mesma forma, os altos índices de precipitação que poderiam diminuir a aeração do solo e portanto dificultar o isolamento, podem ter favorecido o desenvolvimento destes agentes, os quais, de acordo com a literatura, (Titze & Hoog, 1990), apresentam espécies adaptadas ao “stress” hídrico e ou halotolerantes.

Durante o período de dois anos, realizando coletas e isolamentos, verificou-se principalmente para o 1º planalto a existência de um período sazonal. Nos meses de maio a agosto, época de inverno rigoroso nestas regiões, houve uma redução na frequência de isolamento; enquanto que durante os meses de maior precipitação e aumento da temperatura média o número de isolados cresceu gradativamente. Da mesma forma, um estudo da ocorrência de fungos dematiáceos, realizado nas praias do Rio Amazonas, em Manaus (AM), revelou uma redução no número de fungos isolados no inverno em relação ao verão. Sendo que alguns gêneros, como *Exophiala* e *Phialophora* só ocorriam durante o período de verão (Cristóvão *et al.*, 1999).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, o reisolamento de espécies como *F. pedrosoi*, e dos gêneros *Cladophialophora* sp, *Exophiala* sp e *Ramichloridium* sp indica a existência sapróbia destes agentes. Na Tabela 7 estão indicadas as frequências de isolamento dos agentes dematiáceos em relação aos substratos coletados em todos os isolamentos realizados.

Tabela 7. Frequência de fungos dematiáceos isolados de diferentes substratos, considerando todas as coletas realizadas (1º e 2º isolamentos).

Habitat	Nº. de amostras (%)	<i>Cladophialophora</i> sp	<i>Exophiala</i> sp	<i>Fonsecaea</i> sp	<i>Phialophora</i> sp	<i>Ramichloridium</i> / <i>Rhinoctadiella</i>	<i>Veronea</i>
Cobertura vegetal em decomposição	31 (31%)	10	5	-	1	14	1
Tronco de árvores	9 (9%)	1	-	1	-	7	-
Raízes de árvores	2 (2%)	1	-	-	1	-	-
Formigueiro e cupinzeiro	3 (3%)	-	2	-	-	1	-
Solo	17 (17%)	5	6	1	1	4	-
Madeira em decomposição	38 (38%)	9	5	5	2	12	5
Total (%)	100	26 (26%)	18 (18%)	7 (7%)	5 (5%)	38 (38%)	6 (6%)

Pela análise dos dados, pode-se verificar que os gêneros *Cladophialophora*, *Ramichloridium* e *Rhinoctadiella* foram os mais isolados, sendo o grupo *Ramichloridium* foi o mais freqüente (38%).

Considerando-se as fontes analisadas, foi a partir de vegetal em decomposição (38%), seguido de cobertura vegetal em decomposição (31%), os maiores índices de recuperação de fungos dematiáceos. Os fungos dematiáceos são frequentemente isolados de madeira e material vegetal em decomposição. De acordo com Dixon *et al.* (1980), substratos vegetais e solo são adequados para o isolamento de gêneros dematiáceos patogênicos da natureza. Okeke *et al.* (1986), obtiveram uma alta freqüência de isolamento de *F. pedrosoi* a partir de diferentes materiais vegetais e da mesma forma, *P. verrucosa* foi isolada somente a partir de substrato vegetal. Ainda,

em relação aos dados apresentados na Tabela 7, os fungos isolados em menor frequência foram os pertencentes aos gêneros *Veronea* (6%), *Fonsecaea* (7%) e *Phialophora* (5%), sendo que para estes gêneros, o material vegetal em decomposição demonstrou ser o nicho de prevalência.

De acordo com a literatura (Chandler *et al.*, 1980; McGinnis, 1983; Rippon, 1988; Hoog *et al.*, 1995a), os fungos considerados agentes etiológicos da cromoblastomicose são frequentemente espécies do gênero *Fonsecaea*, *Cladophialophora* e *Rhinocladiella*. Sendo que na América do Sul o agente mais freqüente é o *Fonsecaea pedrosoi*, o qual vive saprofiticamente em solo, vegetais e matéria orgânica em decomposição.

A cromoblastomicose tem sido relatada como uma doença resultante de traumas cutâneos que introduzem o agente causal, presente na natureza, no tecido do hospedeiro (Gezuele *et al.* 1972). Diversos trabalhos de isolamento a partir de fontes ambientais (Klite *et al.*, 1965; Dixon *et al.*, 1980; Iwatsu *et al.*, 1981; Nishumura *et al.*, 1980), têm sido realizados visando identificar o habitat natural desses agentes e sua ecologia. Estes isolamentos indicam a existência sapróbia desses fungos em plantas, solo, madeira e matéria orgânica de origem animal e vegetal em decomposição.

Entre os isolados destacam-se os gêneros causadores de cromoblastomicose *Fonsecaea pedrosoi* (FE5P4; FE5P6; FCI2; FP8D; 9PRA, FE5II) e *Phialophora verrucosa* (FE5, FE3, 19PRC); no entanto outros isolados apresentaram características morfológicas semelhantes a fungos dematiáceos relacionados com feohifomicose, tais como, *Cladophialophora bantiana* (FE9), *C. arxii* (2PLA1), *C. devriseii* (Fp9), *Exophiala jeanselmei* (FE4, 14PL), *Veronea carbinae* (FB2C), além de gêneros como *Rhinocladiella*, *Ramichloridium*, *Exophiala*, *Cladophialophora* (Tabelas 4 e 6).

Durante o período de dois anos, realizando isolamento, verificou-se principalmente para o 1º planalto a existência de um período sazonal. Nos meses de maio a agosto, época de inverno rigoroso nestas regiões onde houve uma redução na frequência de isolamento; enquanto que durante os meses de maior precipitação e aumento da temperatura média o número de isolados cresceu gradativamente. Da mesma forma um estudo da ocorrência de fungos dematiáceos realizado nas praias do

Rio Amazonas, em Manaus (AM), revelou uma redução no número de fungos isolados no inverno em relação ao verão.

Neste trabalho foi investigada a possibilidade desses fungos ocorrerem de forma endofítica. De acordo com Carroll (1988) o termo endofítico é aplicado para organismos que causam colonizações assintomáticas em folhas e ramos de plantas saudáveis. A partir de um caso clínico relatado por Queiroz-Telles (1996), em Campo Largo - PR, onde o paciente desenvolveu a lesão após o ferimento com um capim cortante conhecido popularmente como “lambe-lambe” ou “lambedor” (Figura 9), surgiu o questionamento se o fungo dematiáceo não poderia estar colonizando tecidos internos da planta, uma vez que esta não apresentava nenhum sintoma evidente de colonização por fungos.



Figura 9. Capim “lambe-lambe”, folhas pilosas com margens ásperas, coletado no município de Campo Largo - PR (1º Planalto)

Após quinze dias de cultivo de acordo com a técnica para isolamento de fungos endofíticos (item 3.2), nenhum fungo dematiáceo foi verificado. Um isolado saprófita, o FC2 identificado como *Stachybotrys* (Tabela 4) foi obtido pela técnica do plaqueamento direto.

De acordo com a literatura, anamórficos Herpotrichiellaceos isolados de vegetais, por ex. *Ramichloridium anceps* (Sacc.) Hoog, de madeira, *Phialophora verrucosa* e *Fonsecaea pedrosoi*, de madeira em decomposição (Dixon *et al.*, 1980;

Iwatsu *et al.*, 1981) e *Cladophialophora carrioni* em cactus (Zeppenfeldt *et al.*, 1994), provocam cromblastomicose quando inoculados traumáticamente. Sendo assim, a inoculação traumática com um substrato em específico, pode revelar informações importantes, referentes a epidemiologia da doença. Portanto, um novo isolamento deverá ser realizado, uma vez que os dados observados não foram conclusivos

4.2. Identificação e caracterização biológica de fungos dematiáceos isolados de fontes ambientais

4.2.1. Morfologia

Isolados sapróbios de crescimento moderado com colônias de coloração esverdeadas a negras e reverso escuro foram verificados. Microscopicamente apresentavam hifas acastanhadas, septadas com esporulação do tipo *Cladosporium* caracterizada por cadeias de conídios elípticos, de tamanho variado de acordo com a espécie, sustentados por conidióforos eretos e ramificados (Figuras 10a, 11a e 11b). Espécies sapróbias de crescimento rápido, com conidióforos ramificados predominantes, são reunidas no gênero *Cladosporium* na família Mycosphaerellaceae da ordem Dothideales, enquanto que espécies com morfologias semelhantes, porém patogênicas, são acomodadas no gênero *Cladophialophora* da família Herpotrichiellaceae (ordem Chaetothyriales). Por exemplo, o agente etiológico da cromblastomicose *Cladophialophora carrioni* (ex *Cladosporium carrioni*) (Hoog *et al.*, 1995a). O gênero reúne espécies relacionadas com diferentes tipos de infecção, desde quadros clínicos subcutâneos, como no caso da cromblastomicose, até infecções sistêmicas (Haase *et al.*, 1999), e é considerado ecologicamente diferente do gênero *Cladosporium*, o qual compreende somente invasores de tecidos vegetal vivo e em decomposição (Ellis, 1971).

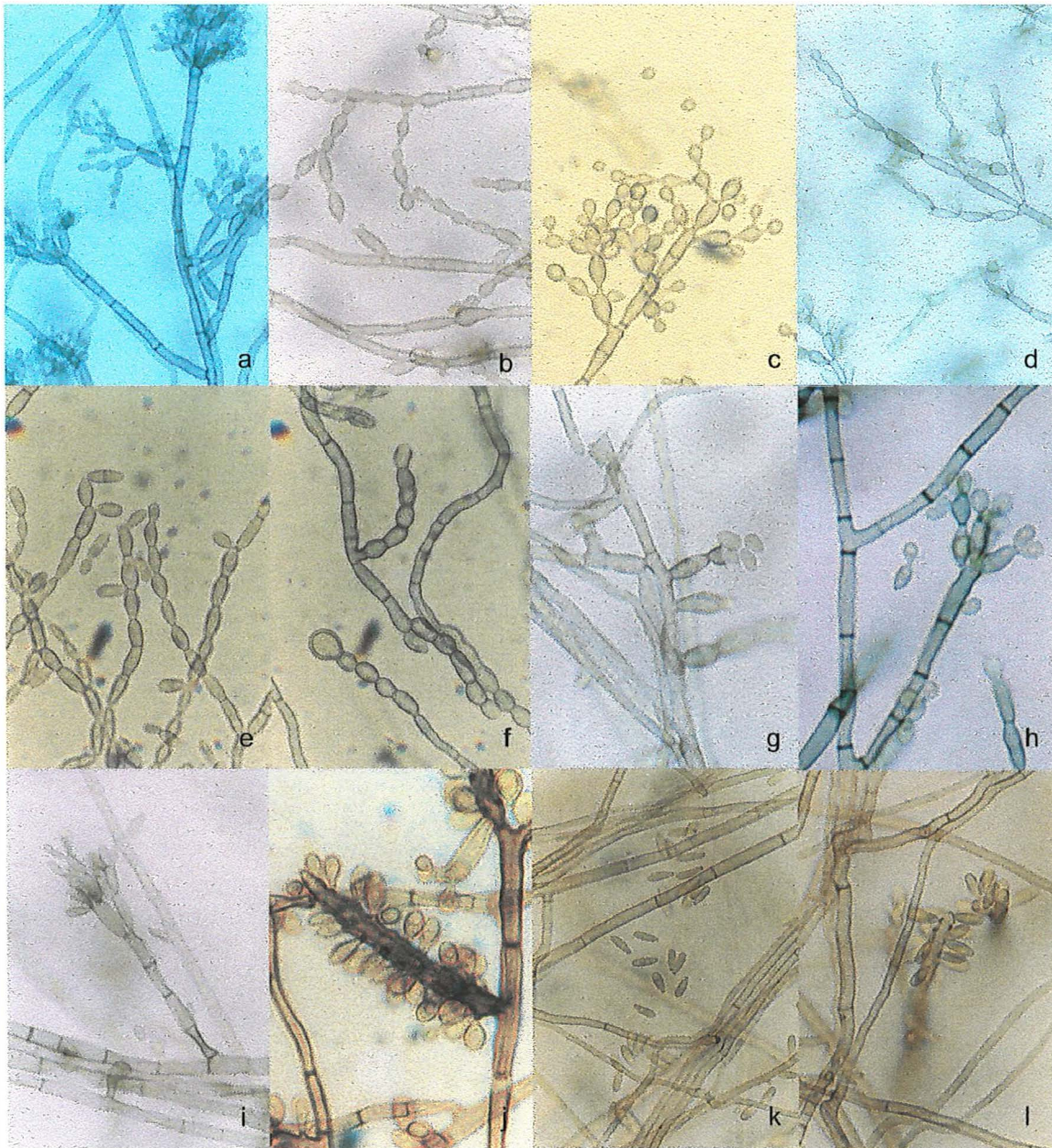


Figura 10. Características micromorfológicas dos isolados: a) *Cladosporium* - conídios elípticos produzidos em cadeias ramificadas, presença de cicatrizes escuras nos disjuntores; b) *C. bantiana*, longas cadeias de conídios, fusiformes e cilíndricos, com ramificação lateral; c) *C. devriseii*, conídios ovalados em cadeia, presença de dentículos; d) *C. arxii*, conidióforo ramificado formando pequenas cadeias de conídios em forma de limão; e) *Cladophialophora* sp, longas cadeias de conídios fusiformes à forma de

limão achatada; f) *Exophiala jeanselmei* var. *lecanii-corni*, conídios ovalados e em longas cadeias com presença de clamidosporos; g) *P. verrucosa*, presença de fiálides; h) *F. pedrosoi*, hifas septadas, formação de conídios primários e secundários a partir da célula conidiogênica; i) *Ramichloridium*, conidióforo ereto e conidióforo primário alongado; j) conidióforo acastanhado ereto com formação simpodial de conídios ovalados; k e l) *Veronea carbinae*, formação simpodial, conídios acastanhados arredondados no ápice e presença de cicatrizes na base; às vezes septados.

As culturas FE9 e F1PLF, apresentaram morfologia semelhante a *Cladophialophora bantiana*. Esta última possui conídios elipsoidais à fusiformes, algumas vezes com formas quase cilíndricas em cadeias longas, podendo, ainda, apresentar ramificação lateral (Figura 10b). Estudo de microscopia eletrônica, revelou alguns destes detalhes (Figura 11c).

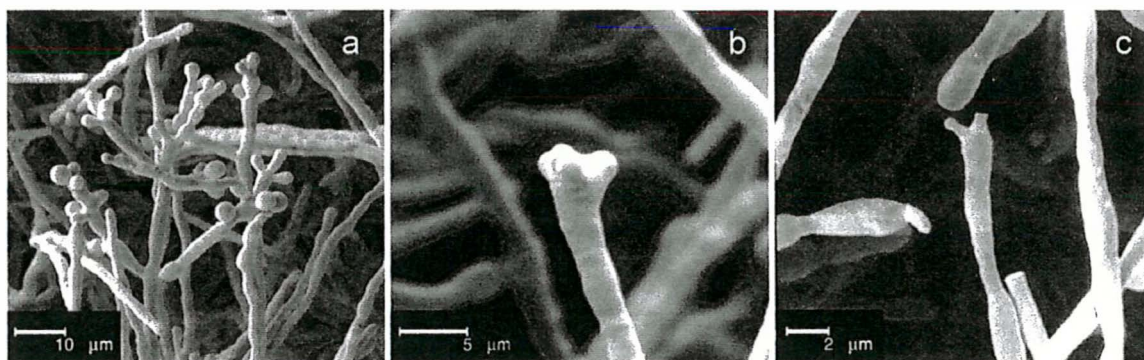


Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). a) Esporulação do tipo *Cladosporium* : conidióforo ramificado; b) denticúlos observados na conidiogênese do tipo *Cladosporium*; c) *Cladophialophora bantiana* cadeias com denticúlos.

Os isolados FE9 e F1PLF foram identificados como *C. bantiana* de acordo com a morfologia observada por MEV e Ótica. Esta espécie é considerada patogênica e de ocorrência ambiental. De acordo com Dixon *et al.* (1980) esta ocorre

no solo e pode ser isolada em meio seletivo contendo infusão de cérebro de animais. A espécie *C. bantiana* vem sendo relacionada com feohifomicose cerebrais em humanos (Bennett *et al.*, 1973; Sekvon *et al.*, 1992; Horr  & Hoog, 1999). Walz *et al.* (1997) relataram um caso de infec o do sistema nervoso central causada por *C. bantiana* em um brasileiro usuário de drogas.

O isolado FP9, apresentou morfologia semelhante   de *C. devriseii*, com conídios pequenos, ovalados arranjados em pequenas cadeias com denticulos (Figura 10 c). A presença de crescimento lento com colônias de colora o cinza olivácea e reverso preto, com hifas pigmentadas apresentando cadeias ramificadas de conídios de colora o marrom em forma de limão   fusiforme, foram observadas para o isolado F2PLA1 de *C. arxii* (Figura 10d). Estas espécies são consideradas agentes de feohifomicose (Padhye *et al.*, 1999). Os isolados FE1, FC4, F1PL, F3PL, F3PLD, FE1IIA e FE4IIA de *Cladophialophora* sp apresentavam longas cadeias de conídios fusiformes   forma de limão achatada (Figura 10e).

Na Figura 10f, pode-se observar a morfologia do isolado FE4IIB, identificado como *Exophiala jeanselmei* var. *lecanii-comi*. O gênero *Exophiala* pode apresentar crescimento inicialmente leveduriforme, porém com o tempo, a textura da colônia torna-se aveludada   lanosa, e a colora o oliv ceas   negra. Células conidiogênicas, cilíndricas com ou sem prolifera o percurrente podem estar presentes (Hoog e Guarro, 1995). O isolado acima apresentou colônia de crescimento restrito e textura aveludada, com hifas ramificadas, produzindo conídios por gemula o sucessiva distalmente. Além do mencionado acima, os isolados FE4IIB, FE6IIB e FP14PL foram identificados como tipo *Exophiala*, o que ficou evidenciado pelo estudo de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figuras 12a, 12b, 12c e 12d).

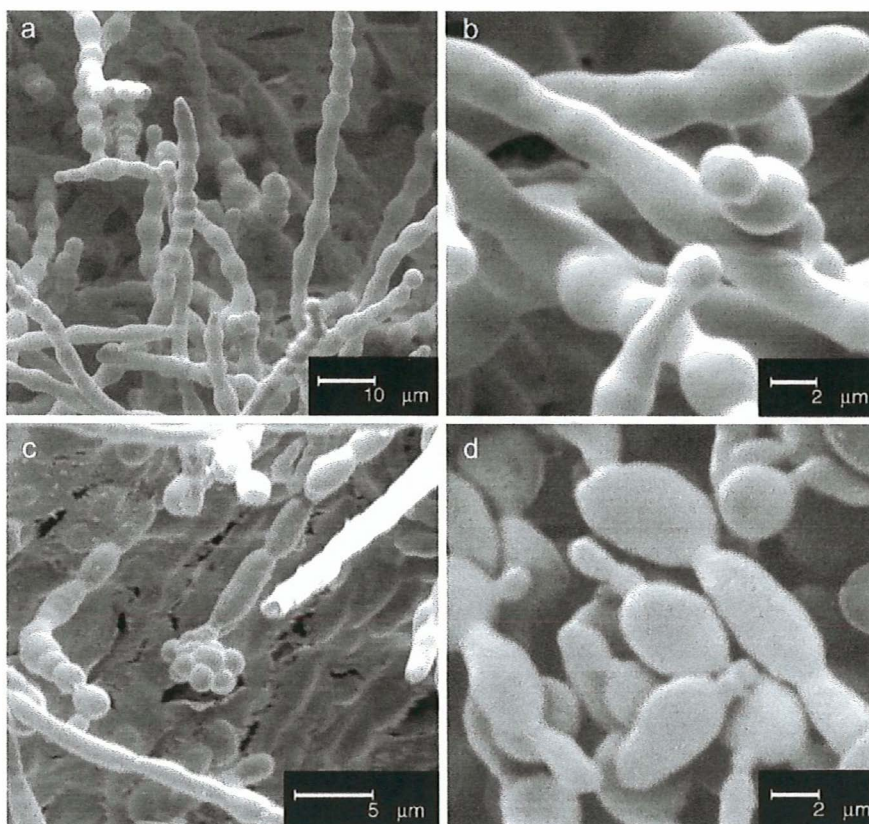


Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de isolados *Exophiala*: a) e b) longas cadeias de conídios arredondados formados por gemulação sucessiva ; c) conídios arredondados formados em fiálides; d) desenvolvimento leveduriforme, presença de células cilíndricas e gemulação sucessiva.

Exophiala e suas espécies relacionadas, constitui um dos principais gêneros do grupo das leveduras negras (Hoog & Guarro, 1995), com diversos casos clínicos desde infecções subcutâneas até o comprometimento do Sistema Nervoso Central (Hiruma *et al.*, 1993). O isolado FB6 de *Exophiala jeanselmei* foi obtido a partir de cobertura vegetal localizada na base de *Araucaria angustifolia*, onde vivia um paciente transplantado renal, portador de feohifomicose sistêmica. As características morfológicas do isolado podem ser visualizadas na Figura 13.



Figura 13. Observações de fiáldes com produção de conídios ovais do isolado FB6 de *Exophiala*, sob Microscopia Ótica (aumento 1000 vezes).

O gênero *Exophiala* inclui espécies patogênicas e sapróbias, isoladas de madeira, água poluída e solo (Hoog & Guarro, 1995). Hoog (1993) relaciona a capacidade de sobrevivência das espécies de *Exophiala* em condições extremas na natureza, como um dos fatores responsáveis para a adaptação em hospedeiros animais. Diversos desses agentes são considerados oportunistas (Hoog & Guarro, 1995; McGinnis *et al.*, 1999), principalmente por habitarem nichos ecológicos não animais e ocorrerem em tecidos humanos por coincidência. Existe uma diversidade de relatos de infecções a partir de inoculações por estes fungos (Abraham *et al.*, 1986; Hoog & Guarro, 1995) e também um aumento considerável no número de casos de micoses em pacientes imunodebilitados, tais como os submetidos a transplantes de órgãos, usuários de drogas, portadores de câncer e AIDS

O fungo *F. pedrosoi* (Brumpt) Negroni (1936), caracteriza-se pelo desenvolvimento de colônias de crescimento lento em meio dextrosado à temperatura ambiente. A colônia apresenta grande polimorfismo com micélio aéreo compacto de coloração variável (marrom escuro, verde oliva a negro), podendo apresentar crescimento sulcado e/ou radial. Microscopicamente apresenta esporulação do tipo *Cladosporium* e desenvolvimento simpodial com a presença de dentículos que podem

ser observados na extremidade da célula conidiogênica (Hoog & Guarro, 1995). O isolado FE5P4 foi identificado pelo macro e micro cultivo como *Fonsecaea pedrosoi* (Figuras 10h, 14A, 14B, 14C).

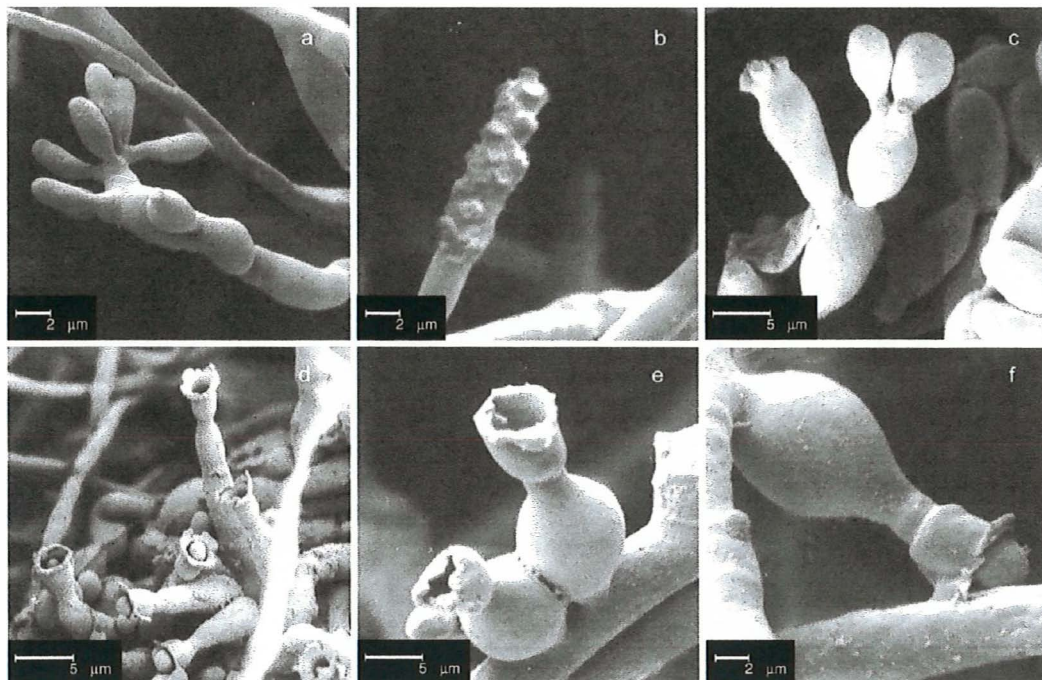


Figura 14. Fotomicrografias dos isolados FE5P4 de *Fonsecaea pedrosoi*: a) denticulo na conidiação do tipo simpodial, b) conidióforo, c) conidiogênese característica da espécie; e FE3 de *Phialophora verrucosa* : d) conidiogênese, e) fiálide com colarete, f) produção de conídios ovais.

O fungo *Fonsecaea pedrosoi* é caracterizado por apresentar esporulação variáveis do tipo *Cladosporium*, *Phialophora* e *Rhinocladiella*, condição denominada de sinanamórfico da espécie, e observada nos isolados de *Fonsecaea* (FCL2, FE5II e FE5P4) obtidos nesse trabalho. Acredita-se que ao longo da evolução do agente, genes para o desenvolvimento dessas formas, ainda se manifestam (Hoog *et al.*, 1988). Os detalhes de microscopia eletrônica de varredura do isolado *Fonsecaea pedrosoi* FE5P4, encontram-se nas Figuras 14a, 14b e 14c.

Para o isolado FE3 de *Phialophora verrucosa* foi verificada a presença de células conidiogênicas com um estreitamento da extremidade formando um colarete,

dentro da qual são produzidos os conídios e liberados externamente. O isolado FE3 reúne as características acima citadas (Figura 10g). Detalhes desta conidiogênese foram revelados pela MEV (Figuras 14d, 14e e 14f).

Células conidiogênicas do tipo *Phialophora* são produzidas em alguns fungos dematiáceos patogênicos, como em: *Fonsecaea pedrosoi*, *Exophiala dermatitidis* e *Cladophialophora carrioni*. Células conidiogênicas do tipo fialófora foram também observadas no isolado FCL2 de *Fonsecaea* sp (Figura 15).

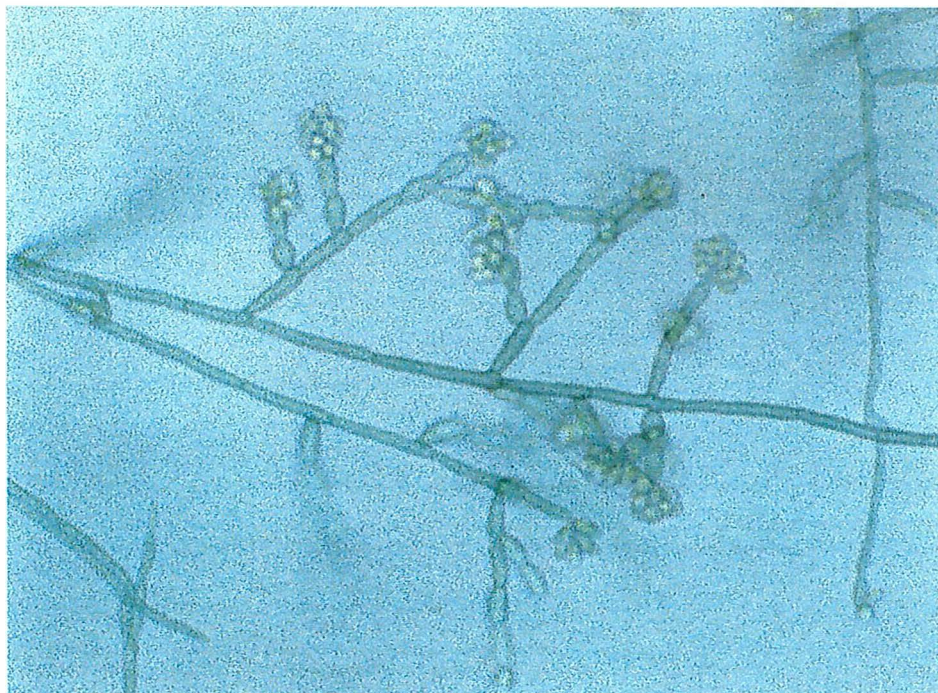


Figura 15. Observação ao Microscópio Ótico (400 vezes) do isolado FCL2, revelando a presença de fiálides, células conidiogênicas do tipo *Phialophora*.

De acordo com a literatura as espécies *F. pedrosoi* e *P. verrucosa*, tem sido consideradas agentes clássicos da cromoblastomicose (Dixon *et al.*, 1980; Iwatsu *et al.*, 1981; Hoog & Guarro, 1995; McGinnis, 1992), com relatos de espécies sapróbias (Iwatsu *et al.*, 1981; Dixon *et al.*, 1980; Gezuele *et al.*, 1972).

Espécies com conidiogênese simpodial predominante estão reunidas respectivamente dentro dos gêneros *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*. O isolado FE7,

foi caracterizado por apresentar conidióforos acastanhados e eretos, com formação de conídios primários alongados, como o observado na Figura 10i. A presença de hifas septadas acastanhadas com formação simpodial de conídios foram critérios adotados para a identificação dos isolados *Ramichloridium* sp (Figura 10j). O grupo *Ramichloridium* reúne poucas espécies, algumas de ocorrência ambiental e outras de importância clínica relacionadas com lesões fatais (Hoog & Guarro, 1995). Durante o isolamento efetuado no presente trabalho, foram verificados isolados com morfologia semelhante ao gênero *Ramichloridium*, as quais podem ser visualizadas via MEV e que estão apresentadas na Figura 16.

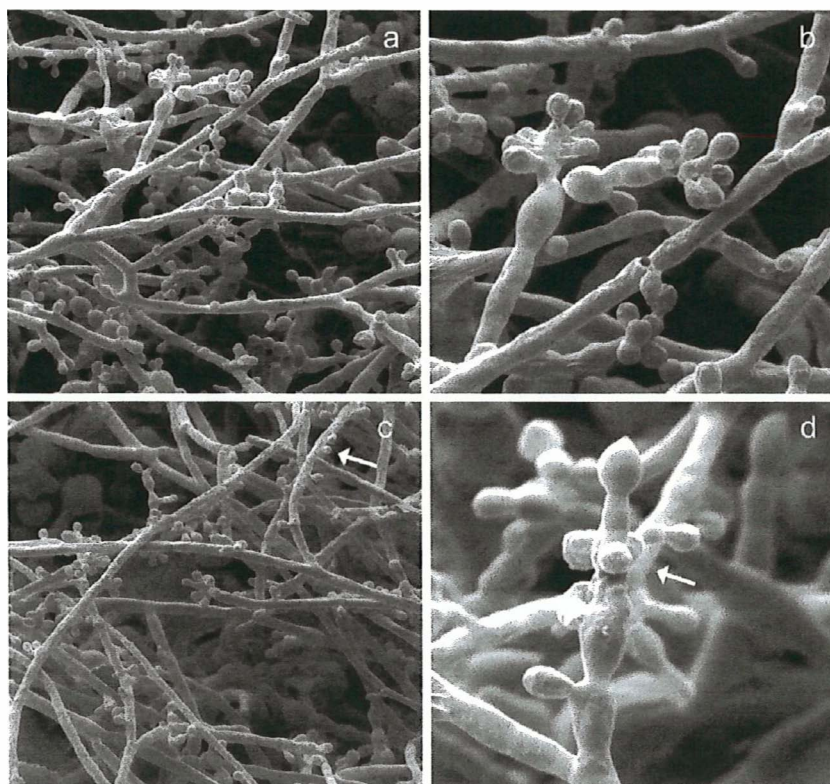


Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Ramichloridium* sp: a e b) conidiogênese, c) formação simpodial de conídios; d) presença de cicatrizes e dentículos distais.

A presença de células conidiogênicas usualmente terminal com conídios ovais pigmentados com presença de células conidiogênicas intercaladas, como o

observado na Figura 17 foram características morfológicas dos isolados 11PL e 20PR2 identificados como *Rhinocladiella* sp.



Figura 17. Conidiogênese terminal com conídios ovais característica de *Rhinocladiella* sp. Observada em Microscópio Ótico comum (1000 vezes).

Estes gêneros reúnem espécies patogênicas de humanos e de ocorrência ambiental. Por exemplo a espécie *Ramichloridium mackensiei* relatado como agente de lesões cerebrais, foi originalmente descrito a partir de húmus proveniente de florestas e madeira em decomposição (Hoog & Guarro, 1995). Da mesma forma as espécies do gênero *Rhinocladiella*, as quais ocorrem em madeira também encontram-se relacionadas com casos de infecção de sistema nervoso central, micetoma e cromoblastomicose (McGinnis & Schell, 1980).

Isolados de crescimento rápido, colônias aveludadas e tonalidade acinzentada caracterizam o isolado FB2C, assemelhando-o a *Veronea* (Figuras 10k e 10l). Observou-se também o desenvolvimento simpodial, com formação de conídios acastanhados, cilíndricos e septados, arredondados no ápice e truncados na base, e a presença de denticulos foi observada. Este gênero contém espécies descritas como sapróbias, porém Nishimura *et al.* (1983) descreveram um caso de infecção em pele causada por *V. botryosa*.

4.2.2. Caracterização do crescimento

A partir da morfologia, foi realizada uma seleção dos isolados para o estudo da fisiologia e caracterização molecular. O critério de seleção utilizado foi a variação morfológica dos diferentes agentes de interesse clínico identificados. Tais linhagens foram depositadas no Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, Holanda (Tabela 8).

Tabela 8. Fungos dematiáceos isolados de diferentes regiões do Estado do Paraná, depositados no CBS/Baarn/Holanda.

Isolado	nº CBS	Outros nº	Origem geográfica
<i>Fonsecaea</i> sp	dH11583	FCL2	Colombo
<i>Fonsecaea</i> sp	dH11584	F9PRA	Terra Roxa
<i>Fonsecaea</i> sp	dH11585	FE5P4	Colombo
<i>Fonsecaea</i> sp	dH11619	FE5P6	Colombo
<i>Fonsecaea</i> sp	dH11587	FE5II	Colombo
<i>Cladophialophora</i> sp	dH11588	FE9	Colombo
<i>Cladophialophora</i> sp	dH11589	FP4IIA	Piraquara
<i>Cladophialophora</i> sp	dH11590	FP8D	Piraquara
<i>Cladophialophora</i> sp	-	F8PRD	Toledo
<i>Cladophialophora</i> sp	dH11591	FP4IIB	Piraquara
<i>Cladophialophora</i> sp	dH11592	FE1IIA	Colombo
<i>Cladophialophora</i> sp	-	FP9	Piraquara
<i>Cladophialophora</i> sp	dH11621	F20PR3	Jacutinga
<i>Exophiala</i> sp	dH11594	FE4IIB	Colombo
<i>Exophiala</i> sp	dH11595	FE6IIB	Colombo
<i>Phialophora verrucosa</i>	dH11596	FE3	Colombo
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11597	F9PR	Terra Roxa
<i>Ramichordium/Rhino</i>	-	F9PRC2	Terra Roxa
<i>Ramichordium/Rhino</i>	-	F11PL	Telêmaco Borba
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11600	F11PLA	Telêmaco Borba
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11601	F10PLA	Telêmaco Borba
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11614	F10PLB	Telêmaco Borba
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11615	F3PLB	Pirai do Sul
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11616	F3PLC	Pirai do Sul
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11602	F1PLE	Rio Tibagi
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11603	FE1IIB	Colombo
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11617	FE10IIB	Colombo
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11618	FE10IIB1	Colombo
<i>Ramichordium/Rhino</i>	dH11604	F9PRC	Terra Roxa
<i>Exophiala jeanselmei</i>	dH11605	F14PL	Castro

Todos os isolados se desenvolveram-se em meio contendo ciclohexamida à temperatura de 28 e 37°C. Outros meios de cultura foram testados tais como OA, MEA, MM, BDA e Sabouraud. Os resultados estão sumarizados no Anexo A.

Em relação ao crescimento não foram verificadas diferenças no diâmetro médio das colônias analisadas para a maioria dos meios. Todos os isolados testados se desenvolveram de forma similar nos meios Sabouraud, MEA e BDA, apresentando um diâmetro médio de 5,1cm em 20 dias de crescimento às temperaturas de 28°C e 37°C respectivamente. Não foi verificado crescimento à 40°C para a maioria dos isolados, com exceção do isolado FP8D.(Anexo A)

De acordo com a literatura (Lacaz, 1984; Hoog & Guarro, 1995; Gams *et al.*, 1987) os meios aveia e o de batata são os mais indicados para o estudo de conidiogênese devido à indução da esporulação. Porém o meio BDA foi o selecionado neste estudo de conidiogênese, uma vez que neste meio, foram obtidos os melhores resultados na observação de lâminas.

Em meio mínimo, foi verificado um crescimento médio menor com características de crescimento residual para os diferentes isolados testados. Na Figura 18 pode-se observar as variações de crescimento obtidas no meio mínimo.

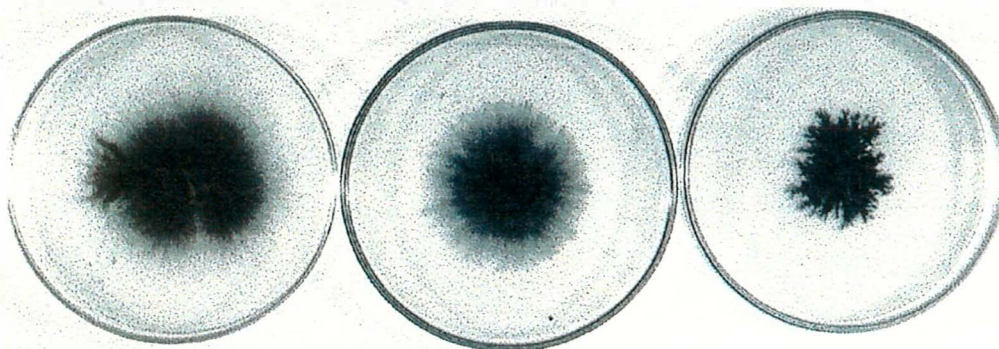


Figura 18. Crescimento em meio mínimo dos isolados: a) FE9; b) FE5P4; c) CBS 271.37.

Embora prototróficos, provavelmente fatores como vitaminas, aminoácidos e ácidos nucléicos sejam importantes no desenvolvimento destes fungos. Alviano *et al.*, (1992), verificaram a relação dos fatores de crescimento biotina e tiamina no desenvolvimento de fungos dematiáceos de interesse clínico. Tais agentes quando crescidos em meios ácidos com reduzidas concentrações destas substâncias, formaram corpos muriformes com maior facilidade, os quais aparentemente são formados apenas em condições ambientais extremas.

4.2.3. Testes Fisiológicos

A partir dos fungos depositados no CBS (Tabela 8), dezoito isolados foram selecionados para estudos fisiológicos e genéticos. O principal objetivo desta seleção, foi reduzir o número de amostras trabalhadas, procurando selecionar dentro das variações de morfologia, as de diferentes origens.

Para o estudo de testes fisiológicos foram utilizadas linhagens referência do CBS, apresentadas na Tabela 3 (item 3.5).

Para a leitura dos resultados da assimilação de carbono, nitrogênio, habilidades fermentativas, osmotolerância e termotolerância foi considerado como positivo (+) a presença de crescimento, negativo (-) ausência de crescimento e compostos não assimilados, (w) crescimento reduzido, enquanto que w+ e w- indicadores de um possível crescimento ou não em uma semana.

Testes de osmotolerância e tolerância a ciclohexamida foram avaliados, assim como o crescimento à 40°C. De acordo com a literatura (Sterflinger *et al.*, 1999; Hoog, 1997; Zalar *et al.*, 1999) a tolerância a fatores externos de crescimento pode ser um indicativo do potencial de adaptação destes agentes em tecido humano e conseqüentemente do potencial de patogenicidade. Ao mesmo tempo a tolerância à temperatura é um fator importante para distinção de espécies (de Hoog & Guarro, 1995).

A assimilação de arbutina e uréia foram testados em meio líquido e sólido, enquanto que a produção de DNase extracelular e atividade proteolítica foram avaliadas em meio sólido. Diversos autores (Ajello *et al.*, 1966; Nielson, 1974; Dixon *et al.*, 1980) relataram a correlação de ausência da atividade proteolítica "in vitro" com fungos patogênicos dematiáceos. Assim como a não produção de atividade DNase extracelular parece característica para a maioria dos dematiáceos anamórficos (Hoog *et al.*, 1999a; de Hoog *et al.*, 1999c) e teleomórficos (Untereiner *et al.*, 1999).

Dos 66 testes efetuados, 12 foram positivos para todos os fungos: D-glicose, D-galactose, L-arabinose, L-raminose, Maltose, Celobiose, Melisitose, D-manitol, Etilamina, L-lisina, Cadavenina e crescimento a 30°C, embora para algumas linhagens, um crescimento limitado (w) foi constatado.

Nenhuma linhagem mostrou-se capaz de fermentar a glicose, assimilar metanol e crescer à 40°C (com exceção do isolado FP8D), dados estes concordantes com os já descritos para a família *Herpotrichiellaceae* (Untereiner *et al.*, 1999). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 do Anexo B.

O isolado *Cladophialophora bantiana* (FE9), demonstrou capacidade de assimilação de etanol, lactose e citrato (Tabela 3, Anexo B). De acordo com Hoog & Guarro (1995), a assimilação mencionada é característica desta espécie, e conforme a chave de classificação estabelecida para espécies de *Cladophialophora* (de Hoog *et al.*, 1995a), o isolado FE9 apresentou características morfológicas e fisiológicas similares a *C. bantiana*. Entretanto, a ausência de crescimento à 40°C, não foi possível interpretação.

Para o isolado FP4IIB de *C. devriseii* foi verificado o crescimento em 0,1% de ciclohexamida, um crescimento reduzido em etanol (Tabela 3, Anexo B) e presença de conídios elípticos à fusiformes a partir de dentículos (Figura 10c), compatível com a chave de classificação estabelecida por de Hoog *et al.* (1995a) para *C. devriseii*. A temperatura máxima de crescimento observada para o isolado foi de 37°C.

O isolado FE1IIA identificado como *Cladophialophora* a partir da morfologia não foi capaz de assimilar galactiol apresentando um pobre crescimento em D-glucoronato e crescimento em etanol, com conídios fusiformes em cadeia (Figura 10f). Seguindo a chave de classificação (Hoog *et al.*, 1995) o isolado foi identificado como *C. bantiana*.

O grupo *Exophiala* é um dos grupos fisiologicamente mais definido dentro da família *Herpotrichiellaceae* (Hoog & Guarro, 1995). Os isolados (FE6IIB, 14PL e FE4IIB) morfológicamente identificados como *Exophiala*, foram considerados fisiologicamente muito próximos apresentando 92% de similaridade entre si (Tabela 3, Anexo B). O isolado FE4IIB de morfologia compatível à *E. jeanselmei* var. *lecaniicorni*, diferenciou-se da espécie referência, devido a assimilação positiva de lactose, L-arabinose, Mioinositol, D-glucoronato e DL-lactato. Também não foi compatível integralmente com *E. jeanselmei* var. *jeanselmei*, apresentando um crescimento reduzido para D-ribose, Salicina e Mioinositol, as quais são totalmente assimiladas por esta variedade. Além disso o isolado FE4IIB, possui habilidade de assimilar D-ribose e

D-glucoronato, não verificada para a variedade *Jeanselmei*. Portanto, fisiologicamente a linhagem ambiental apresentou morfologia típica de *E. Jeanselmei* var. *lecanii-corni*, com características fisiológicas distintas. O isolado F14PL, foi caracterizado pelo desenvolvimento leveduriforme, e de acordo com a chave do grupo (Hoog & Guarro, 1995), pode ser identificado como *Exophiala dermatitides*.

Comparando o isolado de *F. pedrosoi*, FE5P4, com linhagens referência, verificou-se que este não foi fisiologicamente idêntico à nenhuma das linhagens de *F. pedrosoi* utilizadas (Tabela 1, Anexo B). O isolado FE5P4, apresentou maior similaridade com as linhagens CBS 201,31 e CBS 242,34 (86,2%) diferindo em relação a assimilação de metil α -D-glicosídeo, melibiose, lactose, solução “starch”, mioinositol, succinato, etilamina, urease e tolerância a NaCl 5%. Sendo assim, verificou-se que embora morfologicamente o isolado seja muito similar as linhagens referência, do ponto de vista fisiológico, diferenças significativas foram verificadas. Quando o isolado sopróbio (FE5P4), foi comparado com linhagens patogênicas de pacientes (Tabela 4, Anexo B) os quais contraíram a infecção na mesma região do isolamento, verificou-se uma grande similaridade com os isolados Fp65 (92,4%) e Fp82 (95,34%). Da mesma forma a linhagem FP8D apresentou 100% de similaridade em relação à Fp82. É importante ressaltar que embora morfologicamente a linhagem apresenta-se semelhante a *Cladosporium* (Figura 10a), do ponto de vista fisiológico foi considerada extremamente próxima de *F. pedrosoi* isolada de paciente. O fungo FP8D foi isolado no local onde foi infectado o paciente portador de cromoblastomicose causada pela linhagem FP82. Tal fato sugere uma proximidade entre isolado do ambiente e de paciente.

O isolado de *F. pedrosoi* (FE5II) obtido no segundo isolamento realizado na EMBRAPA/CNPF, mostrou-se mais próximo das linhagens CBS 253.49 (92,3%) e CBS 444.62 (93,8%), as quais foram consideradas diferentes da linhagem FE5P4 do ponto de vista fisiológico.

A espécie de *P. verrucosa* (FE3) não assimilou glicose, ribose e inulina, porém demonstrou habilidade para a assimilação de L-lisina, compatível com as características fisiológicas relatadas para linhagens referência de *P. verrucosa* (Hoog *et al.*, 1999b).

Os gêneros *Ramichloridium* e *Rhinoctadiella* constituem um taxon relativamente pequeno (Hoog & Guarro, 1995), porém com uma grande variabilidade, dificultando a identificação por resultados clássicos como os morfológicos. A linhagem FE7 (Tabela 2, Anexo B), foi considerada um *Ramichloridium*, porém a delimitação de espécie não foi possível com dados morfológicos. Pela análise fisiológica verificou-se que o isolado apresentou um crescimento limitado (w) em D-xilose, L-arabinose, maltose, celobiose, D-glucitol e D-manitol, enquanto que as linhagens referência foram positivas. O isolado do ambiente apresentou 60% de similaridade em relação as linhagens referência.

Os isolados 9R, 11PL, 9PRC, FE10IIB, 1PLE, 10PLA foram incluídos, de acordo com a morfologia, no grupo *Ramichloridium*. Todos os indivíduos deste grupo isolados do ambiente, foram negativos quanto a assimilação de inulina, característica praticamente constante para as linhagens referência dentro do grupo, com exceção de duas linhagens CBS 264.49 e a CBS 380.59 (*Rhinoctadiella atrovirens*). Entre as amostras ambientais e de referência analisadas foi verificado a assimilação positiva das fontes D-glucose, D-galactose, D-xilose, L-araminose, maltose, sucrose e trealose (com exceção da linhagem CBS 685.76 *R. atrovirens*, sucrose negativa), celobiose, melitose, mesoeritritol, ribitol (com exceção para os isolado 9R, 9PRC, 1PLE os quais apresentaram assimilação limitada, w-), D-glucitol e D-manitol (sendo que D-glucitol foi as vezes encontrado como “w”).

Em relação ao nitrato, todas as linhagens de *Ramichloridium* foram capazes de assimilar este substrato como fonte de nitrogênio. No entanto, algumas linhagens de *Rhinoctadiella* apresentaram assimilação limitada (CBS 380.59) ou ausência de assimilação (CBS 685.76; CBS 264.89).

Todos os fungos deste grupo foram incapazes de fermentar glicose, assimilar etanol e de crescer à 40°C. A maioria das linhagens referência foram citrato negativa (-), enquanto que uma assimilação limitada (w e ou w/-) foi verificada para os isolados do ambiente. Nenhuma das linhagens analisadas foi considerada produtora de DNase extracelular. De acordo com os testes realizados, os isolados do ambiente apresentaram-se mais próximos das linhagens referência de *Ramichloridium*. Os isolados 9PR e 9PRC parecem muito próximos, diferindo-se apenas em relação a

assimilação de glicerol e L-lisina. As linhagens 11PLA e 10PLA diferiram-se apenas em relação a assimilação de creatinina. A morfologia dos isolados deste grupo não ofereceu subsídios suficientes juntamente com os dados fisiológicos, para estabelecer uma delimitação de espécie, mas são dados importantes e complementares aos métodos moleculares, também analisados no presente trabalho para tal finalidade.

4.4. Teste de patogenicidade dos isolados

Foram realizados dois testes de patogenicidade utilizando camundongos machos do tipo BalbC, imunologicamente não reprimidos. Para o teste, foram utilizados os isolados de *Fonsecaea pedrosoi* (FE5P4), *Phialophora verrucosa* (FE3), *Cladophialophora bantiana* (FE9), *F. pedrosoi* (Fp82), *F. pedrosoi* (Fp65), *F. pedrosoi* (271.37 CBS).

No primeiro teste realizado, foi verificada a presença de ulcerações no local do inóculo (Figura 19), para os isolados FE9 e FE5P4, as quais não foram reproduzidas nas amostras controle. Sendo assim, os resultados considerados negativos foram questionados (Fp82, Fp65 e CBS 271.37).

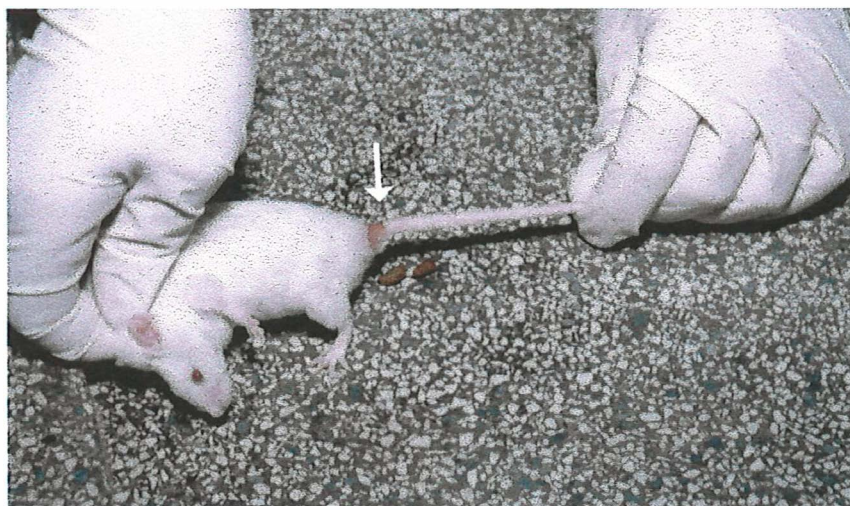


Figura 19. Lesões (indicadas pela seta) em camundongos do tipo Balb C, produzidas a partir do inóculo dos isolados FE5P4 de *F. pedrosoi* e FE9 de *C. bantiana*.

Os animais com manifestações clínicas aparentes foram sacrificados e realizados exames diretos e necrópsia. Corpos acastanhados raros foram observados

em exames diretos para a amostra FE5P4, porém não foi verificada a presença de corpos muriformes em análises histopatológicas. Portanto não foi possível confirmar a patogenicidade desses isolados pelo teste efetuado.

Um segundo ensaio de patogenicidade foi realizado, onde os isolados testados foram inicialmente repicados em Ágar Sangue e então inoculados. O principal objetivo deste procedimento era estimular o potencial patogênico dos isolados pelo contato prévio com tecido animal (sangue de coelho).

Após 5 semanas do inóculo inicial, foi registrada a morte de um dos camundongos, inoculado com a linhagem FE5P4 (Figura 20).

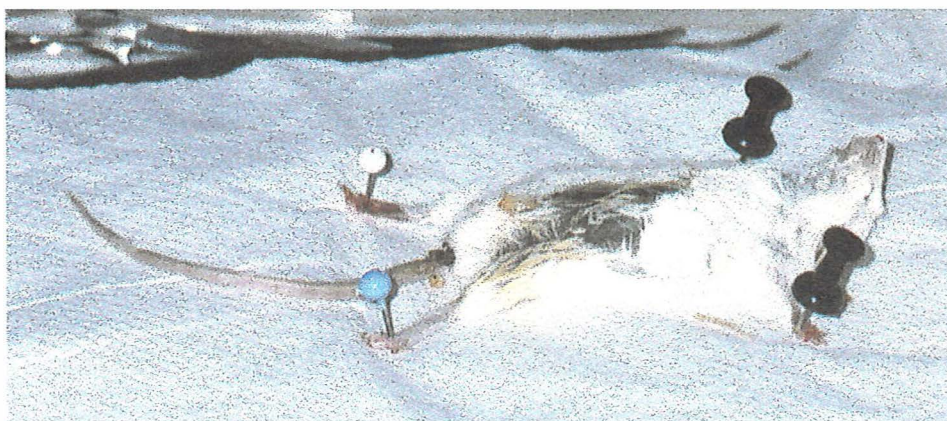


Figura 20. Teste de patogenicidade com a linhagem sapróbia FE5P4. Camundongo morto após 5 semanas do inóculo.

O camundongo morto, apresentava um estágio avançado de putrefação, com hifas do fungo disseminadas por todo organismo. Provavelmente, o inóculo realizado na base da cauda parece ter sido o responsável pela disseminação do agente. O fato da disseminação ter ocorrido somente para um dos animais inoculado, indica que o inóculo pode ter avançado além da região subcutânea e portanto a disseminação foi desconsiderada.

Lesões de base avermelhada associadas à um processo inflamatório foi observado no local de inóculo para os isolados FE9 e FE5P4 e as linhagens Fp82 e

Fp65. A análise histopatológica revelou a presença de células gigantes e granulomas, com processo inflamatório presente, porém elementos fúngicos não foram observados.

4.5. Produção de corpos muriformes “in vitro”

As linhagens FE3, FE5P4, FE9, Fp82, Fp65 e CBS 271.37 foram analisadas, quanto a produção de corpos muriformes “in vitro”, de acordo com a metodologia utilizada por Alviano *et al.* (1992). Após 20 dias da inoculação em meio CD (item 3.1.12), foram observadas células em estágio de diferenciação para todas as linhagens (Figura 21). Morfologia semelhante ao desenvolvimento relatado foi indicado pelos autores como um pré-estágio na formação dos corpos muriformes “in vitro”.

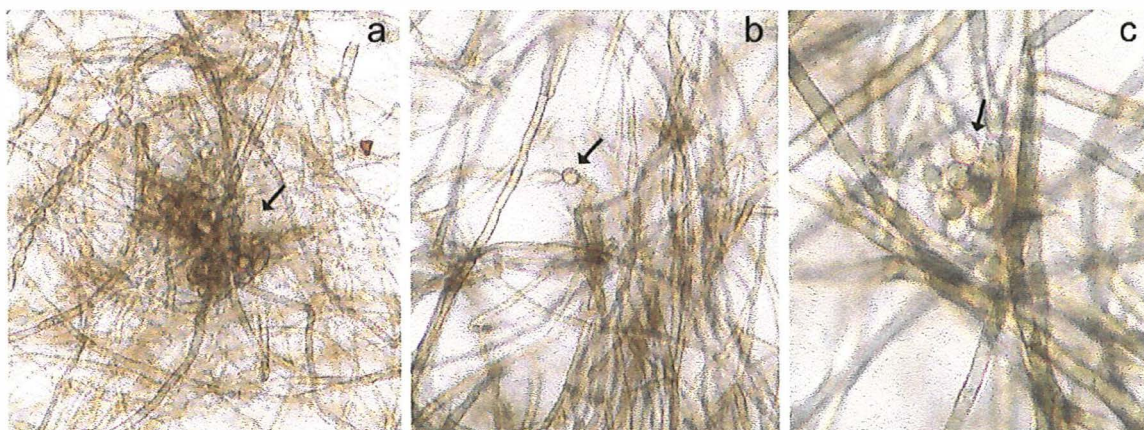


Figura 21. Observação da diferenciação de hifas para formação de corpos muriformes “in vitro” sob Microscopia Ótica. a) hifas catenuladas com formação de corpos arredondados (400X); b) corpos arredondados acastanhados (400X); c) corpos arredondados (1000X).

Em seguida o micélio crescido durante 20 dias em meio CD (item 3.1.12), em estágio de desenvolvimento para a formação de corpos muriformes foram inoculados em BF (item 3.1.13). Após 10 dias de inoculação foram observadas células com maior grau de diferenciação.

A produção de corpos muriformes (forma parasitária) pode ser induzida em meios de pH ácido na presença de propranolol (Alviano *et al.*, 1992) ou Ca^{+2} (Mendoza

et al., 1993), possibilitando a diferenciação de espécies patogênicas, ou seja, com potencial para o desenvolvimento das formas parasitárias e ainda, demonstrando o papel do cálcio e da acidificação do meio, no dimorfismo destes agentes. A acidificação do meio parece interromper o crescimento apical da hifa e favorecer pela presença do cálcio, a diferenciação celular devido ao aumento da taxa de divisão celular. Sendo assim, os isolados analisados demonstraram-se diferenciar na presença de pH reduzido. Estes resultados demonstram o potencial destes para a formação de corpos muriformes “in vitro”.

4.6. Caracterização molecular dos isolados

Com o objetivo de comparar geneticamente os isolados do ambiente em relação à linhagens tipo referência, visando uma identificação e taxonomia mais refinada, foi realizado um estudo molecular baseado em seqüências ITS1, ITS2 e 5.8S e marcadores de RAPD.

De acordo com a identificação realizada a partir da morfologia e fisiologia verificou-se o isolamento de espécies sopróbias morfologicamente compatíveis com fungos dematiáceos de interesse clínico. Sendo assim, foi realizado uma seleção baseada na morfologia, relação com patogenicidade e origem geográfica, visando principalmente o estudo das relações filogenética desses agentes.

4.6.1. PCR – Gene Específica

A partir da amplificação com os “primers” específicos, V9D e LS266, a regiões dos domínios variáveis do DNAr, foram obtidos “amplicons” de aproximadamente 1.000 à 1500 pares de base (Figuras 22A, 22B, 22C e 22D).

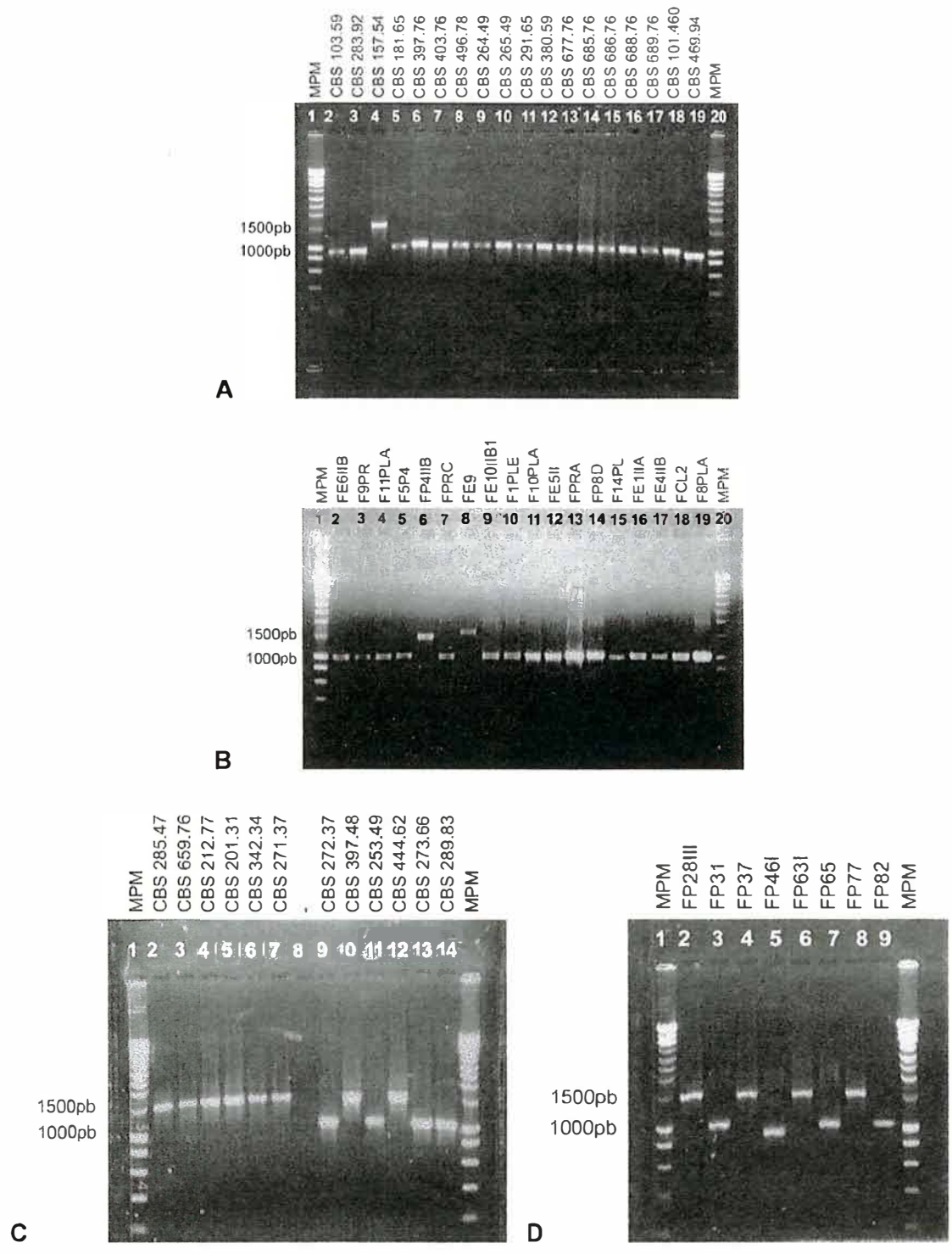


Figura 22. Produtos de amplificação com os “primers” VG9 e LS266. A) 1 e 20 marcador de peso molecular (“Ladder” 200pb), 2 a 19 linhagens referência

Ramichloridium e *Rhinocladiella*; B) 1 e 20 marcador de peso molecular, 2 a 19 isolados do ambiente; C) 1 e 15 marcador de peso molecular, 2 a 14 linhagens referência *F. pedrosoi*; D) 1 e 10 marcador de peso molecular, 2 a 9 linhagens *F. pedrosoi* de pacientes.

A variação observada deve-se a ocorrência de um inserto de aproximadamente 480pb, na subunidade menor 18S (SSU) do DNAr, nas linhagens, F11PLA, FP4IIB, CBS 157.54, CBS 285.47, CBS 659.76, CBS 212.77, CBS 201.31, CBS 342.34, CBS 271.37, CBS 397.48, CBS 444.62, Fp28III, Fp37, Fp63I e Fp77, (Figuras 22A, 22B, 22C e 22D). A localização do inserto foi verificada a partir de PCR-específica utilizando os pares de “primers” ITS5-4 e ITS1-4 (Figuras 23A e 23B) e seqüenciamento do fragmento amplificado com o “primer” ITS5 (Anexo C).

Ausência de produtos de amplificação para algumas linhagens contendo “introns” (CBS 253.49, CBS 201.31, FE9, CBS 157.54, CBS 397.48, CBS 285.47, CBS 342.34, CBS 659.76 e Fp28III), foi verificada quando utilizou-se o conjunto de “primers” ITS5-ITS4 (Figura 23A). Neste caso, provavelmente, a inserção pode ter ocorrido na região específica do sítio de ligação do “primer” ITS5, pois, produtos de amplificação foram obtidos utilizando os “primer” ITS1-ITS4 (Figura 23B). Indicando assim, a relação da inserção nos domínios variáveis da região 18S, uma vez que não foi verificado problemas de amplificação com o “primer” ITS4.

Nas linhagens portadoras de “introns”, que amplificaram com os “primers” ITS5-ITS4, como o observado para a CBS 212.77 na Figura 23A, o seqüenciamento com o “primer” ITS5, revelou irregularidades, seqüências com interferência (“noises”), a partir da posição correspondente a 480pb na fita complementar (de seqüência normal correspondente ao fragmento de 680pb obtido com o “primer” ITS4) não permitindo assim, a obtenção de seqüência consenso das regiões ITS e 5.8S.

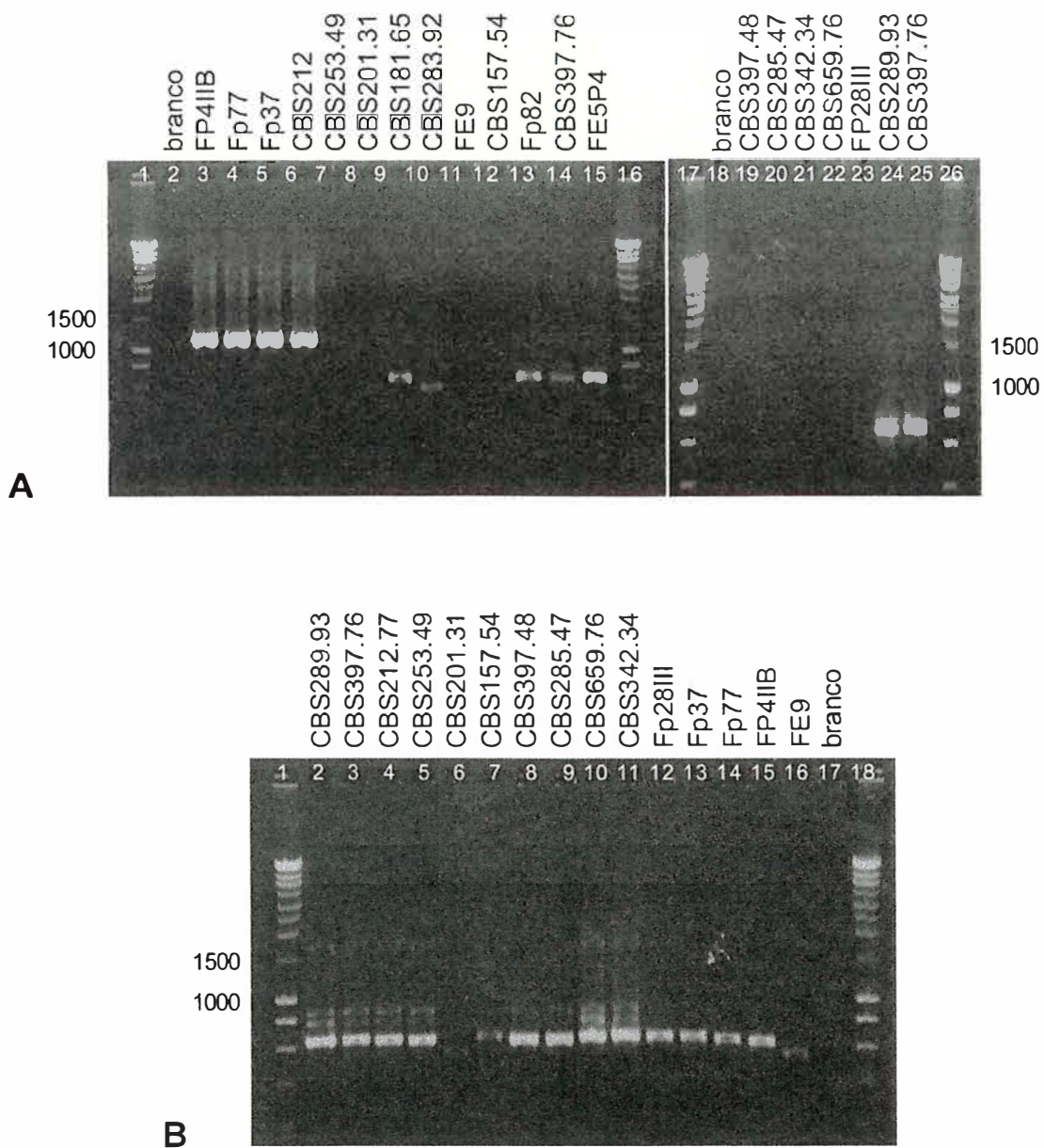
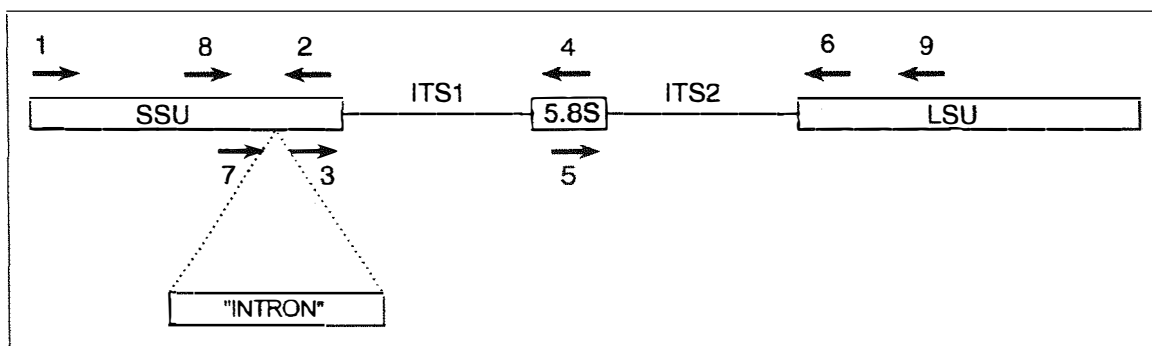


Figura 23. A) Amplificação com os “primers” ITS5-ITS4. 1,16 ,17, 26 marcador de peso molecular (“Ladder” 200pb); 2 e 18 branco; 3 a 8, 11,12, 19 a 23 linhagens com “intron”; 9,10, 13 a 15, 24, 25 sem “intron”. B) produtos de amplificação com os “primers” ITS1-ITS4. 1 e 18 marcador de peso molecular, 2 linhagem sem “intron”, 4 a 16 linhagem com “intron”, 17 branco.

De acordo com o observado no Anexo C, a seqüências dos “amplicons” gerados com o “primers” ITS5 revelava a presença de um inserto de aproximadamente 450pb, entre os sítios de ligações dos “primers” ITS5 e ITS1, no domínio variável da região 18S. Tal evento justifica a obtenção de “amplicons” com o par de “primers” ITS5-ITS4 observados para as linhagens CBS 212.77, Fp77, Fp37 e FP4IIB (Figura 21A) e a não obtenção das seqüências consenso (5'-3'/3'-5') pois devido ao inserto foi seqüenciado somente a região ITS1 e parte da região 5.8S (envolvendo aproximadamente 480 pb).

Portanto, a causa da não amplificação com os “primers” ITS5-4 para as linhagens CBS 253.49, CBS 201.31, FE9, CBS157.54, CBS 397.58, CBS 285.47, CBS 342.34, CBS 659.76, Fp28III portadoras de “introns”, foi a provável localização do inserto, que pode ter ocorrido dentro do sítio de ligação do “primer” ITS5. Neste caso também não foi obtido seqüências a partir de ITS5.

Na Figura 24, pode-se observar a posição dos “primers” dentro das subunidades maior e menor do DNA ribossômico e a representação esquemática do provável ponto de inserção dos fragmentos seqüenciados apresentados no Anexo C.



Adaptação: Hoog & Gerrits van den Ende (1998)

Figura 24. Representação gráfica dos sítios específicos de ligação dos “primers” ITS4 e ITS5, V9D e LS266 e suas localizações dentro do DNAr e a provável localização do “intron” dentro do domínio variável da sub-unidade menor 18S do DNAr, verificado nas linhagens CBS 212.77, Fp77, Fp37 e FP4IIB.

As seqüências dos “primers” e os sítios específicos para a amplificação das regiões 18S, ITS e 28S estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Seqüência e posições específicas dos “primers” para a amplificação dos diferentes domínios do DNAr.

“Primer”	Seqüência 3'→5'	Posição*	Referências
1. NS1	gTA gTC ATA TgC TTg TCT C	SSU 20-38	White <i>et al.</i> (1990)
2. NS2	AAA CCT TgT TAC gAC TTT TA	SSU 1769-1750	Gargas & Taylor (1992)
3. ITS1	TCC gTA ggT gAA CCT gCg g	SSU 1768-1787	White <i>et al.</i> (1990)
4. ITS2	GCT gCg TTC TTC ATC gAT gC	5.8S 50-31	White <i>et al.</i> (1990)
5. ITS3	gCA TgC ATg AAg AAC gCA gC	5.8S 31-50	White <i>et al.</i> (1990)
6. ITS4	TCC TCC gCT TAT TgA TAT gC	LSU 69-50	White <i>et al.</i> (1990)
7. ITS5	ggA AgT AAA AgT CgT AAC AAg g	SSU 1745-1767	White <i>et al.</i> (1990)
8. V9D	TTA AgT CCC TgC CCT TTg TA	SSU 1610-1629	Hoog & Gerrits van den Ende (1998)
9. LS266	gCA TTC CCA AAC AAC TCg ACT C	LSU 287-266	Masclaux <i>et al.</i> (1995)

* A posição do “primer” é relativa à *Saccharomyces cerevisiae*.

Conforme observado na Tabela 9, estudos envolvendo PCR-Gene específica poderão ser realizados, visando a obtenção de fragmentos de amplificação a partir dos “primers” NS1 e NS2, cujas seqüências consenso da região variável poderão levar a definição do elemento de inserção encontrado nas linhagens estudadas neste trabalho.

De acordo com o relatado por Hoog *et al.* (1998), a partir de uma comparação estatística entre patógenos humanos e sapróbios de diversas famílias e ordens do reino Fungi, tais “introns” são relativamente freqüentes na família Herpotrichiellaceae, assim como, parece existir uma relação estreita destes elementos com linhagens neurotrópicas de espécies *E. dermatitidis* e *C. bantiana*. Um grande número de classes desses “introns” foi seqüenciado por Haase *et al.* (1999), em membros da família Herpotrichiellaceae. A especificidade de um “intron” de posição 1.768 SSU para espécies neurotrópicas e sapróbias de *C. bantiana* parece demonstrar a relação destes elementos com a evolução rápida para a patogenicidade verificada neste taxon. Guerrits van der Ende & Hoog (1999) propuseram um diagnóstico

molecular para esta espécie, utilizando o “primer” específico gerado das seqüências “introns”.

O isolado sapróbio FE9 de *C. bantiana* demonstrou a presença de um “intron” na região variável da sub-unidade 18S. Testes de patogenicidade realizados em camundongos não foram conclusivos, porém, a linhagem foi capaz de produzir células diferenciadas para obtenção de corpos muriformes “in vitro” (item 4.5), indicando assim, o potencial patogênico do isolado sapróbio, uma vez que tais fatores estão diretamente correlacionados com o aparecimento da doença em tecido animal. É importante ressaltar a presença de “intron” no isolado FP4IIB também identificado como *Cladophialophara* sp.

4.6.2. Seqüenciamento

Seqüências de aproximadamente 640pb envolvendo as regiões 5.8S, ITS1 e ITS2 de 34 linhagens, entre elas linhagens referência de *Fonsecaea* e *Ramichloridium* e isolados sapróbios (Tabela 10), foram obtidas a partir dos produtos de amplificação com os pares de “primers” V9D e LS266. O alinhamento para os diferentes domínios pode ser visualizado no Anexo D. De acordo com o alinhamento foram observadas variações nos tamanhos de fragmentos para os domínios ITS1, ITS2 e 5.8S (Tabela 10). Subsequente análise das seqüências alinhadas foi obtida pelo método “neighbor-joining”, possibilitando a distinção de pelo menos 11 grupos, observados na árvore filogenética apresentada na Figura 25.

Tabela 10. Lista das linhagens analisadas, indicando a fonte e a origem geográfica do isolamento, os agrupamentos obtidos a partir do alinhamento das seqüências das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S e as variações de tamanho dos fragmentos destes domínios.

Linhagens número	Espécies	Fonte/ Origem geográfica	Grupos	ITS 1 (pb)	5.8 S (pb)	ITS 2 (pb)
212.77	<i>F. compacta</i>	Cromoblastomicose/Holanda	11	204	160	189
101.460	<i>R. anceps</i>	Pele Humana/Japão	6	195	159	174
677.76	<i>R. atrovirens</i>	Pele Humana/ ?	6	197	159	182
272.37	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	? / ?	11	204	160	189
Fp77II	<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/Paraná	11	204	160	190
Fp28III	<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/Paraná	11	204	160	190
271.37	<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/A. do Sul	2	204	160	190
253.49	<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/Uruguai	10	205	160	190
201.31	<i>F. pedrosoi</i>	Antilope/Líbia	10	205	160	190
659.76	<i>F. Compacta</i>	Cromoblastomicose/Venezuela	1	205	160	190
Fp63I	<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/Paraná	10	204	160	190
444.62	<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/Suriname	3	205	160	188
Fp8D	<i>Cladophialophora</i> sp.	Solo/Paraná	9	203	160	188
Fp65	<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/Paraná	9	202	160	189
Fp82	<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/Paraná	9	203	160	189
F1PLE	<i>Rhamichloridium</i> sp.	Solo/Paraná	9	205	160	189
FE5P4	<i>F. pedrosoi</i>	Veg. em decomposição/Paraná	9	205	160	189
F10PLA	<i>Cladophialophora</i> sp.	Cobertura vegetal/Paraná	8	198	160	178
FE9	<i>Cladophialophora</i> sp.	Vegetal Paraná	8	204	160	178
FP4IIB	<i>Rhamichloridium</i> sp.	Cobertura Vegetal/Paraná	8	205	160	179
FE10IIB1	<i>Rhamichloridium</i> sp.	Veg. em decomposição/Paraná	8	194	161	177
FE5II	<i>Fonsecaea</i> sp.	Veg. em decomposição/Paraná	8	196	161	178
F9PRA	<i>Fonsecaea</i> sp.	Vegetal/Paraná	8	196	154	177
F11PLA	<i>Rhamichloridium</i> sp.	Veg. em decomposição/Paraná	4	194	160	178
157.54	<i>R. anceps</i>	Vegetal/França	7	189	159	187
181.65	<i>R. anceps</i>	Solo/Canadá	7	190	159	184
496.78	<i>R. phaephorasoi</i>	Solo/Colômbia	7	193	161	186
403.76	<i>R. anceps</i>	Veg. em decomposição/Rússia	7	189	159	178
380.59	<i>R. atrovirens</i>	Vegetal/Canadá	5	195	159	179
688.76	<i>R. atrovirens</i>	Vegetal/Austrália	5	195	159	179
689.76	<i>R. atrovirens</i>	? /Inglaterra	5	195	159	180
685.76	<i>R. atrovirens</i>	Vegetal/Canadá	5	195	159	180
397.76	<i>R. anceps</i>	Vegetal/Czechoslováquia	6	203	159	203
283.92	<i>R. cerophilum</i>	Solo/Brasil	5	155	157	145

Abreviaturas: ? – Dados não fornecidos; Veg. – Vegetal; *R. anceps* – *Ramichloridium anceps*, *R. atrovirens*

– *Rinocladia atrovirens*

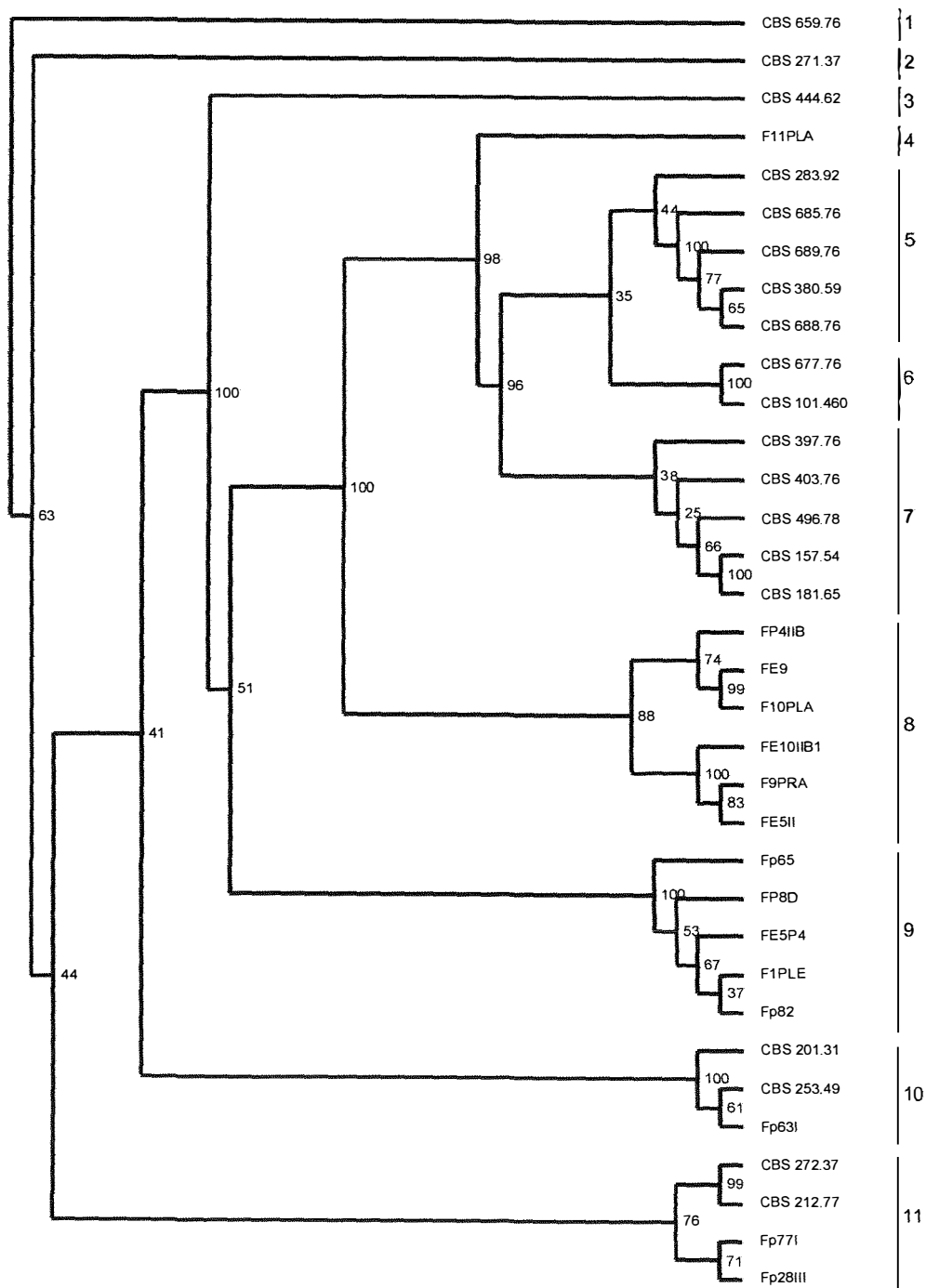


Figura 25. Árvore filogenética desenhada pelo método “neighbor-joining”, programa “PHYMLIP” (Felsenstein,1993) a partir das seqüências apresentadas no Anexo D. As distâncias foram calculadas pelo método Jukes & Cantor (1969) utilizando 100 reamostragens de “bootstrap”.

De acordo com as seqüências, foi verificada uma maior variabilidade para as regiões ITS em relação a subunidade 5.8S do DNAr (Anexo D). A região 5.8S do DNAr é conservada e portanto raramente utilizada em estudos genéticos. Entretanto, Hershkovitz & Lewis em 1996, enfatizaram a presença considerável de informação filogenética neste gene. Árvores filogenéticas de fungos baseadas em seqüências 5.8S apresentaram a mesma topologia gerada por outros genes ribossômicos. De acordo com Morales *et al.* (1993), as distâncias taxonômicas devem ser suficientes para se obter grupos estatisticamente definidos. Tal evidência foi verificada em diferentes grupos de fungos (Cullings & Vogler, 1998), assim como em gêneros (Belloch *et al.*, 1998) e espécies relacionadas (Mitchell *et al.*, 1992).

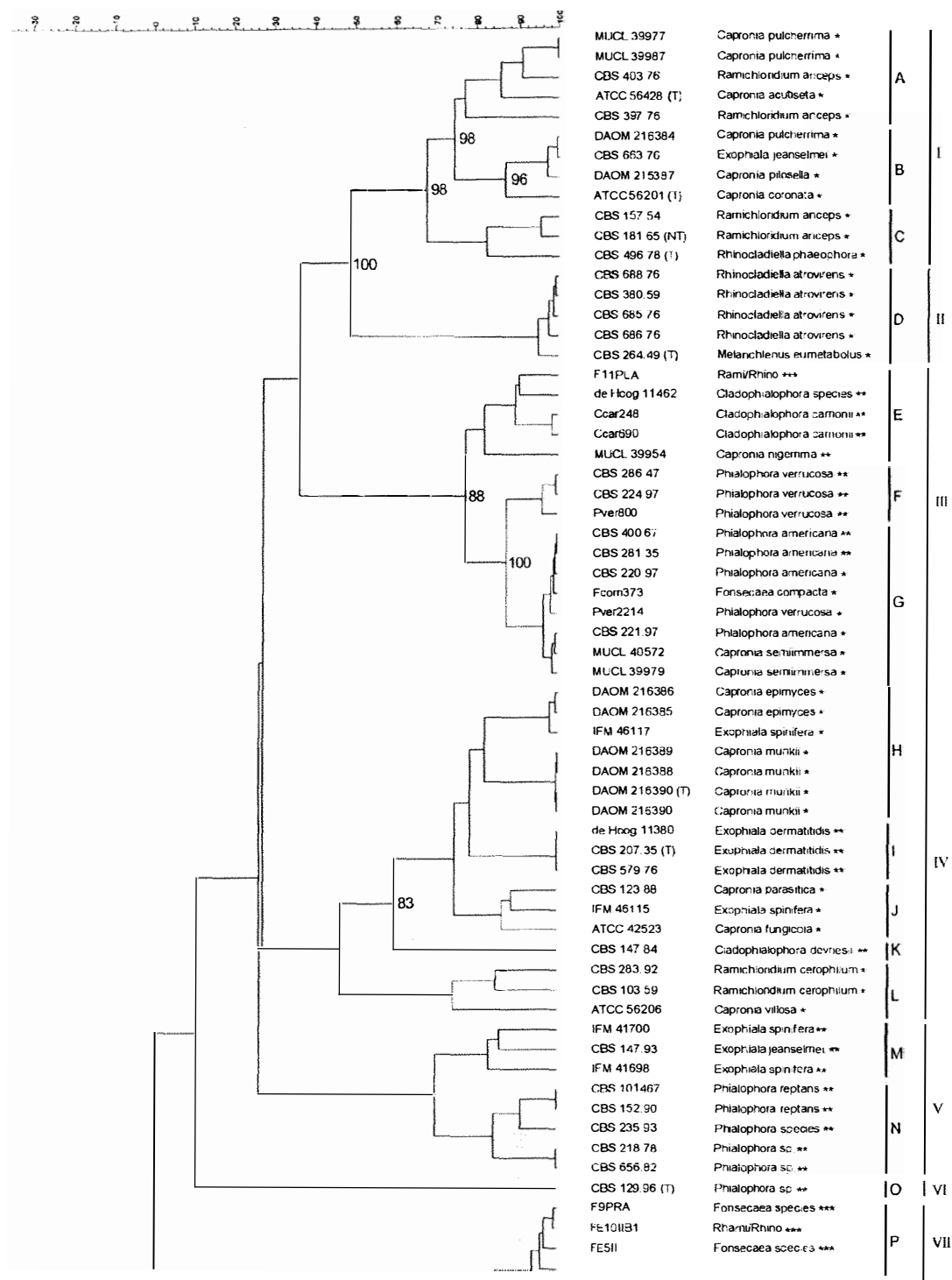
Entre os diferentes taxons da família Herpotrichiellaceae estudados neste trabalho, o tamanho do fragmento 5.8S do DNA ribossômico foi praticamente invariável para a maioria das linhagens (aproximadamente 160pb; Tabela 10). As linhagens CBS101.460 e CBS 677.76, foram as únicas com duas transversões e foram reunidas no mesmo grupo 6, de acordo com a topologia obtida pela árvore filogenética, a partir do alinhamento do Anexo D (Figura 25). A linhagem CBS 283.92, apresentou 4 substituições na região 5.8S.

O gene 5.8S DNAr é flanqueado por dois domínios hipervariáveis (ITS1 e ITS2). Esses espaçadores são extensivamente utilizados para a distinção de espécies de dematiáceos (Hoog *et al.*, 1999 a; Gerrits van den Ende & Hoog, 1999). A variabilidade das regiões ITS reflete a quantidade de diversidade dentro de cada grupo. Variações foram observadas no domínio ITS, inclusive alterações significativas no tamanho dos fragmentos ITS1 e ITS2 da linhagem de *Ramichloridium* CBS 283.92 foram observadas (Anexo D). Além disso, pequenas variações de tamanho dos fragmentos ITS1 e 2 foi freqüente para a maioria das linhagens (Tabela 10). Fato que não impediu o alinhamento dos diferentes domínios analisados (Figura 25).

De acordo com o alinhamento foi observada a formação de grupos distintos reunindo linhagens patogênicas, sapróbias e ambas. No grupo 11, foram reunidos os agentes causais de cromoblastomicose, enquanto que o grupo 8 reuniu a maioria das linhagens isoladas do ambiente. Linhagens com morfologia *Rhinochloidiella* foram agrupadas no grupo 5 e 7. No grupo 9, foram agrupadas linhagens de *F. pedrosoi* sapróbias isoladas no primeiro planalto do Estado do Paraná com as linhagens patógenas isoladas de pacientes com cromoblastomicose provenientes da mesma região.

Uma árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento das seqüências ITS1, 5.8S e ITS2 das linhagens estudadas neste trabalho com banco de

dados de seqüências de linhagens referência do CBS, possibilitando assim a comparação das seqüências dos três domínios (ITS1, ITS2 e 5.8S) entre membros da família Herpotrichiellaceae (Figura 26).



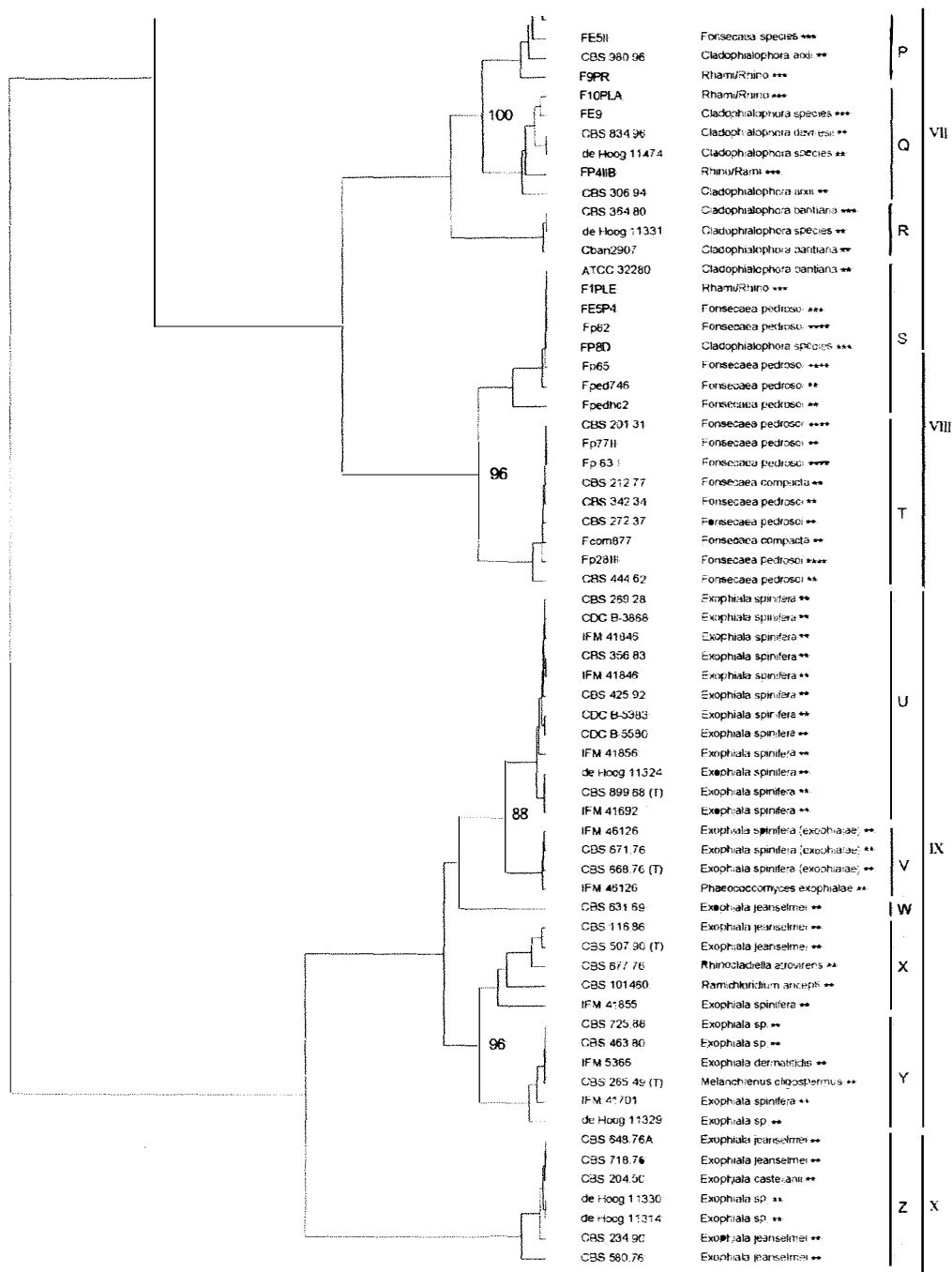


Figura 26. Árvore filogenética da família Herpotrichiellaceae obtida à partir das comparações de seqüências ITS1, ITS2 e 5.8S do DNAr pelo método de “neighbor-joining” do programa “Treecon” (Van de Peer & Wachter, 1994) com 100 reamostragens de “bootstrap”. Somente valores acima de 80% foram indicados para os grupos (I-X) e subgrupos (A-Z) discutidos no

texto. * Linhagem sapróbia CBS; ** Linhagem patogênica CBS; *** Isolado sapróbio (PR); **** Isolado de pacientes com cromoblastomicose (PR).

A partir do observado na Figura 26, linhagens referência de *Ramichloridium*, *Rhinocladiella* e *Fonsecaea* formaram grupos distintos (I, II e VIII) e relacionados com isolados patogênicos e sapróbios.

O gênero *Fonsecaea* constituiu um agrupamento reunindo a maioria das linhagens tipo de *F. pedrosoi*, isolados de pacientes com cromoblastomicose e sapróbios (VIII). Dentro deste agrupamento, foram observados dois subgrupos. No subgrupo (T), foram reunidas as linhagens referência de *F. pedrosoi* e *F. compacta*, enquanto que no subgrupo (S), foram observadas as linhagens patogênicas (Fp82 e Fp65) e isolados sapróbios (F1PLE, FP5P4, 8DPIRA), ambos provenientes da mesma região do Estado do Paraná. Tal fato, parece evidenciar uma relação filogenética entre espécies sapróbias e patogênicas isoladas na mesma região.

A formação do subgrupo (S), dentro do agrupamento VIII, reflete as diferenças fisiológicas encontradas entre os isolados sapróbios e linhagens referência, e também, a maior afinidade destes, com as linhagens patogênicas isoladas de pacientes com cromoblastomicose (item 4.2.3). A presença da linhagem ATCC 322.80 de *C. bantiana* neste grupo, demonstrou a relação destes agentes com essa espécie.

De acordo com o observado no item 4.5, as linhagens patogênicas de *F. pedrosoi* CBS 272.37, Fp82 e Fp65, assim como o isolado sapróbio FE5P4, demonstraram um potencial para a formação de corpos muriformes "in vitro". Tal evidência, pode sugerir a relação deste fator com a evolução para patogenicidade deste grupo.

A ecologia dos membros de Herpotrichiellaceae ainda não parece esclarecida. Originalmente, muitas espécies de *Capronia* foram descritas a partir de plantas (Barr, 1983). Untereiner *et al.* (1995), observaram anamórficos deste taxon associados a um grande espectro de doenças. Sendo assim, esta conexão pode

indicar que os anamórficos patogênicos, provavelmente apresentam, um nicho sapróbio.

O subgrupo (F), constituído por espécies de *Phialophora*, reuniu somente agentes de micoses subcutâneas. No caso deste grupo, o aspecto morfológico, presença de fiálides com colarete, parece indicar o caráter monofilético deste grupo. Além disso, é importante ressaltar que as espécies de *P. verrucosa*, agentes clássicos de cromoblastomicose, formaram uma clade distinta reunindo agentes capazes de formar corpos muriformes nos tecidos, assim como o observado para o grupo *Fonsecaea* (subgrupo T). Tal fato, reforça a idéia de que a capacidade para formação de corpos muriformes seja um fator fundamental no desenvolvimento da doença e na especialização destes agentes.

Espécies sapróbias de *Ramichloridium* foram encontradas em todos os grupos dentro da família (Figura 26). O isolado sapróbio de *Ramichloridium* F11PLA, foi observado dentro do grupo III, junto com espécies de *Cladophialophora*, agentes de cromoblastomicose.

Segundo Futuyama (1992), cada espécie é um mosaico de características ancestrais herdadas com pouca ou nenhuma alteração desde os ancestrais remotos e ou de características relativamente derivadas, que sofreram mudanças recentes, sendo que um caráter pode apresentar um ou mais estados e então ser denominado de pleisiomórfico. Haase *et al.* (1999), observaram que a família Herpotrichiellaceae parece apresentar fatores como os de caráter pleisiomórficos, os quais poderiam favorecer a sobrevivência destes agentes dentro do tecido hospedeiro. Justificando assim, a ocorrência de membros sapróbios correlacionados filogeneticamente com espécies responsáveis por uma diversidade de quadros clínicos.

Um complexo denominado *Cladophialophora arxii* (grupo VII), reuniu a maioria dos isolados sapróbios, entre os quais F10PLA, FE9, Fp4IIB, F9PRA, FE10IIB1 e a linhagem CBS 834.96 de *C. devriseii*, proximamente relacionada com o isolado sapróbio FE9, identificado como *C. bantiana* pela morfologia e testes fisiológicos. Guerrits van den Ende & Hoog (1999) observaram a mesma relação entre linhagens de *C. bantiana* e *C. devriseii* dentro do agrupamento “*arxii*”. De acordo com estes autores, a linhagem 834.96, morfológicamente identificada como *C. devriseii*, foi isolada a partir

de infecção subcutânea e apresentou uma relação estreita com espécies identificadas como *C. bantiana* originadas de infecção cerebral. Tais dados, reforçam o agrupamento encontrado. É importante ressaltar que dentro do grupo *C. arxii* estão reunidas espécies relacionadas desde quadros subcutâneos até infecções envolvendo SNC (Padhye *et al.*, 1999).

No gênero *Cladophialophora* a presença de “introns” na subunidade 18S do DNAr parece estar intimamente relacionada com a especialização para o neurotropismo das espécies de *C. bantiana* (Guerrits van den Ende & Hoog, 1999). A árvore filogenética (Figura 26), demonstra esta tendência, quando grupos de *Cladophialophora* distintos são formados entre espécies de infecção subcutânea e neurotrópicas (grupos III-E e VII-R).

Dentro do agrupamento “*arxii*”, dois subgrupos distintos foram observados (Figura 26). Foram observadas substituições do tipo transversão e transição, prevalecendo as do tipo transição. Um grande número de substituições foi homogêneo, tanto para as linhagens patógenas quanto as de origem ambiental. Tal como o ocorrido para os nucleotídeos 99 e 123 do domínio ITS1 (Anexo D), onde foram observadas substituições idênticas para os isolados do mesmo agrupamento 9PRA, FE10IIB1 e FE5IIB, diferentes das relatadas para o grupo F10PLA, FE9 e FP4IIB. Também para o domínio ITS2, a mesma relação foi verificada, onde observou-se substituições específicas na posição de 460, 602 e 604pb, para os isolados FE10PLA, FE9 e FP4IIB (subgrupo Q), e na posição de 454, 490 e 602 para os isolados FE10IIB1, FE5II e 9PRA (subgrupo P). Segundo Hoog *et al.*, (1999c), diferenças entre distâncias, podem ser avaliadas de acordo com a taxa de transição e transversão dentro de uma espécie. Os autores questionam se uma seqüência alterada pode ter ocorrido gradativamente ou ter sido originada de eventos irregulares, ao acaso, traduzidos como uma simples mutação e conseqüentemente com baixos números de eventos evolucionários. No caso de baixo número de eventos evolucionários a distância filogenética entre os dois grupos comparados pode ser pequena, apesar de uma grande distância na árvore filogenética. Uma aproximação de tal distância pode ser conseguida pela contagem da taxa entre transição e transversão. A transição é um evento freqüente em baixas taxas

de substituições evolucionárias, enquanto que em grupos com grande diversidade, as transições chegam próximas do ponto de saturação.

O grande número de eventos de substituições observado nos domínios ITS1 e ITS2 na maioria das espécies da família Herpotrichiellaceae, parece indicar que a evolução para a patogenicidade destes agentes, caracteriza-se por um evento de múltiplos passos evolutivos. A presença de corpos muriformes no caso de espécies relacionadas com a cromoblastomicose e de "introns" em espécies neurotrópicas, reflete a adaptação para a condição especial de sobrevivência no tecido hospedeiro.(Hoog *et al.*, 1998).

A distribuição das espécies sapróbias e patogênicas por toda a árvore, parece refletir os conceitos acima relatados. Como por exemplo, o observado para os agrupamentos como *Cladophialophora* sp (grupo VII) e *Exophiala* sp (IV), ocorrendo separado daqueles correlacionados com a formação de corpos muriformes (III-E, III-F e VIII-T). Sendo assim, pode-se concluir que a adaptação dos agentes causais da cromoblastomicose podem ter sido guiada pela capacidade do desenvolvimento de corpos muriformes nos tecidos.

Ainda para as espécies de *Exophiala*, foram observados diferentes grupos dentro da árvore filogenética (IV, V, IX e X). Diferentes taxas de adaptação parecem ocorrer nos referidos grupos. É importante observar que no grupo IV a conexão com teleomórficos foi clara, fato não observado para os agrupamentos (IX e X) envolvendo somente anamórficos. Tais conexões, tem sido extensivamente relatada (Untereiner *et al.*, 1995; Untereiner, 1997; Untereiner & Naveau, 1999). As espécies *Exophiala spinifera* e *E. jeanselmei* formaram um bem suportado ramo monofilético, de acordo com o observado por Hoog *et al.* (1999a). Utilizando seqüências ITS os mesmos autores verificaram grande afinidade de linhagens *E. spinifera* com *Capronia munkii*. Haase *et al.* (1999), relataram teleomórficos de *Capronia* distribuídos por toda a árvore filogenética da família *Herpotrichiellaceae*. De acordo com os autores as espécies de *Capronia* possuem um grande espectro de anamorfismo, principalmente com *Exophiala*.

De acordo com a Figura 26, isolados sapróbios foram identificados dentro de grupos com conexões teleomórficas evidentes. Como por exemplo, a linhagem

FE11PLA, acomodada junto com *Cladophialophora sp.*, próximos filogeneticamente de *Capronia nigerrima* (subgrupo E) e o isolado CBS 403.76 de *Ramichloridium anceps* proximamente relacionado com *C. pulcherrima* e *C. acutiseta* no subgrupo A.

Com base nos resultados obtidos por meio de seqüenciamento, pôde-se afirmar que algumas linhagens sapróbias estão correlacionadas com as linhagens patogênicas, assim como a correlação entre teleomórficos e anamórficos foi nitidamente observada nos diferentes grupos da família Herpotrichiellaceae.

4.6.3. RAPD

Também com o objetivo de comparar geneticamente os isolados sapróbios com linhagens referência de fungos dematiáceos, estudou-se a variabilidade por meio de marcadores RAPD, das espécies do grupo *Ramichloridium*, *Rhinocladiella* e *Fonsecaea* em relação as espécies sapróbias isoladas (Tabela 8).

Para o estudo foram utilizados 4 “primers” (Tabela 2, Apêndice 1), os quais geraram 105 bandas observadas nas Figuras 27, 28, 29 e 30.

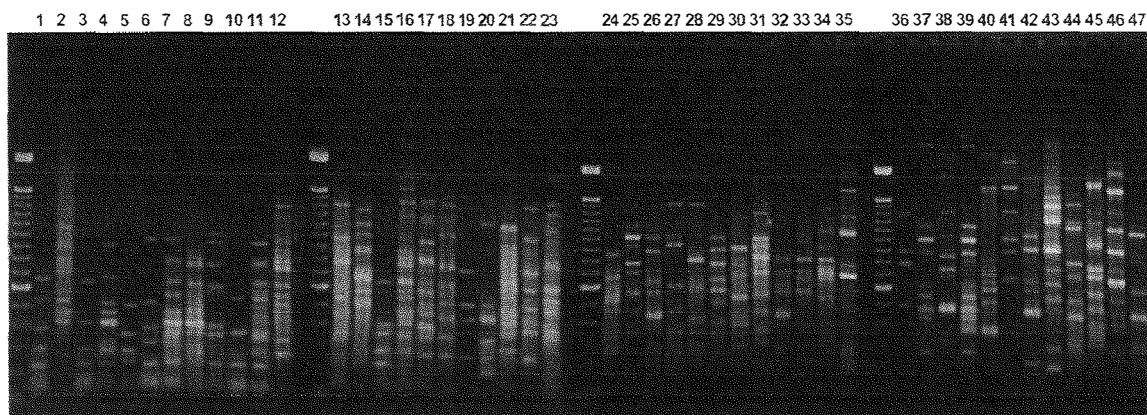


Figura 27. Perfil de RAPD obtido com o “primer” Opx 11: marcador de peso molecular (“Ladder” 100pb), 1 a 10 linhagens referência de *F. pedrosoi*, 11 a 18 linhagens isoladas de pacientes, 19 a 23 isolados sapróbios de *F. pedrosoi* e relacionados, 24 a 39 linhagens referência de *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*, 40 a 47 isolados sapróbios relacionados.

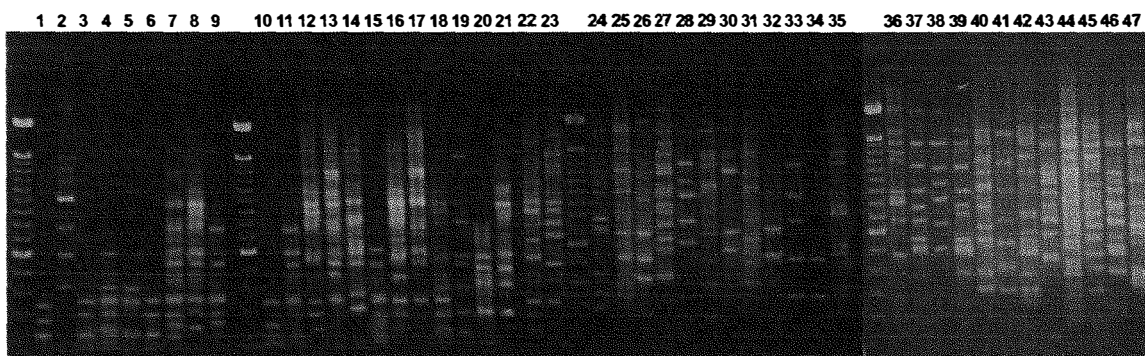


Figura 28. Perfil de RAPD obtido com o “primer” Opx 12 : marcador de peso molecular (“Ladder” 100pb), 1 a 10 linhagens referência de *F. pedrosoi*, 11 a 18 linhagens isoladas de pacientes, 19 a 23 isolados sapróbios de *F. pedrosoi* e relacionados, 24 a 39 linhagens referência de *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*, 40 a 47 isolados sapróbios relacionados.

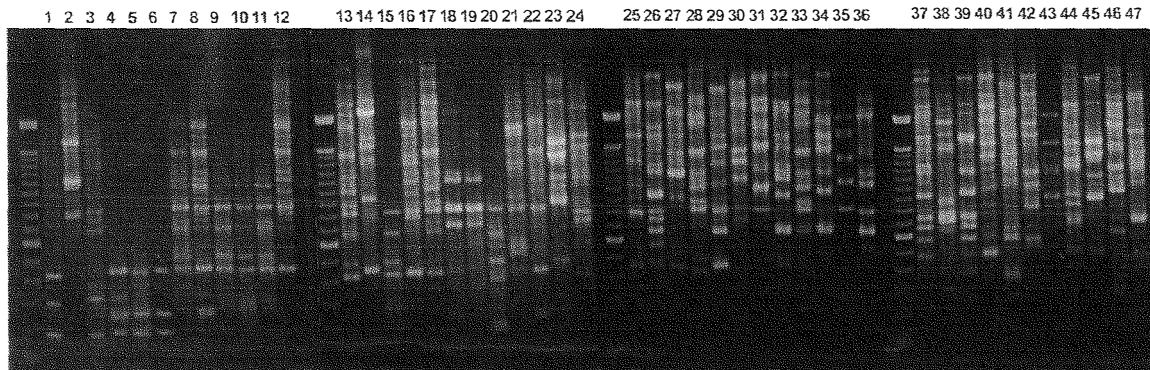


Figura 29. Perfil de RAPD obtido com o “primer” Opx 14: marcador de peso molecular (“Ladder” 100pb), 1 a 10 linhagens referência de *F. pedrosoi*, 11 a 18 linhagens isoladas de pacientes, 19 a 23 isolados sapróbios de *F. pedrosoi* e relacionados, 24 a 39 linhagens referência de *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*, 40 a 47 isolados sapróbios relacionados.

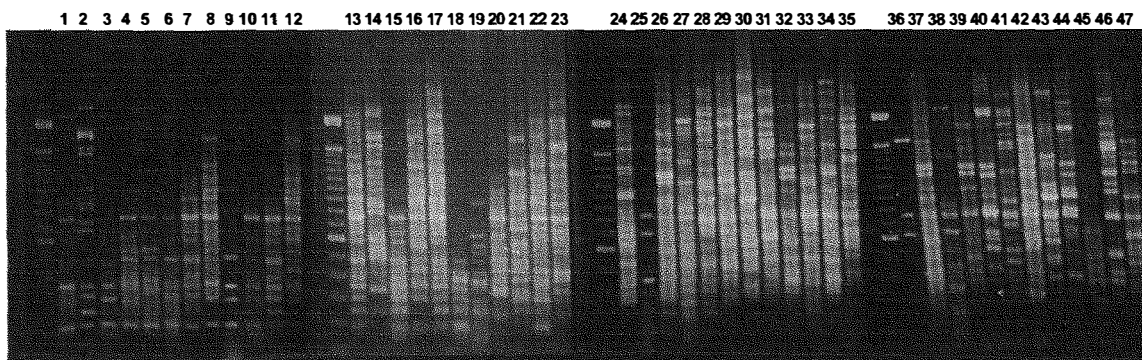


Figura 30. Perfil de RAPD obtido com o “primer” Opx 17: marcador de peso molecular (“Ladder” 100pb), 1 a 10 linhagens referência de *F. pedrosoi*, 11 a 18 linhagens isoladas de pacientes, 19 a 23 isolados sapróbios de *F. pedrosoi* e relacionados, 24 a 39 linhagens referência de *Ramichloridium* e *Rhinoctadiella*, 40 a 47 isolados sapróbios relacionados.

A análise dos dados, gerou pelo menos 13 grandes grupos com um baixo grau de similaridade genética (Figura 31). Porém dentro dos grupos, foram identificados subgrupos com similaridades maiores (de até 82%). As similaridades encontradas (12 à 82%), indicaram um alto grau de polimorfismo entre as amostras analisadas.

Para a análise dos dados foi utilizado o coeficiente de similaridade Jaccard. Existem várias medidas de similaridade, os coeficientes de similaridades Jaccard e de coincidência simples (“simple matching”) tem sido os mais utilizados em análise de dados gerados por RAPD. Estes coeficientes medem o grau de concordância entre duas unidades, onde o coeficiente simples considera as concordâncias positivas e negativas, enquanto que o coeficiente de Jaccard considera apenas as concordâncias positivas.

O coeficiente de similaridade Jaccard vem sendo mais utilizado para análise de marcadores RAPD por desconsiderar as concordâncias negativas, as quais em RAPD podem ser decorrentes de falhas de amplificação e desta forma o dendrograma gerado por este coeficiente poderia ser mais confiável do que a similaridade determinada pelo coeficiente simples. Porém, o coeficiente simples de similaridade é mais indicado quando espécies diferentes são comparadas, justamente por considerar as concordâncias negativas e ampliando assim, muitas vezes, a similaridade entre duas linhagens. A análise por este coeficiente pode ser visualizada na Figura 32.

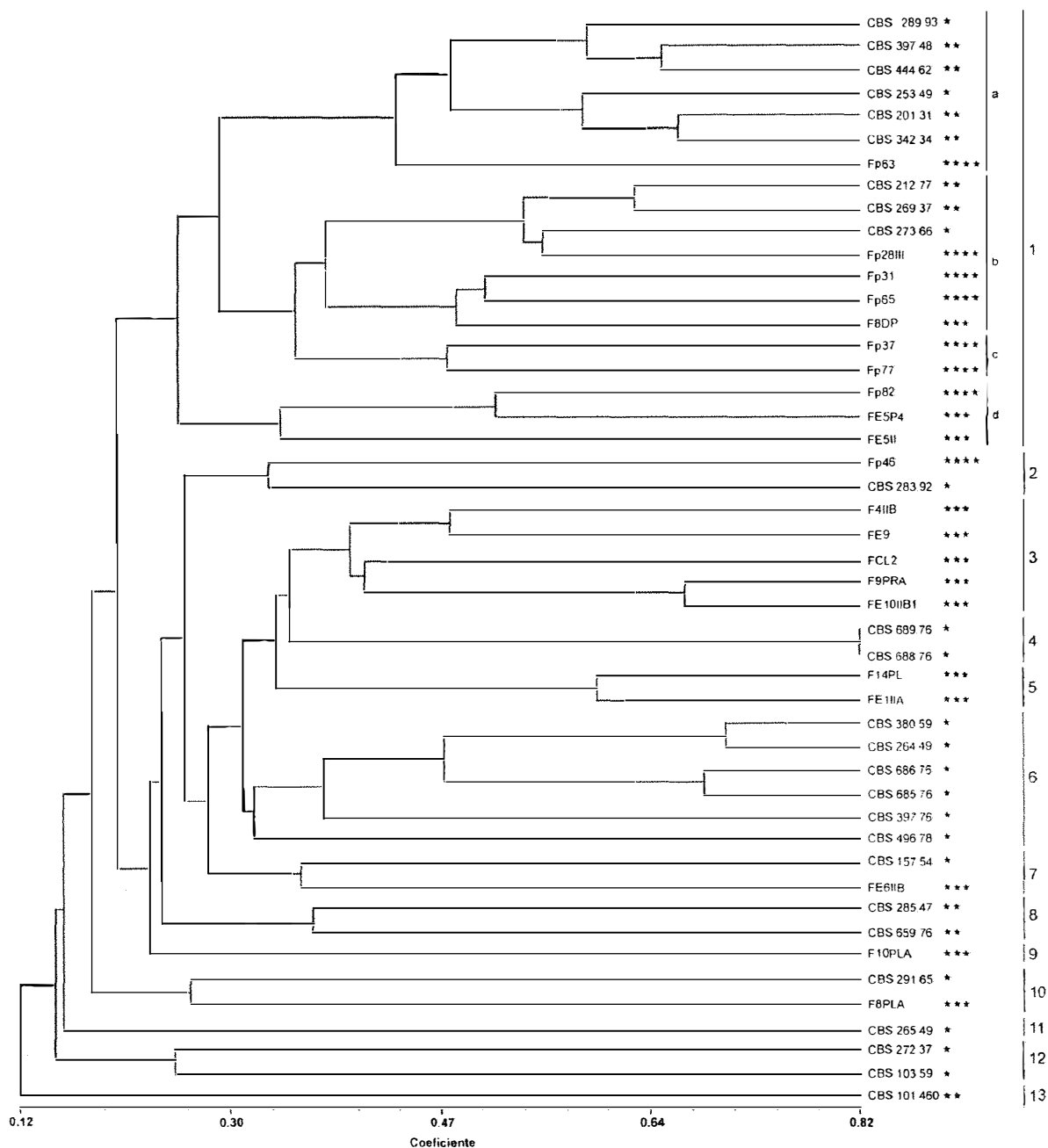


Figura 31. Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética entre linhagens referência de *Fonsecaea pedrosoi*, *Ramichloridium*, *Rhinocladiella* e isolados sapróbios relacionadas, a partir dos “primers” Opx 11, 12, 14 e 17, utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard. * CBS/Linhagens sapróbias; ** CBS/Linhagens patogênicas; *** Isolado sapróbio-Paraná; **** Linhagens patogênicas/cromoblastomycose-Paraná

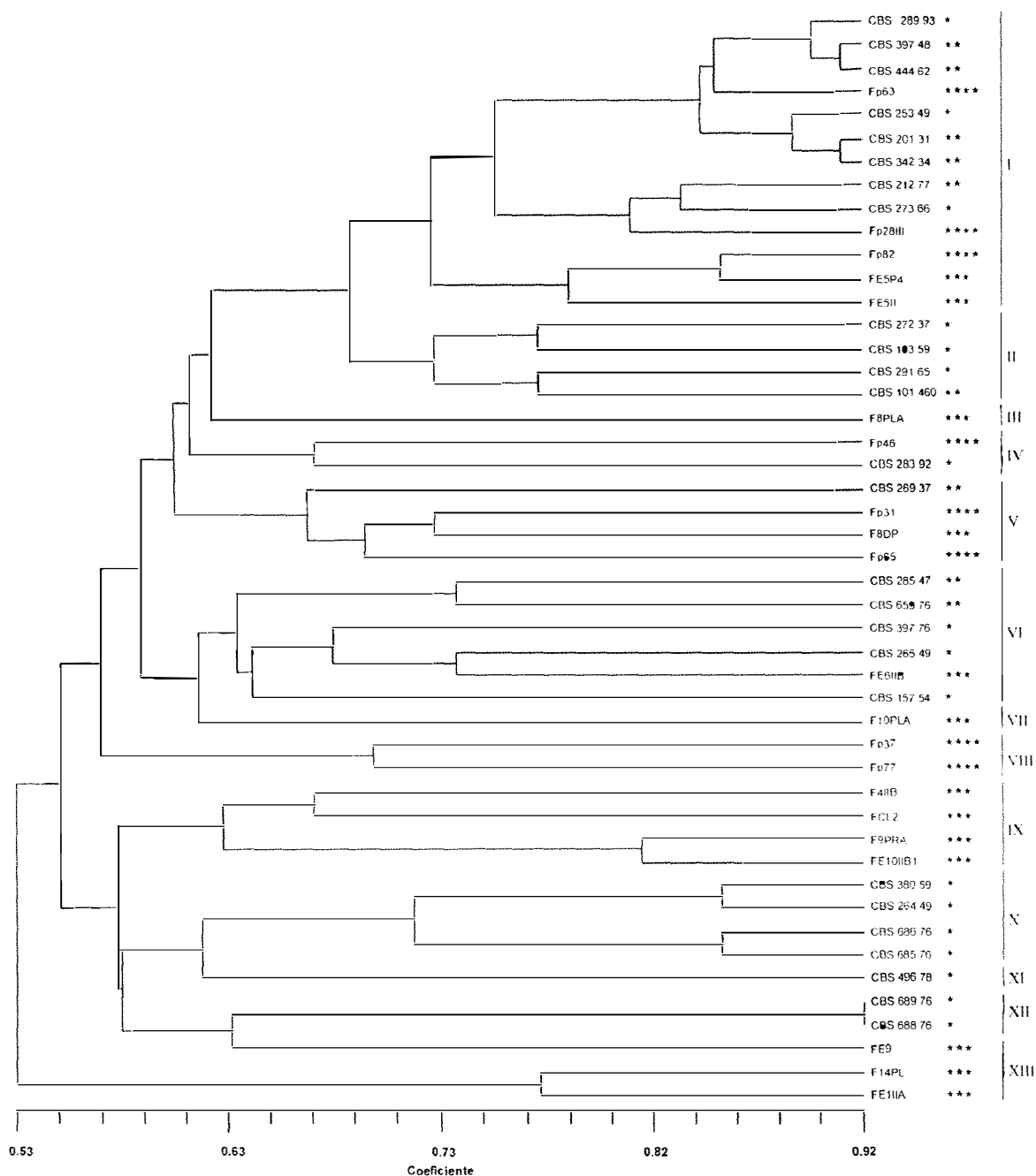


Figura 32. Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética entre linhagens referências de *Fonsecaea pedrosoi*, *Ramichloridium*, *Rhinocladiella* e isolados sapróbios correlacionados, a partir dos “primers” Opx 11, 12, 14 e 17, utilizando o coeficiente de similaridade simples. * CBS/Linhagens sapróbias; ** CBS/Linhagens patogênicas; *** Isolado sapróbio-Paraná; **** Linhagens patogênicas/cromoblastomicose-Paraná

De acordo com o dendrograma apresentado na Figura 32, verificou-se a formação de grupos (I-XIII) mais definidos em relação aqueles observados pela análise de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (Figura 31), embora a maioria dos agrupamentos verificados na Figura 32 tenham coincidido com os encontrados na Figura 31, para algumas linhagens foram verificados grupos diferentes, por exemplo as linhagens sapróbias FP4IIB, FCL2, F9PRA e FE10IIB1 do grupo IX, distribuídas em subgrupos distintos daqueles encontrados pelo coeficiente de Jaccard.

A análise de confiabilidade dos agrupamentos apresentada nos Anexos F e G foi realizada pelo método "bootstrap" (Felsenstein, 1985), e de acordo com esta análise, somente os valores com P maior ou igual a 95% podem ser considerados, uma vez que valores inferiores, podem refletir dados reais ou serem originários de desvios amostrais. A partir do Anexo F e G, verificou-se que para ambos os coeficientes, somente agrupamentos entre linhagens geneticamente mais próximas, ou seja, os subgrupos, se mostram confiáveis pela análise "bootstrap", enquanto que para os principais agrupamentos o mesmo não ocorreu.

Tal fato associado às variações de agrupamentos encontradas entre os dois coeficientes de similaridade aplicados para a análise dos dados, sugere a necessidade da utilização de um maior número de marcadores, mesmo que alguns agrupamentos formados estão de acordo com aqueles verificados pelas análises de seqüência ITS e 5.8S.

Devido a não coincidência na formação de alguns grupos encontrados pela análise de similaridade com os dois coeficientes e levando em consideração o fato de que as concordâncias negativas podem representar diferenças não necessariamente existentes, ou seja originárias de falhas na amplificação, serão consideradas nesta discussão principalmente os agrupamentos gerados pelo coeficiente de Jaccard apresentados no dendrograma da Figura 31.

No agrupamento I, foi reunida a maioria das linhagens de *F. pedrosoi*, com subgrupos específicos apresentando valores de "bootstrap" acima de 85% (Figura 31 e Anexo F). Por exemplo, o observado para o subgrupo (d) reunindo linhagens sapróbias e patogênicas (isoladas de pacientes com cromoblastomicose) ambas provenientes do primeiro planalto. Da mesma forma que os dados encontrados através

da comparação de distâncias de seqüências ITS e 5.8S (Figura 26), onde as linhagens de *F. pedrosoi* isoladas no primeiro planalto são mais próximas das linhagens de *F. pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose provenientes da mesma região, formando um subgrupo separado das linhagens referência do CBS.

A mesma relação também foi observada para os resultados dos testes fisiológicos, onde os isolados sapróbios deste grupo, demonstraram-se mais próximos fisiologicamente das linhagens de *F. pedrosoi* isoladas de cromoblastomicose ocorrida no Estado do Paraná, do que em relação às linhagens referência. Ainda, foi observado também que o isolado FP8D com morfologia tipo *Cladosporium* (Figura 10a) fisiologicamente considerado próximo de isolados de cromoblastomicose (Tabela 1, Anexo B), agrupou-se com linhagens de pacientes pelos marcadores RAPD (Figura 31, subgrupo c). De acordo com o observado pela análise do seqüenciamento, provavelmente estas espécies podem não necessariamente pertencer ao grupo *Fonsecaea*, sendo assim a reavaliação do grupo é necessária, um maior número de marcadores de RAPD deverão ser incluídos e também linhagens referência de *Cladophialophora* e *Cladosporium*.

O gênero *Cladosporium* reúne somente espécies sapróbias e estão acomodados dentro da ordem Dothideales na família Mycosphaerellaceae. De acordo com Gerrits van den Ende & Hoog (1999), o gênero *Cladophialophora* está acomodado dentro da família Herpotrichiellaceae, devido a sua forte tendência à patogenicidade, causando uma diversidade de quadros clínicos em humanos, enquanto que, ecologicamente o gênero *Cladosporium* reúne invasores de plantas vivas e de vegetal em decomposição. Sendo assim, a morfologia do tipo *Cladosporium* encontrada no isolado Fp8D, parece não refletir sua fisiologia e relação genética próxima com isolados patogênicos de humanos. Os dados genéticos sugerem que o isolado pertence ao grupo *Cladophialophora*.

De acordo com diversos autores (Uijthof *et al.*, 1998; Horr  & Hoog, 1999; Zalar *et al.*, 1999) o entendimento dos processos de especia o e adapta o evolucionária, s    possível a partir da correla o entre dados morfológicos, genéticos e ecologia dos agentes. Portanto, através do observado entre as distâncias de seq ncia ITS, RAPD e fisiologia, alguns isolados do ambiente parecem estar

geneticamente correlacionados com linhagens patogênicas, e ainda parece evidente a ocorrência de um processo de especiação adaptativa para a patogenicidade, o que poderia favorecer o desenvolvimento da infecção a partir da inoculação traumática.

Ainda dentro do grupo *Fonsecaea* foi observado uma similaridade genética de 60% entre as linhagens *F. compacta* (CBS 212.77) e *F. pedrosoi* (CBS 269.37) (Figura 31). A similaridade entre espécies de *Fonsecaea* também foi relatada por Attili *et al.* (1998) usando comparação de seqüências ITS1 e DNAr- RFLP. Neste trabalho os autores verificaram que a linhagem de *F. compacta* CBS 212.77 apresentou um padrão de RFLP mais próximo do padrão da linhagem de *F. pedrosoi* CBS 273.66, quando comparado com o padrão da linhagem CBS 269.37. Tais dados, condizem com o observado pela análise de similaridade, realizada neste trabalho, utilizando o coeficiente simples (Figura 32), onde as linhagens CBS 212.77 e CBS 273.66 apresentaram 83 % de similaridade, formando um subgrupo dentro do agrupamento I (Figura 32).

Em um estudo de RAPD envolvendo espécies de *F. compacta* e *F. pedrosoi*, realizado por Caligiome *et al.* em 1999, também foi verificado uma similaridade genética de 76% entre linhagens destas espécies. Os autores relatam que o dimorfismo encontrado não é o suficiente para distinção de espécie. Um estudo complementar de PCR-RFLP realizado por Caligiome *et al.*, 1999, confirmou a grande similaridade genética entre as duas linhagens delimitadas como espécie pela morfologia.

Outro grupo indicado pela análise de polimorfismo gerado por RAPD de acordo com o coeficiente de similaridade Jaccard (Figura 31) foi do gênero *Cladophialophora* (grupo 3), reunindo isolados de morfologia compatível com *Cladophialophora* (FP4IIB, FE9 e FCL2). Ainda dentro deste grupo foi verificado um subgrupo reunindo o isolado FE10IIB1 com 65% de similaridade genética com o isolado 9PRA. De acordo com a árvore filogenética da família Herpotrichiellaceae (Figura 26) a partir de seqüências ITS e 5.8S, os dois isolados estão geneticamente relacionados com espécies de *C. arxii*. Dentro deste agrupamento, um subgrupo distinto foi verificado reunindo os isolados FE9 e F10PLA, sendo que tal relação, não foi integralmente observada nos agrupamentos de RAPD, formados pela análise de

similaridade para ambos os coeficientes utilizados. Porém, considerando a análise de similaridade com o coeficiente Jaccard (Figura 31), o isolado FE9 identificado como *C. bantiana*, apresentou-se relacionado com espécies do gênero, considerando ainda que a presença de um elemento de inserção observado nesta linhagem (Figura 22) parece ser um forte indicativo do potencial de patogenicidade do isolado, justificando assim, a sua posição sistemática dentro do gênero *Cladophialophora*.

Os dados de seqüenciamento indicam a proximidade do isolado FE9 identificado como *C. bantiana* com *C. arxii*. Um estudo complementar reunindo dados de seqüenciamento e fisiologia com marcadores RAPD incluindo linhagens referência poderá ser um instrumento importante na identificação do isolado como *C. arxii*.

Dentro do grupo *Ramichloridium* e *Rhinocladiella* foi observada uma similaridade de 82% entre as linhagens sapróbias CBS 689.76 e CBS 688.76 de *Rhinocladiella atrovirens* (Figura 31). Da mesma forma as linhagens sapróbias do CBS 685.76, CBS 686.7 e CBS 264.45 e CBS 380.59, formaram grupos distintos (grupo 6, Figura 31) da linhagem patogênica do CBS 291.65 (grupo10, Figura 31). Tal tendência foi também observada por meio de seqüências ITS, onde verificou-se dentro de *Rhinocladiella atrovirens* uma distinção de grupos entre linhagens patogênicas e sapróbias. A relação genética observada por esta análise para a linhagem 101.460 de *R. atrovirens* com isolados sapróbios e patogênicos (Figura 31), foi também verificada na análise de seqüências ITS (Figura 26).

Pelo perfil de amplificação observado nas Figuras 27, 28, 29 e 30, verificou-se um maior polimorfismo dentro do grupo *Ramichloridium* e *Rhinocladiella*. A grande heterogeneidade destas espécies pode justificar o padrão observado.

De acordo com Caligiorne *et al.* em 1999, a técnica de RAPD é adequada para a análise de polimorfismo em fungos dematiáceos de importância clínica. Os autores verificaram que linhagens da mesma espécie apresentaram um padrão consensual, com um perfil monomórfico de bandas diferindo-se de outras espécies. Neste estudo, foi verificado que as espécies do gênero *Fonsecaea*, apresentavam um perfil mais diferenciado em relação aos grupos analisados. Porém neste trabalho foram analisadas poucas linhagens entre elas, 05 de *Fonsecaea*, 02 de *Phialophora*, 03 de

Cladophialophora e 01 de *Exophiala*, embora os autores tenham utilizado um número elevado de marcadores.

A partir dos dados de RAPD, verificou-se grande variabilidade genética entre espécies do mesmo gênero. Este fato, juntamente com os dados de seqüenciamento e fisiologia vem de acordo com as observações realizadas por Hoog *et al.*, 1998, relatando que esta família se encontra em processo ativo e recente de evolução.

Neste trabalho com os dados de RPD não foram encontrados grandes grupos embasados em valores elevados de “bootstrap”, mas os resultados encontrados reforçam as evidências observadas nas análises de seqüência ITS, as quais revelam grupos diferentes daqueles encontrados por morfologia. Sendo assim, estes dados sugerem uma revisão na taxonomia dos grupos analisados, posicionados inicialmente baseados em caracteres morfológicos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Os métodos adotados para o procedimento de isolamento de fungos dematiáceos do ambiente foram eficientes.
- A partir da técnica de isolamento foi possível obter fungos dematiáceos sapróbios com caracteres morfológicos semelhantes a linhagens patogênicas, tais como *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Exophiala jeanselmei* e *Cladophialophora bantiana*, *C. devriseii* e *C. arxii*. Entre os isolados, os gêneros *Ramichloridium* e *Cladophialophora* foram os mais freqüentes
- Regiões de maior precipitação e temperaturas médias moderadas (16° C) parecem adequadas para o desenvolvimento dos isolados obtidos neste trabalho, sendo o material vegetal em decomposição o nicho preferencial destes
- Por meio da morfologia, fisiologia, seqüências ITS e marcadores RAPD, verificou-se uma grande variabilidade genética dentro da família Herpotrichiellaceae. Diferentes interações entre isolados sapróbios e linhagens patogênicas foram observadas, verificando-se para alguns isolados a relação evidente entre sapróbios com isolados patogênicos de uma mesma região
- Os dados morfológicos, fisiológicos e moleculares, indicam a relação dos isolados sapróbios FE9, FP4IIB com espécies de *C. arxii*, sendo que os isolados FE5P4, FE5II e FP8D foram identificados como membros do gênero *Cladophialophora*
- A capacidade para a formação de corpos muriformes “in vitro” verificado nos isolados sapróbios FE9 e FE5P4, a presença de “introns” nos isolados de *Cladophialophora* FE9 e FP4IIB e a relação genética destes com linhagens patogênicas indicam potencial patogênico desses isolados.

- A relação genética verificada entre isolados de fungos sapróbios e patogênicos provenientes de uma mesma região, indica a existência sapróbia dos agentes etiológicos da cromblastomicose em regiões de ocorrência da doença

ANEXO A: Avaliação do crescimento nos diferentes meios de cultura sob diferentes condições de temperatura.

Tabela 1. Avaliação do crescimento dos isolados nos meios de cultura Agar Sabouraud e BDA em diferentes temperaturas nos períodos de 10 e 20 dias, através do diâmetro médio das colônias medido em mm

Isolados	Ágar Sabouraud						BDA					
	10 dias			20 dias			10 dias			20 dias		
	Temperatura (° C)			Temperatura (° C)			Temperatura (° C)			Temperatura (° C)		
	28	36	40	28	36	40	28	36	40	28	36	40
FCL2	10	4,5	-	50	55	-	15	15	-	50	51	-
F9PRA	10	6,2	-	50	46,2	-	12	10	-	32	50	-
FE5P4	13,5	12	-	53,5	52	-	15,5	12	-	55,5	52	-
FE5P6	15	13	-	45	43	-	18	15	-	58	55	-
FE5II	16,2	14	-	56,2	54	-	18	16	-	58	56	-
FE9	16	5	-	46	45	-	17	13,2	-	47	53,2	-
FP4IIA	17	18,2	-	47	48,2	-	16	15,5	-	46	45,5	-
FP8D	16,5	18	18	46,5	48	32	20	18,2	18	30	48,2	54
F8PRD	22	19,5	-	52,2	49,5	-	36	30,5	-	46	40,5	-
FP4IIB	25,5	24	-	45,5	44	-	22	23	-	42	43	-
FE1IIA	25	25	-	45	45	-	25,5	26	-	45,5	46	-
FP9	28,9	26	-	48,9	46	-	35,6	22	-	45,6	42	-
F20PR3	12,8	5,5	-	42,8	45	-	16	13,5	-	46	43,5	-
FE4IIB	26	25	-	46	45	-	24,5	20	-	54,5	50	-
FE6IIB	22	20	-	42	40	-	23	23,2	-	53	53,2	-
FE3	20,5	7,5	-	30,5	45	-	24,5	18	-	54,5	48	-
F9PR	24	20,5	-	34	40,5	-	24	20,2	-	53	50,2	-
F9PRC2	24,5	23	-	34,5	53	-	26,5	26	-	54,5	56	-
F11PL	20	15	-	40	45	-	20,5	19	-	53	59	-
F11PLA	26,5	24,5	-	46,5	44,5	-	22,5	23	-	52,5	53	-
F10PLA	26	24,5	-	46	44,5	-	20,5	22	-	40,0	42	-
F10PLB	26	26	-	46	46	-	36,5	30	-	46,5	30	-
F3PLB	19	18,3	-	49	48,3	-	26,1	24	-	36	52	-
F3PLC	18	16	-	48	46	-	22,5	20	-	52	50	-
F1PLE	16	17	-	50	51	-	26,8	28	-	50	51	-
FE1IIB	23	26,5	-	53	46,5	-	23	20,5	-	53	50	-
FE10IIB	20	27,5	-	50	47,5	-	23	34	-	50	51	-
FE10IIB1	26,5	25	-	46,5	45	-	25,5	26	-	52	36	-
F9PRC	27,5	28	-	47,5	48	-	24	26	-	53	56	-
F14PL	21	17,5	-	51	47,5	-	20	22	-	50	51	-
FE3	32	35	-	52	55	-	40	42	-	50	50	-
FE7II	28	30	-	48	50	-	20	26	-	53	54	-

Tabela 2. Avaliação do crescimento dos isolados nos meios de cultura MM e MEA em diferentes temperaturas nos períodos de 10 e 20 dias, através do diâmetro médio das colônias medido em mm

Isolados	MM						MEA					
	10 dias			20 dias			10 dias			20 dias		
	Temperatura (° C)			Temperatura (° C)			Temperatura (° C)			Temperatura (° C)		
	28	36	40	28	36	40	28	36	40	28	36	40
FCL2	8	10	-	28	20	-	12	14,5	-	45	55	-
F9PRA	5	6	-	25	26	-	15	16,2	-	53	53	-
FE5P4	9	7	-	29	27	-	15,5	13	-	54	52	-
FE5P6	10	9	-	30	29	-	15	16	-	48	53	-
FE5II	7,3	6,9	-	17	16	-	16	14	-	57	56	-
FE9	9	4	-	29	24	-	16	5	-	52	54	-
FP4IIA	10	12	-	10	12	-	17	18	-	53	54,8	-
FP8D	11,5	14	12	21	24	19	16,5	17	8	55	49	28
F8PRD	8	4	-	18	14	-	23	19	-	51	76	-
FP4IIB	18	15	-	28	25	-	23,5	25	-	53	52	-
FE1IIA	12	10	-	22	20	-	25	24	-	57	45	-
FP9	10	5	-	22	20	-	28,9	27	-	54	49	-
F20PR3	19	10	-	20	20	-	14,8	8,5	-	51	56	-
FE4IIB	14,5	11	-	24	22	-	26	26	-	50	52	-
FE6IIB	14	10	-	24	20	-	22	25	-	49	57	-
FE3	18	10	-	28	20	-	22,5	9	-	46	54	-
F9PR	13,5	10	-	23,5	20	-	24	20,5	-	58	59	-
F9PRC2	16,5	16	-	26	26	-	24,5	22	-	55,3	51	-
F11PL	14	14	-	24	24	-	20	16	-	53	52	-
F11PLA	12,3	12	-	22	22	-	26,5	24	-	53	52	-
F10PLA	12	8	-	22	28	-	26	25	-	45,6	54,8	-
F10PLB	9	8	-	20	28	-	26	26	-	48	54	-
F3PLB	9	10	-	23,3	20	-	19	19	-	56	53	-
F3PLC	15,5	12	-	25	22	-	19	18	-	54,8	66	-
F1PLE	13	11	-	23	21	-	17	18	-	49	45	-
FE1IIB	13,5	12	-	23	22	-	23	26,5	-	51	58	-
FE10IIB	11	12	-	21	21	-	20	27	-	48	49	-
FE10IIB1	12,5	10	-	22	20	-	26	24	-	55,2	39	-
F9PRC	14	12	-	24	22	-	27,5	27	-	54,3	48	-
F14PL	10	9	-	20	29	-	22	18,5	-	54,9	53	-
FE3	8	12	-	20	22	-	32	35	-	56,7	38	-
FE7II	3	5	-	23	20	-	27	31	-	55,8	59	-

Tabela 3. Avaliação do crescimento dos isolados no meio de cultura OA em diferentes temperaturas nos períodos de 10 e 20 dias, através do diâmetro médio das colônias medido em mm

Isolados	OA					
	10 dias			20 dias		
	Temperatura (° C)			Temperatura (° C)		
	28	36	40	28	36	40
FCL2	13	18	-	40	40	-
F9PRA	14	15	-	35	46	-
FE5P4	15	13	-	49	48	-
FE5P6	17	14	-	50	59	-
FE5II	19	17	-	53	50	-
FE9	15	13	-	59	54	-
FP4IIA	17	15	-	50	52	-
FP8D	21	18	8	60,5	64	12
F8PRD	34	32	-	48	44	-
FP4IIB	22	21	-	48	45	-
FE1IIA	25	26	-	42	40	-
FP9	36	22	-	40	45	-
F20PR3	16	13	-	49	11	-
FE4IIB	26	21	-	54,5	50	-
FE6IIB	22	24	-	54	52	-
FE3	27	17	-	58	53	-
F9PR	23	20	-	53,5	42	-
F9PRC2	26	27	-	56,5	56	-
F11PL	21	20	-	54	54	-
F11PLA	23,5	24	-	52,3	52	-
F10PLA	22,5	24	-	42	49	-
F10PLB	35	31	-	49	49	-
F3PLB	26	25	-	49	41	-
F3PLC	24	18	-	51,5	52	-
F1PLE	26	20	-	46	41	-
FE1IIB	22	21	-	53,5	52	-
FE10IIB	28	31	-	51	41	-
FE10IIB1	26,5	25	-	52,5	50	-
F9PRC	26	26	-	54	52	-
F14PL	19	22	-	60	69	-
FE3	36	40	-	58	52	-
FE7II	21	25	-	8	8	-

ANEXO B: Fisiologia de fungos dematiáceos.

Tabela 1. Testes fisiológicos de linhagens referências e isolados ambientais de *Fonsecaea pedrosoi*

	CBS 285,47	CBS 659,76	CBS 212,77	CBS 201,31	CBS 342,34	CBS 269,37	CBS 271,37	CBS 272,37	CBS 397,48	CBS 253,49	CBS 444,62	CBS 273,66	CBS 289,93	FE5P4	FP8IDP	F9PRA	FCL2	FE5II
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
D-Glucose	+	w/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	+
D-Galactose	w/+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+
L-Sorbose	w	w	w	+	w+	w/-	w	?	w/+	w/+	w/+	w	w	+	w	w	w/+	w
D-Glicosamina	w	w/-	w	w	w	w/-	w	+	w	w/+	w	w	w/-	w	w	w/-	w	w/+
D-Ribose	w/-	w/-	w/-	w/-	w/-	w/-	w/-	w	w/-	w/-	w/-	-	-	w/-	w/-	-	+	w/-
D-Xilose	+	+	+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	+	+
L-Arabinose	w	+	+	+	+	w/+	+	w/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	w/-	w/+	w/-	w/-	w/-	w	w/-	w	w/-	w/-	w/-	-	w/-	w	-	-	w/+	w/-
L-Raminose	+	w	w/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+
Sacarose	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	+	+
Maltose	+	+	w/+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	w/+	+	w/+	+
α,α Trealose	+	w/-	+	+	+	+	+	+	w/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metil- α -D-Glicosídeo	w/+	w	+	+	+	+	w/-	w	w/-	+	+	+	w	w	w/-	+	+	+
Celobiose	w	w/+	w/+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	w	w/+	w/+	+
Salicina	w/+	w/-	+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+
Arbutina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	w/+	w	w/+	w	w	+	w/-	w/+	w/+	w/-	+	w/+	+	+	+	w/+	-	+
Lactose	w/-	w	w/+	+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	-	w	w/-	w/+	w/-	+
Rafinose	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+
Melezitose	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	w	-	w/-	-	-	-	-	w/-	w/-	-	-	-	-	-	-	w/-	-
Solução "Starch"	w/-	-	w/-	+	w	w/-	w/-	w/-	w/+	+	w/-	w/-	w/-	-	w/-	w/-	w/-	w/-
Glicerol	w	w/+	w	+	w/+	w/+	w/+	+	+	+	+	+	+	w	w	+	+	+
Meso-Eritritol	w/+	-	w/-	w/+	w	w	w/-	w/-	+	w/-	+	w/-	w/+	w	w/-	+	+	+
Ribitol	w	-	w/-	+	w/+	w/-	+	w	+	+	+	w/-	w	w	w/-	w/-	+	+
Xilitol	w/-	w/+	-	+	w/+	w	+	+	+	+	w/-	w/-	w/-	w	-	+	+	+
L-Arabinitol	w	w	w/+	+	+	w/+	w/+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	w/+	+	w/+
D-Glucitol	+	w	w/+	+	w/+	+	+	w	+	+	+	+	w/+	+	w/+	w/+	+	+
D-Manitol	+	w	w/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	w	w/-	w	+	w/-	w/-	w/+	w/-	+	+	+	w	w/+	w	w/-	+	w/-	+
Mioinositol	-	w/-	-	w/-	w/-	w/-	-	w/-	w	w/-	w/-	-	w/+	+	-	-	+	-
Glicano-d-lactona	w	w/-	w	+	w	w/+	w	?	w	w	w/+	w/+	w/+	+	w	w	w	+
D-Gliconato	w	w	w	+	w/+	w	w/+	+	+	+	w/+	w	w/+	+	w	w/-	w	w
D-Glicoronato	w	w	w	+	w	+	w/+	+	+	+	w/+	w	w/+	+	w	w/-	w	w
D-Galactonato	-	-	w/-	w/+	w	w/-	w/-	w	+	w	w/-	w/-	w/+	w	w/-	w/+	w	+
DL-Lactato	w	-	+	+	w/-	w	+	-	+	+	+	+	+	w	w	w	+	+
Succinato	w	w	w/-	+	+	+	+	+	+	+	w	w/+	+	w	w	w	+	w
Citrato	w	w	w/-	w/+	w	-	w/-	w/+	-	-	-	w/-	-	w	w	w/-	-	w/-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	w	w	w/-	+	w	w	w/-	+	w/+	w/-	w/+	+	+	w	w/+	+	+	w
Nitrato	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 1 - continuação

	CBS 285,47	CBS 659,76	CBS 212,77	CBS 201,31	CBS 342,34	CBS 269,37	CBS 271,37	CBS 272,37	CBS 397,48	CBS 253,49	CBS 444,62	CBS 273,66	CBS 289,93	FE5P4	FP8IDP	F9PRA	FCL2	FE5N
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Nitrito	w/+	w/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w/+	+	+
Etilamina	w	w/-	w/+	+	+	w	w/+	w/+	+	+	+	w/+	w/+	w	w/+	w/+	w/+	+
L-Lisina	w	w/-	w	w/+	w	w	w	w/+	+	+	w/-	w	w	w	+	w/+	w	w
Cadaverina	w	w	+	+	w/+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	+	w/+	+	+	w
Creatinina	w	-	-	w	w	w	w	w	w/+	w/-	w	+	w	w	+	w/+	+	w
Creatinine	w	-	-	w	w	w	w	w	w/+	-	w	w	w	w	w/+	w	+	w
2.5% MgCl2	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	+
5.0% MgCl2	w/+	w	w/+	+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	+
10 % MgCl2	w	-	w/+	+	w	+	+	+	+	w	+	w/+	+	+	w/+	w/+	+	w
2.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+	+	w/+	+	+	w
5.0% NaCl	w/-	-	w	+	w	+	w	+	+	w	+	w	+	+	-	+	+	w/-
10 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida																		
0.05 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida																		
0.01 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida																		
Urease ágar	-	+	-	-	-	w	+	+	-	w	w/+	+	-	+	+	-	+	-
30 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37 C	+	+	+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micosei	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	w	-
DNase	-	-	-	-	w/-	-	-	-	-	-	w/-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina auxiliar	-	w	-	-	-	w/+	-	w/+	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-

Abreviações usadas: + crescimento; - nenhum crescimento; w crescimento reduzido; w/+ e w/- possível crescimento ou não em uma semana. 1 a 3 *Fonsecaea compacta*; 4 a 13 *Fonsecaea pedrosoi*; 14 a 18 *Fonsecaea* sp.

Tabela 2 - continuação

	CBS 496.78	CBS 264.49	CBS 265.49	CBS 291.65	CBS 380.59	CBS 677.76	CBS 685.76	CBS 686.76	CBS 688.76	CBS 689.76	CBS 103.59	CBS 283.92	CBS 157.54	CBS 181.65	CBS 397.76	CBS 403.76	F9PR	F9PRC	F11PLA	F10PLA	F1PLE	FE10IB1	FE7
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Nitrito	+	-	+	+	w/-	+	w/-	w/-	-	w/-	+	-	w/-	+	+	w	w	+	w	+	+	w	+
Etilamina	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w/+	+	w/+	w	w/+	w
L-Lisina	w	w	w	+	w	+	+	+	w	+	w	+	+	w	+	+	-	w/+	w	w/+	w/+	w/+	w/+
Cadaverina	+	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+
Creatinina	w	-	w/-	w	-	w/-	+	w	w	+	+	+	-	-	+	w	w	+	w	w	w/+	w	w/+
Creatinine	w	-	w/-	w	-	w/-	w	w	w	+	+	+	-	-	+	w	w	+	w/-	w	w	-	w
2.5% MgCl2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w/+	+	w/-	+	+	w/+	+	+	+	+
5.0% MgCl2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	w/+	+	w/-	+	w/+	w/+	w/+	+	+	+
10 % MgCl2	+	-	+	+	w/+	-	w/+	w/+	+	+	w	-	+	-	+	-	w/+	w/+	w/+	w/+	+	+	+
2.5% NaCl	+	+	+	+	w/+	+	+	+	+	+	w	w/-	+	+	+	-	+	+	w/+	+	+	+	+
5.0% NaCl	+	+	+	+	w/+	+	w	w/+	+	+	w/-	-	+	+	+	-	+	w/+	w/+	w	+	+	+
10 % NaCl	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	w/+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1 % Cicloheximida	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	?	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+
0.05 % Cicloheximida	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+
0.01 % Cicloheximida	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+
Urease ágar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	w	w/-	-	-	w	w/+	-	-	+	+	+
30 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	w	-	+	+	+	+	+	+	+
37 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
40 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micosel	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	w	-	w	-	w	w	-	-	w	-	+	-	-	?	-	-	w	-	w	-	w	-	w
DNase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina auxiliar	w/-	-	w	w/+	w/+	-	-	-	-	-	+	w	+	+	+	-	-	-	w/+	w/+	-	-	-

Abreviações usadas: + crescimento; - nenhum crescimento; w crescimento reduzido; w/+ e w/- possível crescimento ou não em uma semana. 1 *Rinocladiella phaephora*; 2 a 10 *R. atrovirens*; 11 a 15 *Ramichloridium cerophilum*; 16 *R. anceps*; 17 a 23 isolados sapróbios.

Tabela 3. Testes fisiológicos de isolados do ambiente. Grupos *Cladophialophora* sp., *Exophiala* e *Phialophora verrucosa*.

	FE3	FE9	FE6IIB	FP4IIB	FP14PL	FE11IA	FE4IIB
	1	2	3	4	5	6	7
D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	w	+	+	+	w	w
D-Glicosamina	w/+	w	w	w	w/+	+	+
D-Ribose	-	+	w	+	+	+	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	+	w	w	w	+	+	w/+
L-Ramnose	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
α,α Trealose	+	+	+	+	+	+	+
Metil- α -D-Glicosídeo	w	+	+	+	-	-	-
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	w/-	+	+
Arbutina	+	+	+	+	w/+	+	+
Melibiose	-	+	+	w	-	+	+
Lactose	-	+	-	+	w/-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	w	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	w	-	-	w	w/-
Solução "Starch"	w	w	-	-	-	w/+	w/-
Glicerol	+	+	w	+	+	+	+
Meso-Eritritol	+	+	+	+	w/-	+	+
Ribitol	+	w	+	+	+	+	+
Xilitol	-	+	w	+	+	+	+
L-Arabinitol	w	+	w	w	+	w/+	+
D-Glucitol	+	+	+	w	+	+	+
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	w	+	w	w	-	-	-
Mioinositol	+	+	w	+	+	+	+
Glicano-d-lactona	+	+	w	+	w/+	+	w/+
D-Gliconato	+	w	+	+	-	w	w
D-Glicoronato	+	w	w	+	w	w	w
D-Galactonato	+	+	+	+	+	+	+
DL-Lactato	+	+	w	w	+	+	+
Succinato	+	w	w	+	w	+	w/+
Citrato	+	w	-	w/-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	w/+	w/+	w	w	+	+	w/+
Nitrato	+	+	+	+	w/+	+	+
Nitrito	+	w/-	+	w	+	+	+
Etilamina	+	+	w	w	w/+	w/+	+
L-Lisina	+	w	-	-	w/-	w	w/+
Cadaverina	+	+	+	+	+	+	+
Creatinina	+	+	w	-	-	+	+
Creatinine	+	+	w	-	-	+	+
2.5% MgCl2	+	+	+	+	+	+	+
5.0% MgCl2	+	+	+	w/+	+	+	+

Tabela 3 - continuação

	FE3	FE9	FE6IIB	FP4IIB	FP14PL	FE11IA	FE4IIB
	1	2	3	4	5	6	7
10 % MgCl ₂	w	+	+	w/+	+	+	+
2.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
5.0% NaCl	w	+	+	w/+	+	+	+
10 % NaCl	-	-	-	-	+	-	-
0.1 % Cicloheximida	+	+	+	+	+	+	+
0.05 % Cicloheximida	+	+	+	+	+	+	+
0.01 % Cicloheximida	+	+	+	+	+	+	+
Urease ágar	-	-	-	-	-	+	-
30 C	+	+	+	+	+	+	+
37 C	+	+	+	+	+	+	+
40 C	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação	-	-	-	-	-	-	-
Produção de ácido	-	-	-	-	-	-	-
Micosel	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	-	w	w	-	-	-
DNase	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina auxiliar	?	?	-	w/+	-	w/-	w/+

Abreviações usadas: + crescimento; - nenhum crescimento; w crescimento reduzido; w/+ e w/- possível crescimento ou não em uma semana. 1 = *P. verrucosa*; 2 = *Cladophialophora bantiana*; 3 = *Exophiala*; 4 = *Cladophialophora* sp.; 5 = *Exophiala*; 6 = *Cladophialophora*; 7 = *Exophiala jeanselmei*

Tabela 4. Testes fisiológicos de linhagens de *F. pedrosoi* isolados de pacientes com cromoblastomicose no Estado do Paraná.

	Fp28III	Fp31	Fp37II	Fp46I	Fp63I	Fp82	Fp65	Fp77
	1	2	3	4	5	6	7	8
D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	w/+	+	w	+	+	w	+	w/+
D-Glicosamina	w/+	w	w/+	w/-	w/+	w	+	w/-
D-Ribose	-	-	w/-	+	w/+	w/-	w/-	-
D-Xilose	+	+	+	+	+	w/+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	w	w/-	w/+	+	+	-	+	w/+
L-Ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	w/+	+	w/+
Maltose	+	+	+	+	+	w/+	+	+
α, α Trealose	+	+	+	+	+	+	+	w/+
Metil- α -D-Glicosídeo	+	w/+	+	-	+	w/-	+	+
Celbiose	+	+	+	+	+	w	w/+	w/+
Salicina	+	+	+	w/+	w/+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	+	+	+	+	+	w
Lactose	+	w/-	+	w/+	+	w/-	+	+
Rafinose	+	+	+	w/+	+	+	+	w/+
Melezitose	w/+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	w/-	w/-	-	-	-
Solução "Starch"	w/-	w/-	w/-	w	w/-	w/-	w/-	w/-
Glicerol	+	w/+	w/-	w/-	w	w	+	w/+
Meso-Eritritol	+	w	+	+	+	w/-	+	+
Ribitol	+	w	+	+	+	w/-	+	+
Xilitol	+	w/-	+	+	+	-	+	w/+
L-Arabinitol	w/+	w/-	+	w/+	+	w/+	+	w
D-Glucitol	w/+	w/+	w/+	w/+	w/+	w/+	+	w
D-Manitol	+	w/+	+	+	+	+	+	w/+
Galactitol	+	w/-	w	w/+	w	w/-	+	+
Mioinositol	w/-	-	w	+	+	-	w/+	w/-
Glicano-d-lactona	+	w/+	w/+	w	w/+	w	+	w/+
D-Gliconato	+	+	+	w	+	w	+	+
D-Glicoronato	w/+	+	+	+	+	w	+	w/+
D-Galactonato	w/-	w/+	w	w/+	w/-	w/-	w/-	w/-
DL-Lactato	-	-	-	-	-	w	-	-
Succinato	+	+	+	+	w/+	w	w/+	w
Citrato	+	w	w/+	+	w	w	w	w/-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	w/+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrito	+	+	+	+	+	+	+	+
Etilamina	+	w	w/+	+	+	w	w	w
L-Lisina	w/+	w	+	+	+	+	+	+

Tabela 4 - continuação

	Fp28III	Fp31	Fp37II	Fp46I	Fp63I	Fp82	Fp65	Fp77
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cadaverina	+	+	+	-	+	+	+	+
Creatinina	w	w	w/-	w	w/+	w/+	w/+	w
Creatinine	w	w	w/-	w/-	w	w/+	w/+	w
2.5% MgCl ₂	+	+	+	+	+	+	+	+
5.0% MgCl ₂	+	+	+	+	+	+	+	+
10 % MgCl ₂	+	w/-	w/-	+	w	w/+	+	w
2.5% NaCl	+	w/-	w	+	+	w/+	+	+
5.0% NaCl	w	-	w/-	+	+	-	+	+
10 % NaCl	-	-	-	+	-	-	-	-
0.1 % Cicloheximida	+	+	+	+	+	+	+	+
0.05 % Cicloheximida	+	+	+	+	+	+	+	+
0.01 % Cicloheximida	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease ágar	+	+	-	+	w	+	-	-
30 C	+	+	+	+	+	+	+	+
37 C	+	+	+	+	+	+	+	+
40 C	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de ácido	-	-	-	-	-	-	-	-
Micosel	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	-	-	w	-	-	-	-
DNase	-	-	-	w	-	-	-	-
Arbutina auxiliar	w	-	-	+	w	-	-	-

Abreviações usadas: + crescimento; - nenhum crescimento; w crescimento reduzido; w/+ e w/- possível crescimento ou não em uma semana. Linhagens de *F. pedrosoi* isoladas de pacientes.

ANEXO C: Sequências ITS das linhagens com “introns” (*Fonsecaea pedrosoi* CBS 212.77, Fp37 e Fp77 e *Cladophialophora* sp FP4IIB) no domínio variável da sub-unidade menor 18S do DNAr. Programa de alinhamento utilizado “Clustal X 1.8” (Thompson *et al.*, 1997). Os pontos representam seqüência idênticas; Traços os “gaps” necessários para alinhamento; Região na cor amarela corresponde a seqüência “intron”; Região na cor alaranjada, seqüência do “primer” ITS1; Região na cor verde, início da região 28S. N = A, T, C ou G. Y = C ou T.

Região 18S (domínio variável)

	*	20	*	40	*	60	*	80	
CBS 212.77	:	TTTCCGTC	CC-CRAGT	CAGACAGAGT	GCCTTCCTT	CTGTTAGGT	GAAC-CTT	CCGCGAGCCTTAGCAGCCC	GGAAGGTAGCCCTC
FP4IIB	:C	TT.....A	.A.....
Fp77	:	..TG	.GA..G	..N.TTTNCNA	NN..C.C	..N.NC.NTN
Fp37	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>F. compacta</i>									
<i>Cladophialophora sp</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
CBS 212.77	:	CGCGACTGAGT	-AAATA	CAGACAGAGT	GCCTTGAAT	GCTAGT	CAGTCTCGA	ACTGGCGCACTGCCCAANTTGC	-GGGGACACCCCTA
FP4IIB	:	.A.....TG	.T.....A
Fp77	:	N.N.....	N.....N	..GNN	N.N.....N	T.N..N.....
Fp37	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>F. compacta</i>									
<i>Cladophialophora sp</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
CBS 212.77	:	AAGACTTGACA	CCAGCCCACTCGGAA	CGGTGCTGGCCGAGCTA	AAATTTGCCCTGGTAT	TGC-TAATA	TACTCAAGGTATGAGA		
FP4IIB	:
Fp77	:	NN.....NN	..NN	..N..AMN	N.....G	..AC	..N..N
Fp37	:	GG.C..BA	.CTT..C	.G.NCATN	G..A	..C	..G	..N-N
<i>F. compacta</i>									
<i>Cladophialophora sp</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
CBS 212.77	:	CTCCCTCCGC	CAGGGGGGAAAGTCCGARA	TGGGCAATCGGCA	GCGCAGCCG	AGTCCCTACAGCCTTCCCTTTG	CCGGGGAGCCACCG		
FP4IIB	:TG	..G..TTG	..GG	..T
Fp77	:	..N.....NNH.N	..AAN	N.N	..NAN	..AN
Fp37	:	C...G	..AGG	..A	..ANNNNA	..CN
<i>F. compacta</i>									
<i>Cladophialophora sp</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
CBS 212.77	:	ACGCTGTTCA	CAGCCCAANTGGTAGTGGGTGAA	CC--TATTAGGT	--TCGCTTA	AGATATGGT	CGGTCTCTG	GGGCGAAGCCCG	
FP4IIB	:
Fp77	:	..N..NN	..NN	N	..NN	..N	..N	..N
Fp37	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>F. compacta</i>									
<i>Cladophialophora sp</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									
<i>F. pedrosoi</i>									

	440	460	480	500	*
<i>F. compacta</i>	* GGCTAAAGTTTCACTGAAACCTCCACAAACGTTCCGTAAGTAAACCTCAGGAAAGGATCAATLAAATGA-GTTAGGCTCTCCTAGGCC				*
<i>Cladophialalophora</i> sp	FP4IIB :				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp77 :				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp37 :				*
<i>F. compacta</i>	520 * 540 * 560 * 580 *				*
<i>Cladophialalophora</i> sp	FP4IIB : C-GACCTCCMACCCTTTGGCTTACTAGACCTCA-GTTGCTTCGGCAGG-CCCGTCTTAATCCGA---CCGCTGGAGGACCGCTA)				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp77 :				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp37 :				*
<i>F. compacta</i>	600 * 620 * 640 * 660 * 680				*
<i>Cladophialalophora</i> sp	FP4IIB : ATGCGGGTGTACCTTNTGGCCAGTGTCTT-GCCGATAGCCCTAATCTTCT--ACTCT--GGATCAATCATGATTTACAATGGCTA)				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp77 :				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp37 :				*
<i>F. compacta</i>	* 700 * 720 * 740 * 760				*
<i>Cladophialalophora</i> sp	FP4IIB : AATGAT-TTTTTCAATT--AAAAGCAAACTTTT--AACACCG-ATTTNTTGGTTTT---GCTTNAATTAACACCCA--CCN)				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp77 :				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp37 :				*
<i>F. compacta</i>	* 780 * 800 * 820 * 840 *				*
<i>Cladophialalophora</i> sp	FP4IIB : AATGCNATAAGNATTGCNAATGC--AAAATNCAGGAGNNTNNAATNTTTRACC--ATTGNCCTTGGNT-----]				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp77 :				*
<i>F. pedrosoi</i>	Fp37 :				*

ITS1 58S

	5.8S		ITS2									
	860	*	880	*	900	*	920	*	1000	*	1020	*
<i>F. compacta</i>	-----]											
CBS 212.77	:-----]											
FP4IIB	:-----]											
<i>Cladophialalophora sp</i>	:-----]											
<i>F. pedrosoi</i>	: NATNNCCCTAACCNHNTTGGHTNN											
<i>F. pedrosoi</i>	: CATGCCCTGTCGAGCGTCATTATCACCCCTCAAGCCCTGCTTGGTTGGACGGCTTGGTGGAGCGAFTTCA CACTTTCCA											
	940	*	960	*	980	*	1000	*	1020			
<i>F. compacta</i>	-----]											
CBS 212.77	:-----]											
FP4IIB	:-----]											
<i>Cladophialalophora sp</i>	:-----]											
<i>F. pedrosoi</i>	:-----]											
<i>F. pedrosoi</i>	: CCCCTCTAAGACRATGACGGGGCCCTGGGNAACCCCGGTACACTGAGCTCTTTATTGAGCACGTATCGGATGAAGGGTGCC											
	ITS2											
	*	1040	*	1060	*	1080	*	1100				
<i>F. compacta</i>	-----]											
CBS 212.77	:-----]											
FP4IIB	:-----]											
<i>Cladophialalophora sp</i>	:-----]											
<i>F. pedrosoi</i>	: CGGSAACCGGTCCTTCCTCACGGGAACACTTTTTTTTAAAGTTGACCTCGGATCAAAAAGGAATACGGCAGNCCCNAAGAA											
<i>F. pedrosoi</i>	:-----]											
<i>F. pedrosoi</i>	:-----]											

ANEXO D: Alinhamento das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do DNA ribossômico de linhagens referências de *Fonsecaea*, *Ramichloridium* e isolados sapróbios correlacionados. Programa de alinhamento utilizado “Clustal X 1.8” (Thompson *et al.*, 1997). Os pontos representam seqüência idênticas; Traços os “gaps” necessários para alinhamento.

	20	40	60	80
<i>F. compacta</i>	ATCATTAAT	GAGTTAGGGTCTC-C-TAGGGCCGACCTGCGCAACCGTTTTCCTTAGACCC-TCAAGTTGCTT	CHGACGGCCCG	
<i>R. anceps</i>	TC	CTCATAAG.C	TC.A.T.TAGT	T.....T
<i>R. atrovirens</i>	CC	CTCT.AGG.C	A.T.TG.T.TAGT	T.....T
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. compacta</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>Cladophialophora sp</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>Ramichloridium sp</i>				
<i>F. pedrosoi</i>				
<i>Cladophialophora sp</i>				
<i>C. hantiana</i>				
<i>Ramichloridium sp</i>				
<i>Ramichloridium sp</i>				
<i>Fonsecaea sp</i>				
<i>Fonsecaea sp</i>				
<i>Ramichloridium sp</i>				
<i>R. anceps</i>				
<i>R. anceps</i>				
<i>R. phaeophora</i>				
<i>R. anceps</i>				
<i>R. atrovirens</i>				
<i>R. atrovirens</i>				
<i>R. atrovirens</i>				
<i>R. atrovirens</i>				
<i>R. atrovirens</i>				
<i>R. atrovirens</i>				
<i>R. atrovirens</i>				
<i>R. cerophallium</i>				

	180	*	200	*	220	*	240	*
<i>F. compacta</i>	C--T-AACTC-T--GGATCAATCA--TGATTTACRAATGCTAAAGTGAATTT--ATTCAATTAAAA--GCMAAAACTTTCCAAACA							
<i>R. anceps</i>	TATAA..T..T....A..CT..A..G....TC....TC.....G..A..G..CT..T..A...G....							
<i>R. atrovirens</i>	TCCAA..T..T....A..CT..A..G....TC....TC.....G..A..AACGTC..T..A...G....							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>F. compacta</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>Cladophialophora sp</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>Ramichloridium sp</i>							
<i>F. pedrosoi</i>							
<i>Cladophialophora sp</i>							
<i>C. bantiana</i>							
<i>Ramichloridium sp</i>							
<i>Ramichloridium sp</i>							
<i>Fonsecaea sp</i>							
<i>Fonsecaea sp</i>							
<i>Ramichloridium sp</i>							
<i>R. anceps</i>							
<i>R. anceps</i>							
<i>R. phaeophora</i>							
<i>R. anceps</i>							
<i>R. atrovirens</i>							
<i>R. atrovirens</i>							
<i>R. atrovirens</i>							
<i>R. atrovirens</i>							
<i>R. anceps</i>							
<i>R. carophillum</i>							

	360	380	400	420
	* ATCTTTGAA CGGACATTCG - GCCCTTTGGTATTCGGAAGGGCAATCCCTGTTCG - AGCGTCATTA TCAACCCCTCC - TCBAAGCCCTGTG -			
<i>F. compacta</i>	CBS 212.77			
<i>R. anceps</i>	CBS 101.460			
<i>R. atrovirens</i>	CBS 677.76			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 272.37			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS Fp77			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS Fp28III			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 271.37			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 253.49			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 201.31			
<i>F. compacta</i>	CBS 659.76			
<i>F. pedrosoi</i>	Fp63I			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 444.62			
<i>Cladophialophora sp</i>	FP8D			
<i>F. pedrosoi</i>	Fp65			
<i>F. pedrosoi</i>	Fp82			
<i>Ramichloridium sp</i>	F1PLE			
<i>F. pedrosoi</i>	FESP4			
<i>Cladophialophora sp</i>	F10PLA			
<i>C. bantiana</i>	FE9			
<i>Ramichloridium sp</i>	FP4IIB			
<i>Ramichloridium sp</i>	FE10IIB1			
<i>Fonsecaea sp</i>	FEJII			
<i>Fonsecaea sp</i>	F9PRA			
<i>Ramichloridium sp</i>	F11PLA			
<i>R. anceps</i>	CBS 157.54			
<i>R. anceps</i>	CBS 181.65			
<i>R. phaeophora</i>	CBS 496.78			
<i>R. anceps</i>	CBS 403.76			
<i>R. atrovirens</i>	CBS 380.59			
<i>R. atrovirens</i>	CBS 688.76			
<i>R. atrovirens</i>	CBS 689.76			
<i>R. atrovirens</i>	CBS 685.76			
<i>R. anceps</i>	CBS 397.76			
<i>R. cerophilium</i>	CBS 283.92			

58S ITS2

	440	460	480	500
<i>f. compacta</i>	---TGCATGGTGTGGACG	---GCTTGTGGAGCGGAGTTCACACTT	---T---CCACCCCTCTTAAAGACAAATACACGGCG	---
<i>R. anceps</i>	---	---T---CT..G..	---CTCC---CTAG.	---C...T..
<i>R. atrovirens</i>	---	---T---CA..AG..GTCCG..C..CC	---CTAG.	---C...T..
<i>f. pedrosoi</i>	---	---	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---	---	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---	---	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---	---	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---	---	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---	---	---	---
<i>f. compacta</i>	---	---	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---C..	---	---	---
<i>Cladophialophora sp</i>	---	---TA..	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---	---TA..	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---	---TA..	---	---
<i>Ramichloridium sp</i>	---	---TA..	---	---
<i>f. pedrosoi</i>	---	---TA..	---	---
<i>Cladophialophora sp</i>	---	---T..A..IA..	---C---T	---
<i>C. hantiana</i>	---	---T..A..I..	---C---T	---G..
<i>Ramichloridium sp</i>	---	---A..IT..	---CC..	---
<i>Ramichloridium sp</i>	---	---TA..	---C.C.C	---G..
<i>fonsecaea sp</i>	---	---TA..	---A.CTC	---G..
<i>fonsecaea sp</i>	---	---TA..	---CTC	---G..
<i>Ramichloridium sp</i>	---	---T..	---C.T.T..TC	---G..
<i>R. anceps</i>	---G..	---A..	---TCT.C---C.CGGG---G---AT	---C..TT..
<i>R. phaeophora</i>	---G..	---A..	---T---C---C.CGGG---G---A..	---C..TT..
<i>R. anceps</i>	---G.T..	---T..	---CCTTTC..	---C..TT..
<i>R. atrovirens</i>	---G..	---CTC.GC..	---C.CC---G---AG	---T..
<i>R. atrovirens</i>	---G.T..	---C.G..	---G.CC---G	---C..
<i>R. atrovirens</i>	---G.T..	---C.G..	---G.CC---G	---C..
<i>R. atrovirens</i>	---G.T..	---C.G..	---G.CC---G	---C..
<i>R. atrovirens</i>	---G.T..	---C.G..	---G.CC---G	---C..
<i>R. atrovirens</i>	TTGC..	TAACCA..G.CTCCTAAC.T..	C.TT.GAC.G.TGGTTCGAG-TAATCGA.	---C...T..
<i>R. cerophyllum</i>	---	---C..G..	---A..G.CT..	---G.CC---T---CT..T

	520	540	560	580
<i>F. compacta</i>	CBS 212.77	: GCCT-GCGGACCCCGGTACACTGAGCTTCTTTATTG-AGCACGTATCGGA--TG-----AAGGTTGC-CCGGGACCGGHTCTT		
<i>R. anceps</i>	CBS 101.460	: G...TT.G		
<i>R. atrovirens</i>	CBS 677.76	: A...A.CG		TTTTC.G.AC--A...C.A
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 272.37	: G...TTGG		CCTTG.G.TC--A...C
<i>f. pedrosoi</i>	CBS Fp77			
<i>f. pedrosoi</i>	CBS Fp28III			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 271.37			
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 253.49			..G
<i>f. pedrosoi</i>	CBS 201.31			
<i>F. compacta</i>	CBS 659.76			
<i>f. pedrosoi</i>	Fp63I			
<i>f. pedrosoi</i>	CBS 444.62	: A.C		
<i>Cladophialophora sp</i>	FP8D	: A.C		
<i>f. pedrosoi</i>	Fp65	: A.C		
<i>f. pedrosoi</i>	Fp82	: A.C		
<i>Ramichloridium sp</i>	F1PLE	: A.C		
<i>f. pedrosoi</i>	FE5P4	: A.C		
<i>Cladophialophora sp</i>	F10PLA	: T		
<i>C. hantiana</i>	FE9	: A.C		
<i>Ramichloridium sp</i>	FP4IB	: A.C		
<i>Ramichloridium sp</i>	FE10IB1	: A.C		
<i>Fonsecaea sp</i>	FE5II	: A.C		
<i>Fonsecaea sp</i>	F9PRA	: A.C		
<i>Ramichloridium sp</i>	F11PLA	: T.A.CC		
<i>R. anceps</i>	CBS 157.54	: TG		T--CCTTA-AGC.TCAA.A.T.T
<i>R. anceps</i>	CBS 181.65	: TT		T--CCTTA-AGT.TCAA.G.TGT
<i>R. phaeophora</i>	CBS 496.78	: TC.G		TAT.TT--GT.T.G--A.CTT
<i>R. anceps</i>	CBS 403.76	: ATT--GT.G		T--C--T.G.CCA--GATCC
<i>R. atrovirens</i>	CBS 380.59	: T.T.TCTG		AC--G.G.T--G...C.A
<i>R. atrovirens</i>	CBS 688.76	: T.T.TCTG		AC--G.G.T--G...C.A
<i>R. atrovirens</i>	CBS 689.76	: T.T.TCTG		AC--G.G.TC--G...C.A
<i>R. atrovirens</i>	CBS 685.76	: T.T.TCTG		AC--G.G.TC--G...C.A
<i>R. anceps</i>	CBS 397.76	: T...TTGG		CCCTTAA.G.TC.GGAG.AC.TA
<i>R. cerophilium</i>	CBS 283.92	: GACG.TTCG.TT		GAC.A...ACG.G.C.TA

	600	*	620	*
<i>F. compacta</i>	CBS 212.77	: C-----TCCCTCACGGGAAACACCTTTT-----AAGGTTGACC		
<i>R. anceps</i>	CBS 101.460	: -----A.A.CT.T-----A.C....AAC.....GG		
<i>R. atrovirens</i>	CBS 677.76	: -----A.A.CT.TA-----C.....AC.....		
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 272.37	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	CBS Fp77	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	CBS Fp28III	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 271.37	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 253.49	: -----A.....A.G.T.GAC.--		
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 201.31	: -----		
<i>F. compacta</i>	CBS 659.76	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	Fp63I	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	CBS 444.62	: -----		
<i>Cladophialophora sp</i>	Fp8D	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	Fp65	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	Fp82	: -----		
<i>Ramichloridium sp</i>	F1PLE	: -----		
<i>F. pedrosoi</i>	Fp3P4	: -----		
<i>Cladophialophora sp</i>	F10PLA	: -----		
<i>C. bantiana</i>	Fp9	: -----		
<i>Ramichloridium sp</i>	Fp4IIB	: -----		
<i>Ramichloridium sp</i>	Fp10IIB1	: -----		
<i>Fonsecaea sp</i>	Fp3II	: A---A.T..C.T.--GGG.AAA.....C.C.--		
<i>Fonsecaea sp</i>	Fp9RA	: -----		
<i>Ramichloridium sp</i>	F11PLA	: -----		
<i>R. anceps</i>	CBS 157.54	: ---TC.....G...G.AGAAA...C.A---		
<i>R. anceps</i>	CBS 181.65	: ---TC.....G...G.AGAAA...C.A---		
<i>R. phaeophora</i>	CBS 496.78	: TGTGT...GTCAT.G...CC.....C.....		
<i>R. anceps</i>	CBS 403.76	: ---T...T.A...GGA.AA...C.C---		
<i>R. atrovirens</i>	CBS 380.59	: ---TC...T...AGGG.AA...C.C---		
<i>R. atrovirens</i>	CBS 688.76	: ---TC...T...AGGG.AA...C.C---		
<i>R. atrovirens</i>	CBS 689.76	: ---TC...T...AGGG.AA...C.C---		
<i>R. atrovirens</i>	CBS 685.76	: ---TC...T...AGGG.AA...C.C---		
<i>R. anceps</i>	CBS 397.76	: ---C.A.CT.T-----A....AAC.....		
<i>R. cerophyllum</i>	CBS 283.92	: -----		

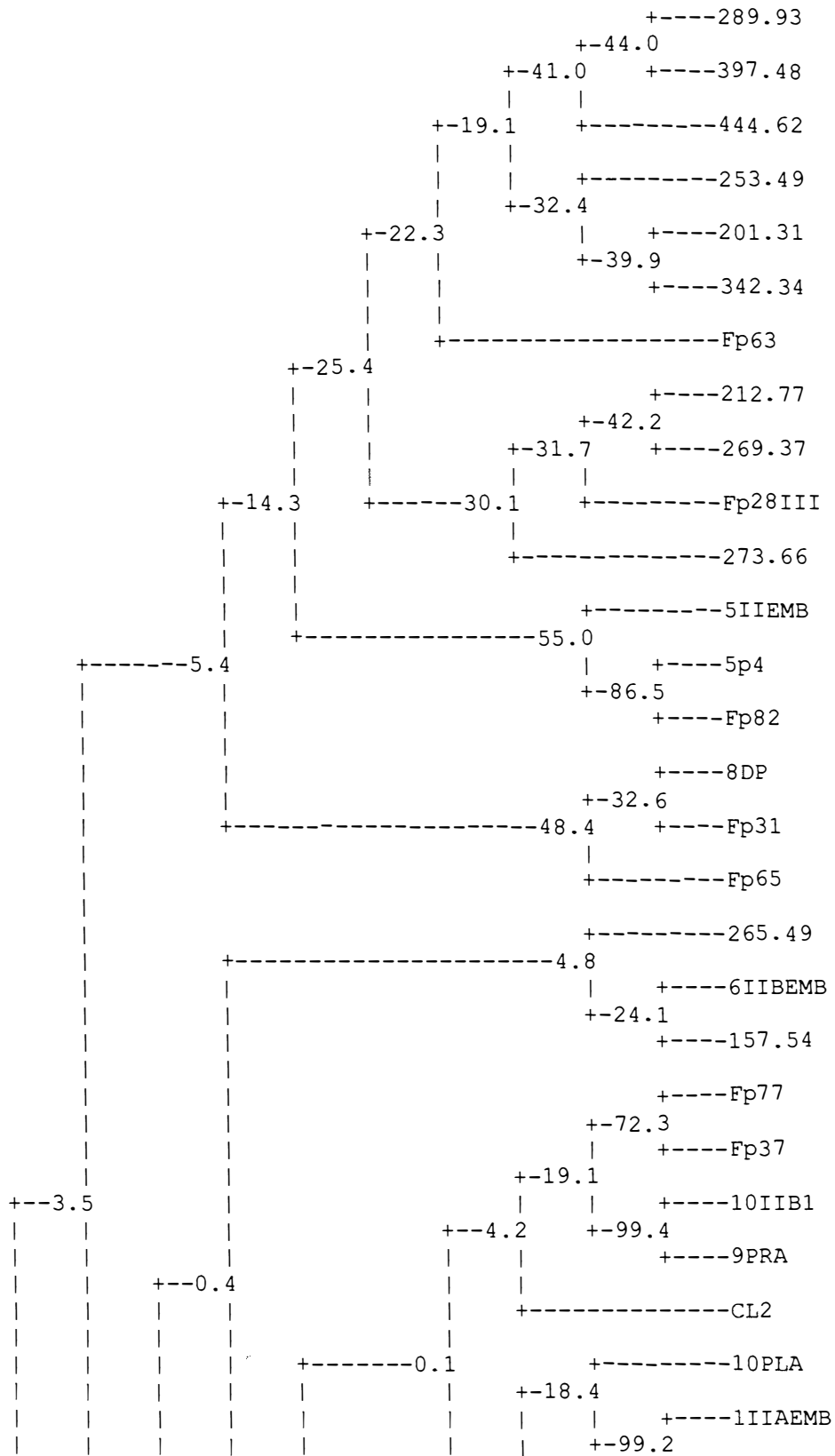
ANEXO E: Matriz de similaridade genética obtida com coeficiente de Jaccard, a partir dos dados de RAPD.

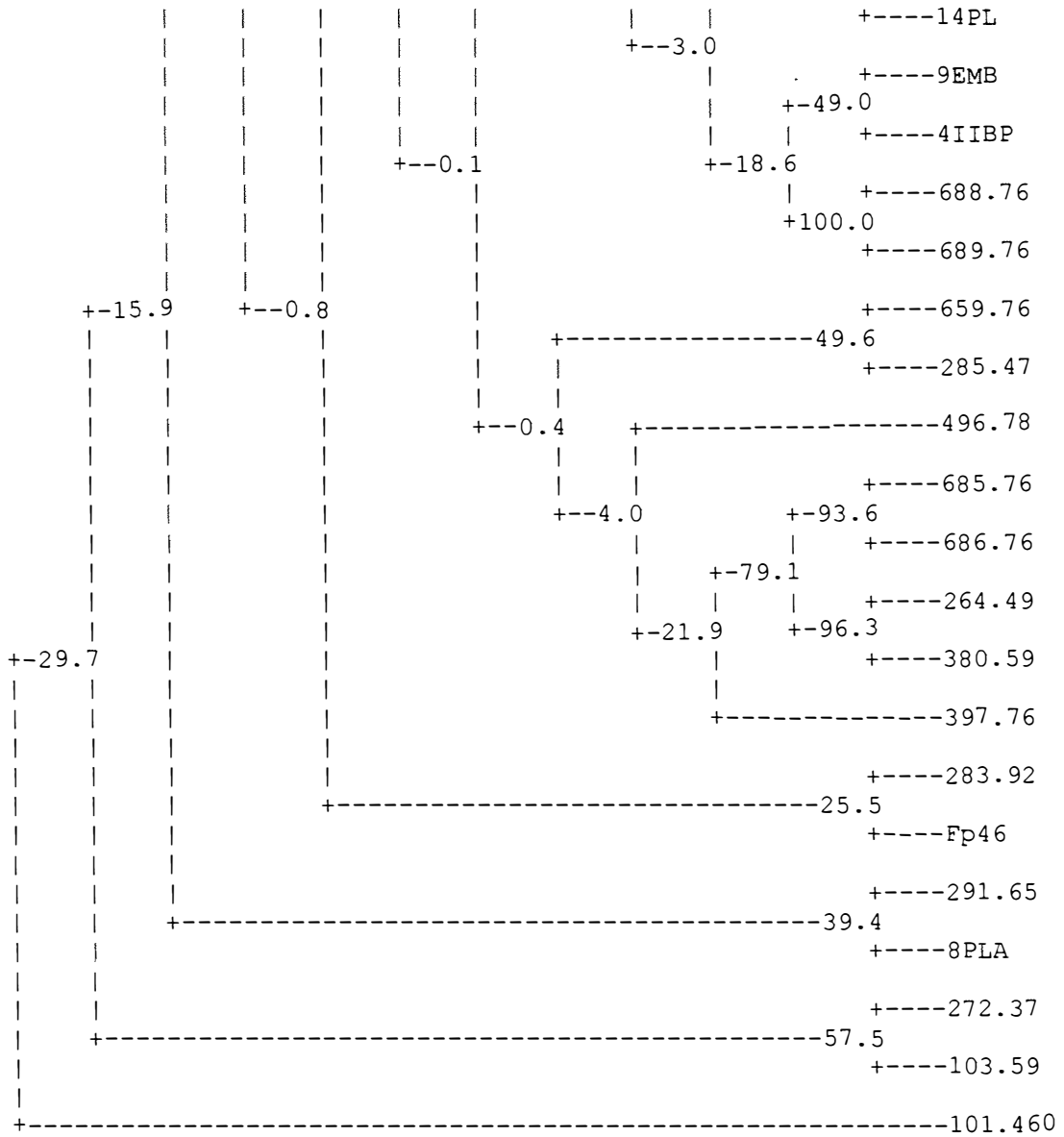
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1,000															
2	0,108	1,000														
3	0,355	0,132	1,000													
4	0,643	0,119	0,371	1,000												
5	0,542	0,027	0,345	0,654	1,000											
6	0,538	0,139	0,556	0,533	0,609	1,000										
7	0,298	0,216	0,400	0,367	0,234	0,386	1,000									
8	0,286	0,237	0,321	0,322	0,232	0,286	0,632	1,000								
9	0,282	0,159	0,529	0,400	0,343	0,471	0,614	0,439	1,000							
10	0,406	0,179	0,621	0,594	0,556	0,667	0,435	0,400	0,571	1,000						
11	0,277	0,173	0,409	0,435	0,357	0,333	0,620	0,484	0,556	0,477	1,000					
12	0,264	0,214	0,255	0,304	0,255	0,288	0,354	0,523	0,351	0,333	0,359	1,000				
13	0,131	0,207	0,164	0,210	0,119	0,131	0,364	0,423	0,254	0,233	0,348	0,352	1,000			
14	0,208	0,229	0,132	0,280	0,146	0,115	0,317	0,324	0,214	0,189	0,258	0,349	0,299	1,000		
15	0,345	0,081	0,281	0,500	0,500	0,500	0,333	0,268	0,361	0,467	0,405	0,179	0,236	0,118	1,000	
16	0,224	0,200	0,281	0,283	0,214	0,268	0,415	0,493	0,306	0,310	0,358	0,508	0,370	0,309	0,228	1,000
17	0,173	0,192	0,235	0,196	0,160	0,220	0,414	0,368	0,315	0,200	0,373	0,333	0,475	0,234	0,250	0,373
18	0,243	0,093	0,333	0,300	0,265	0,278	0,264	0,300	0,273	0,342	0,269	0,327	0,210	0,164	0,250	0,351
19	0,206	0,024	0,303	0,205	0,226	0,242	0,265	0,237	0,244	0,243	0,271	0,283	0,129	0,180	0,176	0,309
20	0,235	0,103	0,257	0,231	0,147	0,200	0,286	0,276	0,209	0,270	0,292	0,190	0,183	0,154	0,206	0,217
21	0,079	0,131	0,148	0,138	0,066	0,097	0,271	0,351	0,200	0,141	0,239	0,284	0,293	0,284	0,081	0,375
22	0,224	0,109	0,240	0,245	0,188	0,224	0,373	0,394	0,250	0,250	0,311	0,500	0,271	0,368	0,180	0,468
23	0,140	0,179	0,117	0,183	0,148	0,140	0,229	0,293	0,190	0,148	0,214	0,353	0,324	0,361	0,143	0,412
24	0,114	0,250	0,139	0,125	0,091	0,114	0,176	0,246	0,140	0,128	0,157	0,245	0,133	0,213	0,027	0,228
25	0,083	0,111	0,108	0,098	0,125	0,083	0,176	0,183	0,225	0,128	0,229	0,245	0,172	0,188	0,118	0,207
26	0,082	0,175	0,133	0,143	0,068	0,082	0,243	0,273	0,206	0,145	0,246	0,292	0,357	0,273	0,083	0,293
27	0,109	0,182	0,104	0,188	0,143	0,133	0,161	0,169	0,196	0,191	0,164	0,258	0,212	0,327	0,111	0,206
28	0,093	0,116	0,114	0,104	0,073	0,093	0,193	0,215	0,118	0,156	0,155	0,175	0,333	0,140	0,122	0,219
29	0,093	0,250	0,173	0,083	0,057	0,113	0,290	0,247	0,211	0,143	0,234	0,211	0,333	0,283	0,094	0,286
30	0,100	0,133	0,167	0,083	0,071	0,138	0,200	0,102	0,162	0,118	0,152	0,111	0,069	0,133	0,067	0,164
31	0,118	0,137	0,180	0,167	0,102	0,163	0,238	0,203	0,196	0,170	0,203	0,254	0,303	0,230	0,120	0,275
32	0,058	0,167	0,075	0,109	0,061	0,058	0,288	0,261	0,204	0,132	0,293	0,224	0,292	0,259	0,102	0,265
33	0,082	0,149	0,146	0,073	0,064	0,082	0,156	0,250	0,167	0,160	0,141	0,212	0,302	0,203	0,083	0,217
34	0,082	0,241	0,133	0,143	0,105	0,119	0,381	0,361	0,288	0,183	0,344	0,292	0,357	0,273	0,140	0,311
35	0,130	0,240	0,235	0,098	0,055	0,130	0,242	0,310	0,203	0,179	0,227	0,294	0,304	0,274	0,091	0,353
36	0,089	0,148	0,145	0,136	0,074	0,089	0,302	0,348	0,268	0,138	0,306	0,313	0,324	0,274	0,111	0,278
37	0,068	0,164	0,182	0,150	0,053	0,086	0,217	0,234	0,159	0,153	0,203	0,216	0,296	0,227	0,107	0,205
38	0,048	0,071	0,070	0,064	0,025	0,048	0,182	0,169	0,102	0,043	0,143	0,164	0,159	0,148	0,075	0,210
39	0,075	0,160	0,113	0,167	0,059	0,096	0,200	0,236	0,136	0,148	0,167	0,217	0,265	0,190	0,120	0,189
40	0,153	0,113	0,148	0,175	0,083	0,097	0,236	0,333	0,182	0,123	0,205	0,284	0,311	0,323	0,117	0,286
41	0,102	0,058	0,191	0,132	0,109	0,102	0,136	0,178	0,143	0,135	0,175	0,191	0,186	0,161	0,104	0,250
42	0,091	0,065	0,220	0,149	0,098	0,171	0,232	0,176	0,208	0,233	0,193	0,190	0,222	0,179	0,175	0,234
43	0,133	0,169	0,186	0,194	0,121	0,133	0,254	0,316	0,238	0,197	0,257	0,357	0,347	0,323	0,136	0,394
44	0,141	0,194	0,190	0,179	0,111	0,141	0,362	0,382	0,239	0,182	0,329	0,333	0,437	0,319	0,161	0,387
45	0,089	0,064	0,041	0,122	0,122	0,089	0,186	0,191	0,204	0,125	0,169	0,206	0,219	0,218	0,143	0,194
46	0,121	0,154	0,206	0,159	0,076	0,138	0,319	0,359	0,200	0,162	0,288	0,365	0,338	0,333	0,090	0,346
47	0,164	0,161	0,200	0,207	0,151	0,164	0,349	0,371	0,233	0,190	0,313	0,338	0,348	0,323	0,167	0,301

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
17	1,000															
18	0,314	1,000														
19	0,265	0,516	1,000													
20	0,167	0,371	0,303	1,000												
21	0,203	0,156	0,150	0,207	1,000											
22	0,350	0,294	0,356	0,192	0,354	1,000										
23	0,323	0,224	0,200	0,175	0,453	0,328	1,000									
24	0,154	0,216	0,212	0,139	0,155	0,180	0,164	1,000								
25	0,200	0,184	0,212	0,139	0,175	0,180	0,280	0,152	1,000							
26	0,225	0,180	0,196	0,193	0,343	0,211	0,319	0,204	0,204	1,000						
27	0,200	0,163	0,182	0,082	0,234	0,203	0,288	0,136	0,136	0,242	1,000					
28	0,172	0,128	0,143	0,167	0,190	0,196	0,161	0,179	0,179	0,217	0,184	1,000				
29	0,311	0,140	0,154	0,151	0,261	0,234	0,292	0,160	0,289	0,371	0,250	0,294	1,000			
30	0,080	0,026	0,133	0,129	0,173	0,178	0,137	0,032	0,143	0,135	0,128	0,111	0,156	1,000		
31	0,258	0,145	0,160	0,093	0,328	0,283	0,281	0,143	0,191	0,339	0,172	0,208	0,288	0,136	1,000	
32	0,246	0,173	0,217	0,239	0,297	0,210	0,290	0,200	0,317	0,421	0,222	0,240	0,370	0,171	0,286	1,000
33	0,254	0,135	0,125	0,146	0,350	0,159	0,258	0,156	0,209	0,274	0,280	0,364	0,333	0,070	0,273	0,259
34	0,318	0,161	0,196	0,236	0,306	0,265	0,338	0,161	0,204	0,484	0,262	0,259	0,371	0,180	0,317	0,688
35	0,262	0,241	0,265	0,145	0,254	0,286	0,284	0,176	0,176	0,261	0,241	0,308	0,356	0,149	0,219	0,246
36	0,262	0,117	0,192	0,189	0,328	0,266	0,284	0,154	0,154	0,706	0,220	0,193	0,379	0,125	0,345	0,407
37	0,254	0,232	0,164	0,226	0,358	0,221	0,294	0,148	0,148	0,459	0,254	0,228	0,344	0,120	0,212	0,300
38	0,204	0,163	0,216	0,122	0,108	0,164	0,169	0,103	0,162	0,228	0,146	0,159	0,260	0,057	0,173	0,229
39	0,200	0,189	0,137	0,180	0,371	0,203	0,323	0,143	0,120	0,431	0,259	0,164	0,267	0,111	0,233	0,286
40	0,290	0,175	0,169	0,250	0,352	0,313	0,274	0,081	0,136	0,237	0,254	0,210	0,243	0,089	0,269	0,258
41	0,172	0,176	0,170	0,143	0,344	0,298	0,234	0,104	0,178	0,194	0,161	0,220	0,281	0,119	0,246	0,131
42	0,169	0,200	0,324	0,163	0,226	0,236	0,197	0,093	0,146	0,345	0,229	0,222	0,367	0,108	0,204	0,286
43	0,254	0,175	0,190	0,186	0,333	0,333	0,368	0,175	0,241	0,237	0,234	0,210	0,225	0,130	0,250	0,258
44	0,403	0,254	0,233	0,230	0,423	0,274	0,420	0,143	0,220	0,435	0,235	0,311	0,353	0,100	0,324	0,375
45	0,167	0,170	0,163	0,159	0,185	0,169	0,254	0,067	0,263	0,230	0,200	0,120	0,133	0,135	0,158	0,333
46	0,319	0,250	0,271	0,188	0,478	0,343	0,303	0,197	0,123	0,370	0,232	0,174	0,329	0,155	0,282	0,290
47	0,371	0,250	0,275	0,200	0,415	0,292	0,391	0,189	0,212	0,324	0,210	0,224	0,317	0,140	0,286	0,274

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
33	1,000														
34	0,254	1,000													
35	0,254	0,299	1,000												
36	0,276	0,582	0,262	1,000											
37	0,246	0,328	0,254	0,292	1,000										
38	0,118	0,207	0,204	0,226	0,196	1,000									
39	0,207	0,297	0,219	0,279	0,818	0,173	1,000								
40	0,246	0,306	0,290	0,271	0,358	0,161	0,328	1,000							
41	0,218	0,127	0,250	0,154	0,283	0,208	0,224	0,302	1,000						
42	0,196	0,276	0,353	0,302	0,340	0,300	0,300	0,246	0,240	1,000					
43	0,191	0,288	0,348	0,203	0,319	0,125	0,288	0,600	0,344	0,226	1,000				
44	0,344	0,414	0,343	0,362	0,352	0,222	0,304	0,384	0,192	0,246	0,347	1,000			
45	0,107	0,271	0,167	0,228	0,180	0,104	0,179	0,283	0,167	0,188	0,328	0,206	1,000		
46	0,261	0,316	0,338	0,377	0,448	0,258	0,379	0,342	0,313	0,302	0,342	0,390	0,203	1,000	
47	0,242	0,343	0,288	0,308	0,318	0,133	0,306	0,353	0,200	0,220	0,296	0,672	0,197	0,380	1,000

ANEXO F: Dendrograma mostrando as relações fenéticas entre as 47 linhagens de fungos dematiáceos. Os valores da esquerda dos agrupamentos correspondem ao valor de P, ou seja, a porcentagem que este agrupamento apareceu nos 1000 dendrogramas gerados a partir da reamostragem “bootstrap”, com auxílio do programa “Winboot”. Coeficiente de similaridade utilizado: coeficiente Jaccard.





ANEXO G: Matriz de similaridade genética obtida com coeficiente Simple ("Simple Matching"), a partir dos dados de RAPD.

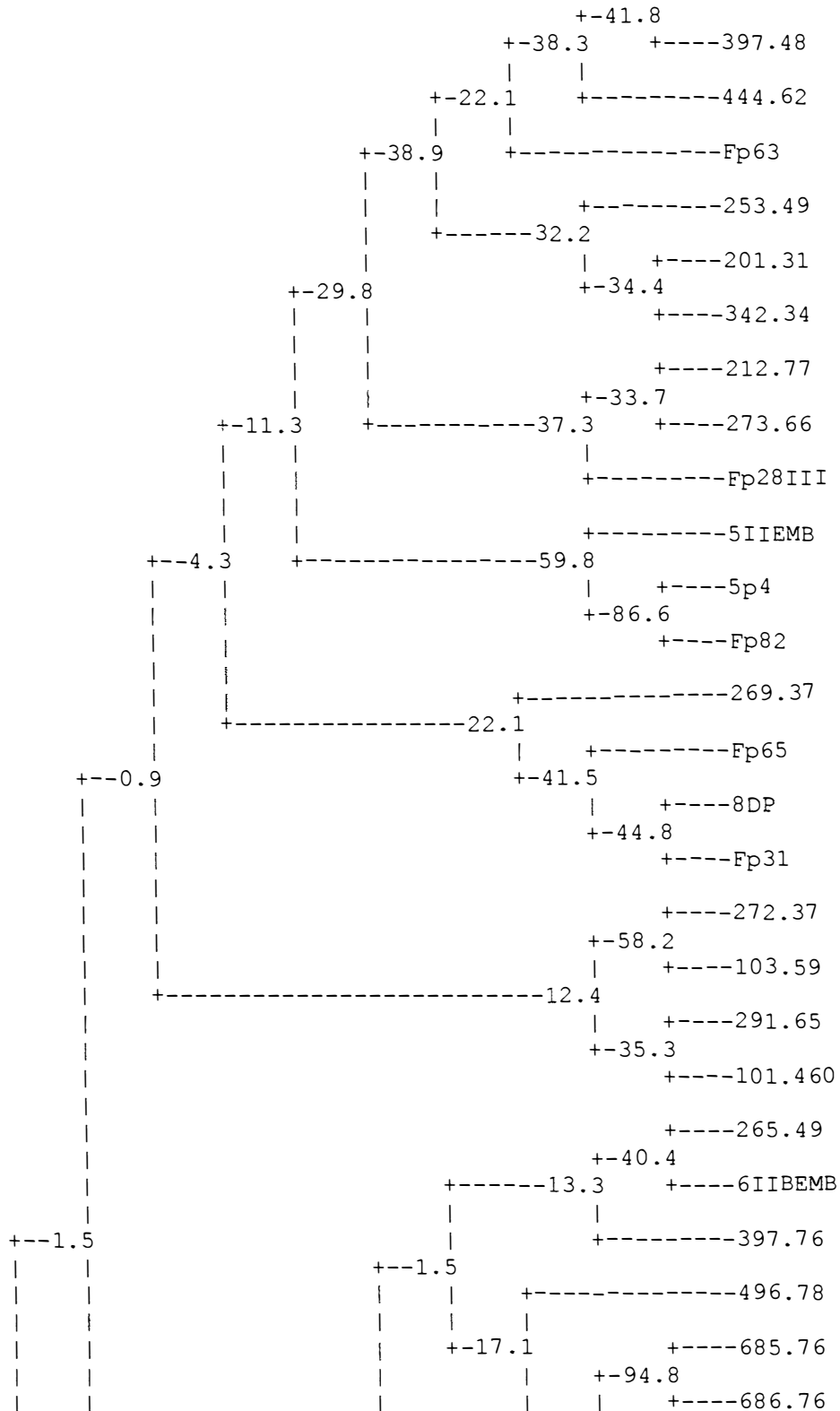
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1,000															
2	0,686	1,000														
3	0,810	0,686	1,000													
4	0,905	0,648	0,790	1,000												
5	0,895	0,657	0,819	0,914	1,000											
6	0,886	0,705	0,886	0,867	0,914	1,000										
7	0,686	0,619	0,743	0,705	0,657	0,743	1,000									
8	0,619	0,571	0,638	0,619	0,590	0,619	0,800	1,000								
9	0,733	0,648	0,848	0,771	0,781	0,829	0,838	0,695	1,000							
10	0,819	0,695	0,895	0,876	0,886	0,914	0,752	0,686	0,857	1,000						
11	0,676	0,590	0,752	0,752	0,743	0,714	0,819	0,695	0,810	0,781	1,000					
12	0,629	0,581	0,610	0,629	0,638	0,648	0,600	0,705	0,648	0,657	0,610	1,000				
13	0,495	0,562	0,514	0,533	0,505	0,495	0,600	0,610	0,552	0,562	0,590	0,562	1,000			
14	0,638	0,648	0,562	0,657	0,610	0,562	0,610	0,562	0,581	0,590	0,562	0,610	0,552	1,000		
15	0,819	0,676	0,781	0,857	0,886	0,876	0,714	0,610	0,781	0,848	0,762	0,562	0,600	0,571	1,000	
16	0,571	0,543	0,610	0,590	0,581	0,610	0,638	0,667	0,590	0,619	0,590	0,695	0,562	0,552	0,581	1,000
17	0,590	0,600	0,629	0,571	0,600	0,629	0,676	0,590	0,648	0,581	0,648	0,581	0,695	0,533	0,657	0,600
18	0,733	0,629	0,771	0,733	0,762	0,752	0,629	0,600	0,695	0,762	0,638	0,648	0,533	0,562	0,743	0,648
19	0,743	0,619	0,781	0,705	0,771	0,762	0,657	0,571	0,705	0,733	0,667	0,638	0,486	0,610	0,733	0,638
20	0,752	0,667	0,752	0,714	0,724	0,733	0,667	0,600	0,676	0,743	0,676	0,552	0,533	0,581	0,743	0,552
21	0,448	0,495	0,505	0,467	0,457	0,467	0,514	0,543	0,505	0,476	0,486	0,495	0,495	0,543	0,457	0,571
22	0,638	0,533	0,638	0,619	0,629	0,638	0,648	0,619	0,600	0,629	0,600	0,724	0,514	0,657	0,610	0,686
23	0,533	0,562	0,495	0,533	0,562	0,533	0,486	0,495	0,514	0,505	0,476	0,581	0,543	0,629	0,543	0,619
24	0,705	0,771	0,705	0,667	0,714	0,705	0,600	0,590	0,648	0,676	0,590	0,619	0,505	0,648	0,657	0,581
25	0,686	0,695	0,686	0,648	0,733	0,686	0,600	0,533	0,705	0,676	0,648	0,619	0,543	0,629	0,714	0,562
26	0,467	0,552	0,505	0,486	0,476	0,467	0,495	0,467	0,524	0,495	0,505	0,514	0,571	0,543	0,476	0,495
27	0,610	0,657	0,590	0,629	0,657	0,629	0,505	0,438	0,610	0,638	0,514	0,562	0,505	0,667	0,619	0,486
28	0,629	0,638	0,629	0,590	0,638	0,629	0,562	0,514	0,571	0,638	0,533	0,505	0,638	0,533	0,657	0,524
29	0,533	0,657	0,590	0,476	0,524	0,552	0,581	0,476	0,571	0,543	0,533	0,467	0,581	0,590	0,543	0,524
30	0,743	0,752	0,762	0,686	0,752	0,762	0,657	0,495	0,705	0,714	0,629	0,543	0,486	0,629	0,733	0,562
31	0,571	0,581	0,610	0,571	0,581	0,610	0,543	0,438	0,571	0,581	0,514	0,524	0,562	0,552	0,581	0,524
32	0,533	0,619	0,533	0,533	0,562	0,533	0,600	0,514	0,590	0,562	0,610	0,505	0,562	0,590	0,581	0,524
33	0,571	0,619	0,610	0,514	0,581	0,571	0,486	0,514	0,571	0,600	0,476	0,505	0,581	0,552	0,581	0,486
34	0,467	0,610	0,505	0,486	0,514	0,505	0,629	0,562	0,600	0,533	0,600	0,514	0,571	0,543	0,533	0,514
35	0,552	0,638	0,629	0,476	0,505	0,552	0,524	0,533	0,552	0,562	0,514	0,543	0,543	0,571	0,524	0,581
36	0,514	0,562	0,552	0,514	0,524	0,514	0,581	0,571	0,610	0,524	0,590	0,562	0,562	0,571	0,543	0,505
37	0,476	0,562	0,571	0,514	0,486	0,495	0,486	0,438	0,495	0,524	0,476	0,448	0,524	0,514	0,524	0,410
38	0,619	0,629	0,619	0,581	0,629	0,619	0,571	0,486	0,581	0,571	0,543	0,514	0,495	0,562	0,648	0,533
39	0,533	0,600	0,552	0,571	0,543	0,552	0,505	0,476	0,514	0,562	0,476	0,486	0,524	0,514	0,581	0,429
40	0,524	0,476	0,505	0,505	0,476	0,467	0,476	0,524	0,486	0,457	0,448	0,495	0,514	0,581	0,495	0,476
41	0,581	0,533	0,638	0,562	0,610	0,581	0,457	0,429	0,543	0,571	0,505	0,476	0,457	0,505	0,590	0,514
42	0,619	0,590	0,695	0,619	0,648	0,676	0,590	0,467	0,638	0,686	0,562	0,514	0,533	0,562	0,686	0,533
43	0,505	0,533	0,543	0,524	0,514	0,505	0,495	0,505	0,543	0,533	0,505	0,571	0,552	0,581	0,514	0,590
44	0,476	0,524	0,514	0,476	0,467	0,476	0,581	0,552	0,514	0,486	0,552	0,524	0,619	0,552	0,505	0,562
45	0,610	0,581	0,552	0,590	0,657	0,610	0,543	0,476	0,629	0,600	0,533	0,524	0,524	0,590	0,657	0,486
46	0,448	0,476	0,524	0,448	0,419	0,467	0,533	0,524	0,467	0,457	0,505	0,552	0,514	0,562	0,419	0,514
47	0,562	0,552	0,581	0,562	0,571	0,562	0,610	0,581	0,562	0,552	0,581	0,571	0,571	0,600	0,571	0,514

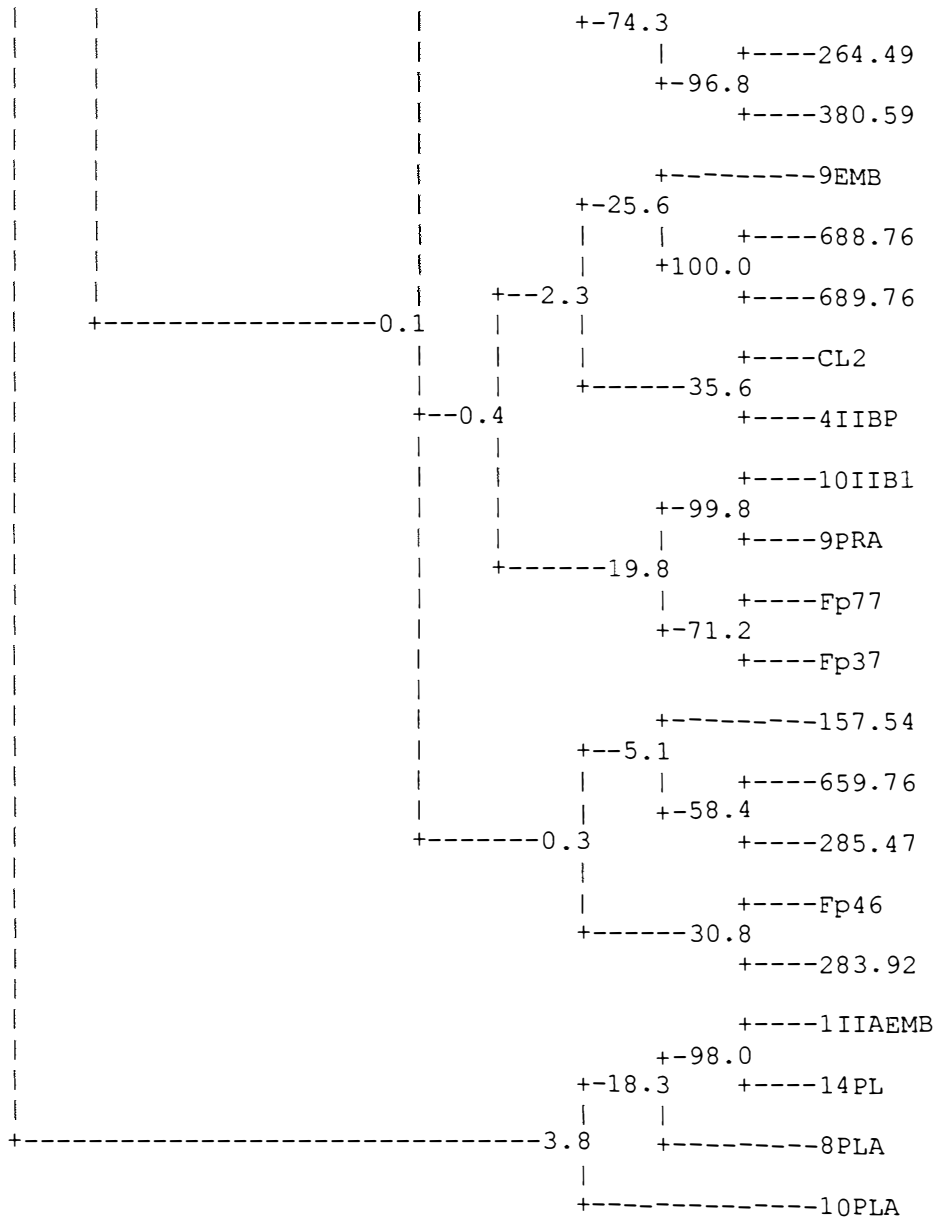
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
17	1,000															
18	0,667	1,000														
19	0,657	0,857	1,000													
20	0,571	0,790	0,781	1,000												
21	0,438	0,486	0,514	0,562	1,000											
22	0,629	0,657	0,724	0,600	0,600	1,000										
23	0,581	0,571	0,581	0,552	0,667	0,590	1,000									
24	0,581	0,724	0,752	0,705	0,533	0,610	0,562	1,000								
25	0,619	0,705	0,752	0,705	0,552	0,610	0,657	0,733	1,000							
26	0,476	0,524	0,571	0,562	0,562	0,467	0,552	0,590	0,590	1,000						
27	0,543	0,610	0,657	0,571	0,533	0,552	0,600	0,638	0,638	0,552	1,000					
28	0,543	0,610	0,657	0,667	0,514	0,571	0,505	0,695	0,695	0,552	0,619	1,000				
29	0,600	0,533	0,581	0,571	0,514	0,533	0,562	0,600	0,695	0,629	0,600	0,657	1,000			
30	0,562	0,648	0,752	0,743	0,590	0,648	0,581	0,714	0,771	0,571	0,676	0,695	0,638	1,000		
31	0,562	0,552	0,600	0,533	0,590	0,590	0,562	0,600	0,638	0,610	0,543	0,600	0,600	0,638	1,000	
32	0,562	0,590	0,657	0,667	0,571	0,533	0,581	0,657	0,733	0,686	0,600	0,638	0,676	0,676	0,619	1,000
33	0,581	0,571	0,600	0,610	0,629	0,495	0,562	0,638	0,676	0,571	0,657	0,733	0,657	0,619	0,619	0,619
34	0,571	0,505	0,571	0,600	0,524	0,524	0,571	0,552	0,590	0,695	0,571	0,590	0,629	0,610	0,590	0,857
35	0,543	0,610	0,657	0,552	0,495	0,571	0,543	0,600	0,600	0,514	0,581	0,657	0,638	0,619	0,524	0,562
36	0,543	0,495	0,600	0,590	0,571	0,552	0,543	0,581	0,581	0,857	0,562	0,562	0,657	0,600	0,638	0,695
37	0,524	0,590	0,562	0,610	0,590	0,495	0,543	0,562	0,562	0,686	0,581	0,581	0,619	0,581	0,505	0,600
38	0,590	0,657	0,724	0,657	0,448	0,562	0,533	0,667	0,705	0,581	0,610	0,648	0,648	0,686	0,590	0,648
39	0,505	0,590	0,581	0,610	0,629	0,514	0,600	0,600	0,581	0,686	0,619	0,562	0,581	0,619	0,562	0,619
40	0,533	0,505	0,533	0,600	0,562	0,562	0,495	0,457	0,514	0,448	0,552	0,533	0,495	0,514	0,533	0,533
41	0,495	0,600	0,629	0,600	0,619	0,619	0,533	0,590	0,648	0,486	0,552	0,629	0,610	0,648	0,590	0,495
42	0,533	0,657	0,762	0,657	0,543	0,600	0,533	0,629	0,667	0,657	0,648	0,667	0,705	0,686	0,590	0,667
43	0,495	0,505	0,552	0,543	0,543	0,581	0,590	0,552	0,610	0,448	0,533	0,533	0,476	0,552	0,514	0,533
44	0,619	0,552	0,562	0,552	0,610	0,495	0,619	0,486	0,562	0,629	0,505	0,600	0,581	0,486	0,562	0,619
45	0,524	0,629	0,657	0,648	0,495	0,533	0,581	0,600	0,733	0,552	0,619	0,581	0,505	0,695	0,543	0,695
46	0,533	0,543	0,590	0,505	0,657	0,562	0,495	0,533	0,457	0,562	0,495	0,457	0,552	0,533	0,514	0,533
47	0,629	0,600	0,648	0,581	0,638	0,562	0,629	0,590	0,610	0,562	0,533	0,571	0,590	0,590	0,571	0,571

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
33	1,000														
34	0,552	1,000													
35	0,581	0,552	1,000												
36	0,600	0,781	0,543	1,000											
37	0,562	0,571	0,524	0,562	1,000										
38	0,571	0,562	0,590	0,610	0,571	1,000									
39	0,562	0,571	0,524	0,581	0,924	0,590	1,000								
40	0,533	0,524	0,533	0,514	0,590	0,505	0,590	1,000							
41	0,590	0,410	0,571	0,476	0,590	0,638	0,571	0,581	1,000						
42	0,610	0,600	0,686	0,648	0,667	0,733	0,667	0,562	0,638	1,000					
43	0,476	0,505	0,590	0,438	0,552	0,467	0,552	0,771	0,619	0,543	1,000				
44	0,600	0,610	0,562	0,581	0,562	0,533	0,543	0,571	0,438	0,533	0,533	1,000			
45	0,524	0,590	0,524	0,581	0,524	0,590	0,562	0,590	0,571	0,629	0,629	0,486	1,000		
46	0,514	0,505	0,552	0,590	0,648	0,562	0,610	0,524	0,562	0,581	0,524	0,552	0,476	1,000	
47	0,552	0,581	0,552	0,571	0,571	0,505	0,590	0,581	0,505	0,562	0,524	0,819	0,533	0,581	1,000

ANEXO H: Dendrograma mostrando as relações fenéticas entre as 47 linhagens de fungos dematiáceos. Os valores da esquerda dos agrupamentos correspondem ao valor de P, ou seja, a porcentagem que este agrupamento apareceu nos 1000 dendrogramas gerados a partir da reamostragem “bootstrap”, com auxílio do programa “Winboot”. Coeficiente de similaridade utilizado: coeficiente Simples.

+----289.93





6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJELLO, L.; GEORG, L. K.; KAPLAN, W.; KAUFMAN, L. Laboratory manual for medical mycolog. Washington: U. S. Government Printing Office, 1966. p.21.
- AL-DOORY, Y. Chromomycosis in Di Salvo, A.F. **Occupational mycoses**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1983. p. 95-121.
- ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; DE SOUZA, W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Journal General Microbiology**, v.137, p.837-844, 1991.
- ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J. ; DE SOUZA, W. Effect of enviromental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanolol. **Mycopathologia**, v.119, p.17-23, 1992.
- ATTILI, D.S.; HOOG, G.S. de; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. rDNA-RFLP and ITS1 sequecing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. **Medical Mycology**, v.36, p.219-225, mar, 1998.
- BANKS, I. S.; PALMIERI, J. R.; LANOIE, L.; CONNOR, D. H.; MEYERS, W. M. Chromomycosis in Zaire. **International Journal of Dermatology** v.24, p.302-307, 1985.
- BARBA-GÓMEZ, J.F.; MAYORGA, J.; MCGINNIS, M.R.; GONZALES-MENDOZA, A. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.26, part 2, p.367-370, 1992.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeasts: **Characteristics and identification**. Cambridge. Cambridge University Press. 1990. 1002p.

- BARR, M. E. Notes and additions to the north american members of the *Herpotrichiellaceae*. **Mycopathologia**, v.81, p.9-21, 1983.
- BAYLES, M. A. H. Chromomycosis clinical tropical medicine and comunicable diseases. International Praticce and Research. **Intropical Ingal Infections**, v.4, n.1, p.45-71, 1989.
- BECKER-ANDRÉ, M.; HALBROCK, K. Absolute mRNA quantification using the polimerase chain reaction (PCR). Novel approach by a PCR - aided transcript titration assay (PATTY). **Nucleic Acids Research**, v.17, p.9437-9449, 1989.
- BELLOCH, C.; BARRIO, E.; GARCIA, M. D.; QUEROL, A. Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rDNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. **Syst. Applied Microbiology**, v.21, p.266-273, 1998.
- BENNETT, J. E.; BONNER, H.; JENNINGS, A. E.; LOPEZ, R. I. Chronic meningitis caused by *Cladosporium trichoides*. **American Journal Clinical Pathology**. V.59, p.398-407, 1973.
- BITTENCOURT, A.L.; LONDERO, A.T.; ANDRADE, J.A.F. Cromoblastomicose auricular. Relato de um caso. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.36, p.381-383, 1994.
- BOPP, C.; BERNARD,C. Geopatologia da Cromoblastomicose no rio Grande do Sul. **Mycophathologia**, v.75; n.3, p.149-158, 1981.
- BORELLI, D. Acrotheca aquaspersa nova espécie: agente de cromomicoses. **Acta Científica Venezuelana**, v.23, p.196, 1972.
- BORELLI, D. Causal agents of Chromoblastomycosis (Chromomycetes). **Pan American Health Organization Scientific Publication**, v.396, p.334-35, 1980.
- BRYGOO, E.R.; SEGRETAIN, G. Étude clinique épidémiologique et mycologique de la chromoblastomycose à Madagascar. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.3, p.443-473, 1960.

- CALIGIORNE, R. B.; RESENDE, M. A.; DIAS-NETO, E.; COSTA, S. O.; AZEVEDO, V. Dematiaceous fungal pathogens: Analysis of ribosomal DNA gene polymorphisms by PCR-RFLP. **Mycoses**, In press, 1999.
- CAMPBELL, C. K.; HEDAITHY, S. S. Phaeohyphomycosis of the brain caused by *Rhynchoglyphium mackenziei* sp nov. in Middle Eastern countries. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.31, p.325-332, 1993.
- CAMPINS, H.; SCHARY, J.M. Cromoblastomicosis, comentarios sobre 34 casos, con estudio clinico, histologico y micologico. **Gaceta Medica de Caracas**, p.27-151, 1952.
- CARRION, A. Chromoblastomycosis. A new clinical type caused by *Hormodendrum compactum*. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v.11, p.663-682, 1936.
- CARRION, A. L. Chromoblastomycosis. **Annual New York Academic Science**, v.50:1255, 1950.
- CARRION, A.; SILVA, M. Chromoblastomycosis and its etiologic fungi. **Annales Cytogamici et Phytopathologici**, v.6, p.20, 1947.
- CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v.69, p.2-9, 1988.
- CESPEDES, F. R. **Chromoblastomycosis**. In: Baker R. D. Chromoblastomycosis in human infection with fungi, actinomycetes and algae. New York: Springer-Verlog, 1971.
- CHANDLER, F. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. **A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases**. London: Wolfe Medical Publications, 1980. p.47-49: Chromoblastomycosis.
- CHAUDHRY, G.R.; TORANZOS, G.A.; BHATTI, A.R. Novel method for monitoring genetically engineered microorganisms in the environmental. **Applied Environmental Microbiology**, v.55, p.1301-1304, 1989.
- CHEN, X.; LINE, R.F.; LEUNG, H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. **Phytopathology**, v.83, p.1489-1497, 1993.

- CONTI-DIAZ, I. A.; MACKNON, J. E.; CIVILA, E. Isolation and identification of black yeasts from the external environment in Uruguay. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES 4. Washington, 1978. **Proceedings** Washington: Pan American Health Organization, 1978. p.106-114.
- COTTER, H. van T.; BLANCHARD, R. O. The fungal flora of Bark of *Fagus grandifolia*. **Mycologia**, v.74 n. 5, p.836-843, 1982.
- COULANGES, P.; LOCHERON, P. La chromomycose a Madagascar. **Archives de L'Institut Pasteur Madagascar**, v.48, p.69-95, 1981.
- CRISTÓVÃO, D. E.; TEIXEIRA, M. F. S; MATSUURA, J. A. B.; SARQUIS, M. I, M. Ocorrência de fungos da família Dematiaceae de solo arenoso das praias mais frequentadas de Manaus-AM-BRASIL. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 10., Salvador, 1999. **Resumo**. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999.
- CULLINGS, K. W.; VOGLER, D. R. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. **Molecular Evolution**, v.7, p.919-923, 1998.
- DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A. the medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses**, v.34, p.1-18, 1991.
- DIXON, D.M.; SHADOMY, H. J. Taxonomy and morphology Dematiaceous isolated from nature. **Mycopathologia**, v.70, n.3, p.139-144,1980.
- DIXON, D.M.; SHADOMY, H.J.; SHADOMY, S. Dematiaceous fungal pathogens isolated from Nature. **Mycopathologia**, v. 70 n.3, p. 153-161, 1980.
- DUQUE, H.O. Chromoblastomycosis. Revision general y estudio de la enfermedad en Colombia. **Antioquia Medica**, v.11, p. 499 - 521, 1961.
- ELLIS, M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, p.608, 1971.
- EMMONS, C. W. The significance of saprophytism in the epidemiology of the mycoses. **Transactions New York Academic Science**, v.71, p.157-166, 1954.

- ERLICH, H.A. **PCR technology: Principles and application for DNA amplification**. New York; STOCKTON, 1989. 246 p.
- ESPINEL-INGROFF, A.; GOLDSON, P. R.; MCGINNIS, M. R.; KERKERING, T. M. Evaluation of proteolytic activity to differentiate some dematiaceous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.2, p.301-307, 1988.
- ESPINEL-INGROFF; KERKERING, F.; SHADOMY, H.J. Isolation of Dematiaceous Pathogenic fungi from a feed and seed warehouse. **Journal of Clinical Microbiology**. v.15, n.4, p.714-719, 1982.
- ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAMARCEL, E.R.; PECARRERE, J.L. Forty Years of Chromoblastomycosis in Maragascar a review. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene** v.55 n1, p.45-47, 1996.
- FARBIARZ, S. R.; CARVALHO; ALVIANO, C.; SOUZA, W. de. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.28, p.373-383, 1990.
- FELSENSTEIN, J.. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c**. Seattle Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington,. 1993
- FERREIRA, M.E. Aplicação de marcadores moleculares no mapeamento genético de plantas. In: **III Curso de Marcadores Moleculares**, EMBRAPA / CENARGEN - Brasília, DF. 1994.
- FONT, D.E.S.; OLANO, M.E.S.; GONZALES, D.R. Cromomicosis generalizada a *Fonsecaea compactum*. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.35, p.283-289, 1983.
- FUKUSHIRO, R. Chromomycosis in Japan. **International Journal of Dermatology**, v.22, p.221-229, 1983.
- FUNGARO, M. H. & VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. Cap.8, p.205-227.
- FUTUYAMA, D. J. **Biologia evolutiva**; 2 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPQ, 1992. p.646.

- GAMS, W.; A.A, H.A. VAN DER; PLAATS-NITERINK, A.J. VAN DER; SAMSON, R.A.; STALPERS, J.A. CBS course of mycology. 3. ed. Baam: Centralbureau voor Schimmelcultures, 1987. 136 p.
- GARGAS, A.; TAYLOR, J. W. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. **Mycologia**, v.84, p.589-592. 1992.
- GEIS, A. P.; SZANISZLO, P. J. Carotenoid pigments of the demataceous fungus *Wangiella dermatitidis*. **Mycologia**, v.76, p.268-273, 1984.
- GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; HOOG, G.S. de Variability and molecular diagnostic of neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**, n.43:151-162, 1999.
- GEZUELE, E.; MACKINNON, J.E.; CONTI-DIAZ, I.A. The frequent insolation of *Phialophora verrucosa* and *Phialophora pedrosoi* from natural sources. **Sobouraudia**, v.10, p.226-273, 1972.
- GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD. Curitiba, 1995, 115p. Dissertação (M. S.) – Universidade Federal do Paraná.
- GODIN, D. N.; WANNG, T.; TUCHER, J. M. Studies on the interaction of propanolol with erythrocyte membranes. **Biochimica, et Biophysica Acta**, v.436, p.757-773, 1973.
- GOODWIN, P.H.; ANNIS, S.L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2482-2486, 1991.
- GUILLIAND,G.; PERRIM,S.; BUNN, H.F. Competitive PCR for quantification of mRNA. In: INNIS, M.; GELFAND,D.; SNINSKY, D.; WHITE, T. (Eds). **PCR protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York Academic, Press, 1990. p 60-69.
- GUTHRIE, P.A.I.; MAGILL, C.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODVODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifyind and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopatology**, v. 82, p.832-835, 1992.

- HAASE, G.; SONNTAG, L. V.; DE PEER, Y.; UIJTHOF, J. M. J.; PODBIELSKI, A.; MELZER-KRICK, B. Phylogenetic analysis of ten black yeast species using nuclear small subunit rDNA gene sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.68, p.19-33, 1995.
- HAASE, G.; SONNTORG, L.; MELZER-KRICK, B.; HOOG, G.S. de Phylogenetic inference by SSU-gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. **Studies in Mycology**, n.43:80-97, 1999.
- HAYDEN, H.L.; PEGG, K.G.; ATKEN, E.A.B.; IEWIN, J.A.G. Genetic relationships as assessed by molecular markers and cross-infection among strains of *Colletotrichum gloeosporoides*. **Australian Journal of Botanic.**, v.42, p.9-18, 1994.
- HAYNES, K.A.; WESTERNENG, T.J.; FELL, J.W.; MOENS, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.319-325, 1995.
- HERSHKOVITZ, K.; LEWIS, L. V. Deep level diagnostic value of the rDNA-ITS region. **Molecular Biology Evolution**, v.13, p.1276-1295, 1996.
- HIRUMA, M.; KAWADA, A.; OHATA, T.; OHNISHI, Y.; TAKAHASHI, H.; YAMAZAKI, M.; ISHIBASHI, A.; HATSUSE, K; KAKIHARA, M.; YOSHIDA, M. Sistematic phaeohy phomycosis caused by *Exophiala dermatitidis*. **Mycoses**, v.36, p.1-7, 1993.
- HOOG, G. S. de Rhinocladiella and allied genera. **Studies in Mycology**, v.75, p.1-140, 1977.
- HOOG, G. S de. The black yeasts: possible adaptation to the human host. **Studies in Mycology**, v.19, p.1-36, 1979.
- HOOG, G. S. de. Evolution of black yeast: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.105-109, 1993.
- HOOG, G.S. de. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity illustrated with agents of phaeohyphomycosis. **Mycoses**, v.40, p.5-8, 1997. Supplement 2.

- HOOG, G.S. de; BEGUIN, H.; BATENBURG-VAN DE VEGTE, W. H.. *Phaeotheca triangulais*, a new meristematic black yeast from a humidifier. **Antonie van Leeuwenhoek**. V.71, p. 289-295, 1997.
- HOOG, G. S. de; BOWMAN, B.; GRASER, Y.; HAASE, G.; ELFARI, M.; GARRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; MELZER-KRICK, B.; UNTEREINER, W. A. Molecular phygeny and taxonomy of medically important fungi. **Medical Mycology**, v.36, p.52-56, 1998. Supplement 1.
- HOOG, G.S. de; GUARRO. **Atlas of clinical fungi**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995, 720p.
- HOOG, G.S. de; GUÉHO, E.; MASCLAUX, F.; GUERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; KWON-CHUNG, K.J.; MCGINNIS, M.R. Nutritional physiology and taxonomy of human-pathogenic *Cladosporium-xylohypha* species. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.339-347, 1995a.
- HOOG, G. S. de; GUERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; UIJTHOF, J. M. J.; UNTEREINER, W. A. Nutritional physiology of type isolats of currently accepted species of *Exophiala* and *Phacocacomyces*. **Antonie van den Ende**, v.68, p.43-49, 1995b.
- HOOG, G.S. de; HAASE, G. Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatidis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 64, p. 17-26, 1993.
- HOOG, G.S. de; POONWAN, N.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Taxonomy of *Exophiala spinifera* and its relationship to *E. jeanselmei*. **Studies in Mycology**, v.43:133-142, 1999a.
- HOOG, G. S. de; TAKEO, K.; YOSHIDA, S.; GOTTLICH, E.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Pleoanamorphic life cycle of *Exophiala (wangiella) dermatidis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.65, p.143-153, 1994.
- HOOG, G. S. de; WEENINK, Y. O.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. Taxonomy of the *Phialophora verrucosa* complex with the discription of two new species. **Studies in Mycology**, v.43, p.107-121, 1999b.

- HOOG, G. S. de; YURLOVA, N. A. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.65, p.41-54, 1994.
- HOOG, G. S. de; 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**, v.43, p.31-37, 1999c.
- HORRÉ, R.; HOOG, G. S. de. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. **Studies in Mycology**, v.43, p.176-193, 1999.
- IBRAHIM-GRANET, O.; BIEVRE C.; JENDOUBI, M. Immunochemical characterisation of antigens and growth inhibition of *Fonsecaea pedrosoi* by species specific IgG. **Journal Medical Microbiology**, v.26, p.217-222, 1988.
- IWATSU, T.; MIYAJI, M.; OKMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, v.75, p.149-158. 1981.
- JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. **Mammalian Protein Metabolism**, New York.. Munro H. H. (Ed.), 1969, p. 21-132.
- KANE, J.; SUMMERBELL, R. C. Sodium chloride as aid in identification of *Phaeoannellomyces werneckii* and other medically important dematiaceous fungi. **Journal Clinical Microbiology**, v.25, p.944-946. 1987.
- KUSENBACH, G.; SKOPNIC, H.; HAASE, G.; FRIEDRICHS, F.; DÖHMEN, H. *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis. **European Journal Pediatr.**, v.151, p.282-294. 1992.
- KERSULYTE, D.; WOODS, J.P.; KEATH, E.J.; GOLDMAN, W.E.; BERG, D.E. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. **Journal of bacteriology**, Washington, v.174, p.7075-7079, 1992.
- KLITE, P. B.; KEILEY, H. B.; DIERKS, F. N. A new soil sampling technique for pathogenic fungi. **American Journal Epidemiology**, v.31, p.124-130, 1965.

- KNOW, K. J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia. Lea & Febiger, 1992. 886p.
- KRALOVIC, S. M.; RHODES, J. C. Phaeohyphomycotic osteomyelitis due *Fonsecaea pedrosoi* in a liver transplant recipient. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 98, Atlanta, 1998. p.17-21.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica**. São Paulo: Saraiva, 1984.
- LIEW, E.C.Y.; IRWIN, J.A.G. Comparative studies on *Phytophthora megasperma* isolates from chickpea collected in Australia and Spain. (1994). **Mycology Research** v.98, n.11, p.1284-1290, 1994.
- LIYANAGE, H.D.; McMILLAN Jr, R.T.; KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum goeosporioides* from citrus. **Phytopatology**, v. 82, p.1371-6, 1992.
- LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Cromoblastomicose no interior do estado do Rio Grande do Sul. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.64, p.155-158, 1989.
- MANULIS, S. ; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. **Phytopathology**, Lancaster, v.84, p.98-101, 1994.
- MARTINS, C. V. B.; HORII, J.; PIZZIRAMIKLEINER, A. A. Characterization of fusion products from protoplasts of yeasts and their segregants by electrophoretic karyotyping and RAPD. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.71-76, 1999.
- MASCLAUX, F.; GUÉRO, E.; HOOG, G. S. de. Phylogenetic relationships of human pathogenic *Cladosporium (xylohypha)* species inferred from partial LSU rDNA sequences. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.327-338, 1995.
- MASCLAUX, F.; GUÉRO, E.; HOOG, G. S. de; VILLARD, J. Intraspecific variability within species of *Cladosporium* using arbitrary primed PCR. **Journal Mycology Medical**, v.6, p.15-18, 1996.

- MATSUMOTO, T.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L.; STANDARD, P.; MCGINNIS, M. R. Critical review of human isolates of *wangiella dermatitidis*. **Mycologia**, v.76, p. 232-239, 1984.
- MCGINNIS, MR. *Exophiala spinifera*, a new combination for *Phialophora spinifera*. **Mycotaxon**, v.5, p.337-340, 1977.
- MCGINNIS, M.R. Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis: New concepts, diagnosis and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.8, p.1-16, 1983.
- MCGINNIS, MR. Black fungi. A model for understanding tropical mycosis. In: WALKER DH, ed. **Global infectious diseases**. New York: **Springer-Verlog**, 1992. p.129-149.
- MCGINNIS, M. R.; LEMON, S. M.; WALKER, D. H.; HOOG, G. S. de; HAASE, G. Fatal cerebritis caused by a new species de *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, v.43, p.166-171, 1999.
- MCGINNIS, M.R.; SCHELL, W. A. The genus *Fonsecaea* and its relationship to the genera *Cladosporium*, *Phialophora*, *Rhamichloridium* and *Rhinocladiella*. **Pan American Health Organization Scientific Publication**, v.396, p.225-234, 1980.
- MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HOEKSTRA, R.F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, v.23, p. 323-329, 1993.
- MELLO-SILVA, A.C.C.; NETO-SERRA, A.; GALVÃO, C.E.S.; MARQUES, S.G.; SALDANHA, A.C.R.; PEDROSO, C.M.; FISCHMAN, O.; SILVA R.R.; COSTA, M.R.S.R.; COSTA, J.M.L. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no Estado do Maranhão. I- Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.25, n.1, p.37-44, 1992.
- MENDOZA, L.; KARUPPAYIL, S. M.; SZANISZIO, P. J. Calcium regulates in vitro dimorphism in Chromoblastomicotic fungi. **Mycoses**, v.36, p.157-164, 1993.

- MITCHELL, T. G.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J.W. Comparison of 5.8S ribosomal DNA sequences among the basidiomycetous yeast genera *Cystofilobasidium*, *Filobasidium* and *Filobasidiella*. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.30, p.207-218, 1992.
- MOCNAR, O.; PRILLINGER, H.; LOPANDIC, K.; WEIGANG, F.; STAUDACHER, E. Analysis of coenzyme Q systems monosaccharide patterns of purified in the genus *kluyveromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, p.68-78, 1996.
- MONTERO-GEI, F. Ecology and epidemiology of chromomycosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOSES. Washington, 1970. **Proceedings**. Washington: Pan American Health Organization Scientific Publication, 1970. p.182-184.
- MORALES, V. M.; PELCHER, L. E.; TAYLOR, J.L. Comparison of 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. **Currents Genetic**, v.23, p. 490-495, 1993.
- NAKA, W.; HARADA, T.; NISHIKAWA, T.; FUKOSHIRO, R. A case of chromoblastomycosis: With special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. **Mycosen**, v.29, p.445-442, 1986.
- NIELSON. H. S. Jr. Dematiaceous fungi. In: E. H. Lennette, E. H. Spaulding; J. P. Traut (eds). **Manual of clinical microbiology**, 2 ed., Washington: American Society for Microbiology, 1974. p.528-540.
- NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Defense mechanisms of mice against *Fonsecaea pedrosoi* infection. **Mycopathologia**, v.81, p.155-166, 1981.
- NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Defense mechanisms of mice against *Exophiala dermatitidis* infection. **Mycopathologia**, v.81, p.9-21, 1983.
- OKEKE, C. N.; GUGNANI, H. C. Studies on pathogenic dematiaceous fungi. **Mycopathologia**, v.94, p.19-25, 1986.
- OLIVEIRA, L.G.; RESENDE, M.A.; LOPES, C.F.; CISALPINO, E.O. Identificação de agentes de cromomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.52, p.1-5, 1977.

- OHKUSU, M.; YAMAGUSHI, M.; HATA, K.; YOSHIDA, S.; TANAKA, R.; NISHIMURA, K.; HOOG, G.S. de; TAKEO, K. Cellular and nuclear characteristics of *Exophiala dermatitidis*. **Studies in Mycology**, n.43:143-150, 1999.
- PADHYE, A. A.; DUNKEL, J. D.; WIN, R. M.; WEBER, S.; EWING, E. P. Jr.; HOOG, G. S. de. Short communication: subcutaneous phacohyphomycoses caused by an undescribed *Cladophialophora* species. **Studies in Mycology**, v.43, p.172-175, 1999.
- PERSIANI, A. M.; MAGGI, O.; CASADO, M. A.; Pineda, F. D. Diversity and variability in soil fungi from a disturbed tropical rain forest. **Mycologia**, v.90, p.206-214, 1988.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; McDONALDS, K. D.; BUFTON, W. J. The genetics of *Aspegillus nidulans*. **Advances in genetics**, v.5, p141-238. 1953.
- PRARIYACHATIGUL, C.; CHAIPRASERT, A.; MEEVOOTISOM, V.; PATTANAKITSAKUL, S. Assessment of a PCR technique for the detection and identification of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Medical Veterinary Mycology**. v.34, p.251-258, 1996.
- QUEIROZ-TELLES, F. Flo. A cromoblastomicose no estado do Paraná. Etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. Porto Alegre, 1996, 124p. Tese (Doutorado) Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.
- QUEIROZ-TELLES, F. Flo. PURIM, K.S.; FILLUS, J.N.; BORDIGNON, G.F.; LAMEIRA, R.P.; VAN CUTSEM, J.; CAWWENBERGH, G. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **International Journal of Dermatology**, v.31, p.805-812, 1992.
- RESTREPO, A.; GONZALES, A.; GOMEZ, I.; ARANGO, M.; DE BEDOUT, C. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. **Annals New York Academy of Sciences**. v.544, p.504-516, 1988.
- RIPPON, J. W.. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. In: **Medical Mycology** Philadelphia: WB Saunders, p.276-296, 1988
- ROGERS, S. O.; MCKEMY, J. M.; WANG, C. J. K. Molecular assessment of *Exophiala* and related hyphomycetes. **Studies in Mycology**, n.43:122-133, 1999.

- ROHLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York, Exeter Publishing, 1988.
- ROMERO, A.; TREJOS, A. La cromoblastomicosis in Costa Rica. **Revista Biologia Tropical**, v. 1, p.95, 1953.
- SAMPO, S.; BERGERO, R.; BUFFA, G.; LUPPI-MOSCA, A.M.; Soil fungal communities in a Young and an old *Alnus viridis* coenosis. **Mycologia**, v.89, n.6, p.837-845, 1997.
- SCHÄFER, G.; WÖSTEMEYER, J. Random Primer Dependent PCR differentiates Aggressive from Non-Aggressive isolates of the Oilseed Rape Pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology**, v.136, p.124-136, 1992.
- SEIFERT, K. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. A. Critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous *Ascomycetes* and *ascomycetous anamorphs*. **Canadian Journal of Botany**, v.73 (suppl1), p.5760-5767, 1995.
- SEKHON, A. S.; GALBRAITH, J.; MIELKE, B. W.; GARG, A. K.; SHEEHAN, G. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Xylohypha bantiana*, with a review of the literature. *European Journal Epidemiol*, v.8, p.387-390, 1992.
- SILVA, C. L.; EKIZLERIAN, S. M. Granulomatous reaction induced by lipids extracted from *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compactum*, *Cladosporium carrioni* and *Phialophora verrucosum*. *Journal of General Microbiology*, v.131, p.187-194, 1985.
- 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 (*Orbignya phalerata* martins) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente da cromoblastomicose no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.28, n.1, p.49-52, 1995.
- SILVA, J. P.; SOUZA, W. S.; ROZENTAL, S. Cromoblastamycosis. A retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (BRAZIL). **Mycopathologia**, v.143, p.171-175, 1999.
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy.** W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1973, 573p.

- SOLANEN, E. A. Cromomycosis. **Acta Medica Costa Rica**, v.9, p.77, 1996.
- STARNBACH, M.N.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. Species specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.1257-1261, 1989.
- STEADHAM, J. F.; GEIS, P. A.; SIMMANK, J.L. Use of carbohydrate and nitrate assimilation in the identification of dematiaceous fungi. **Diagnosis Microbiology Infection Disease**, v.5, p.71-75, 1986.
- STERFLINGER, K.; HAIN, M. In situ hybridization with rRNA targeted probes as a new tool for the detection of black yeasts and meristematic fungi. **Studies in Mycology**, n.43:23-30, 1999a.
- STERFLINGER, K.; HOOG, G. S. de; HAASE, G. Phylogeny and ecology of meristematic Ascomycetes. **Studies in Mycology**, v.43, p.5-22, 1999b.
- STERFLINGER, K. Temperature and NaCl – tolerance of rock – inhabiting meristematic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.74, p.271-281, 1988.
- TAKEO, K.; HOOG, G. S. de. Karyology and hyphal characters as taxonomic criteria in ascomycetous black yeast and related fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.60, p.35-42, 1991.
- TESUNETO, L. T.; ARCE-GOMEZ, B.; PTZL-ERLER, M. L.; QUEIROZ-TELES, F. F. HLA-A29 and genetic susceptibility to chromoblastomycosis. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.27, p.181-185, 1989.
- TINTELNOT, K.; HUNNIUS, P.; HOOG, G. S. de; POLAK-WYSS, A.; GUEHO, E.; MASCLAUX, F. Systemic mycosis caused by new *Cladophialophora* species. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.349-354, 1995.
- TITZE, A.; HOOG, G. S. de. *Capnobotryella renispora* on roof tile. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.58, p.265-269, 1990.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIA, K, F., JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.4876-4882, 1997

- UIJTHOF, J. M. J. Taxonomy and phylogeny of the human pathogenic black yeast genus *Exophiala* Carmichael. Utrecht, 1996, 120p. Thesis.
- UIJTHOF, J. M. J.; HOOG, G. S. de; COCK, A. W. A. M. de; TAKEO, K.; NISHIMURA, K. Pathogenicity of strains of the black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*: an evaluation based on polymerase chain reaction. **Mycoses**, v.37, p.235-242, 1994.
- UIJTHOF, J. M. J.; BELKUN, A. V.; HOOG, G. S. de; HAASE, G. *Exophiala dermatitidis* and *Sarcinomyces phaeamuriformis*: ITS1 – sequencing and nutritional physiology. **Medical Mycology**, v.36, p. 143-151, 1998.
- UIJTHOF, J. M. J.; HOOG, G. S. de. PCR – Ribotyping of type isolates of currently accepted *Exophiala* and *Phaeococcamyces* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.68, p.35-42, 1995.
- UNTEREINER, W. A. Taxonomy of selected members of the ascomycete genus *Capronia* with notes on anamorph-teleomorph connections. **Mycologia**, v.89, p.120-131, 1997.
- UNTEREINER, W. A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; HOOG, G. S. de. Nutritional physiology of species of *Copronia*. **Studies in Mycology**, v.43, p.98-106, 1999.
- UNTEREINER, W. A.; NAVEAU, F. A. Molecular systematics of the *Herpotrichiellaceae* with an assessment of the phylogenetic positions of *Exophiala dermatitidis* and *Phialophora americana*. **Mycologia**, v.91, n.1, p.67-83, 1999.
- UNTEREINER, W.A.; STRAUS, N.A.; MALLOCH, D. A molecular – morphotaxonomic approach to the systematics of the *Herpotrichiellaceae* and allied black yeasts. **Mycology Research**, v.99, n.8, p.897-913, 1995.
- VAN DE PEER, Y.; WACHTER, R. TREECON for windows: 1994
- VAN DER WALT, J. P.; YARROW, D. Methods for isolation maintenance classification and identification of yeasts. p.45-104. In: KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (ed.). **The yeasts, a taxonomy study**, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, 1984.

- VARGA, J.; CROFT, J.H. Assignment of RFLP, RAPD and isoenzyme markers to *Aspergillus nidulans* chromosomes, using chromosome-substituted segregants of a hybrid of *A. nidulans* and *A. qusdrilineatus*. **Current Genetics**, Berlin, v.25, p.311-317, 1994.
- WALZ, R.; BIANCHIN, M.; CHAVES, M.L.; CERSKI, M.R.; SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora bantiana* in a Brazilian drug abuser. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.35, p.427-431, 1997.
- WANG, A.M.; DOYLE, M.V.; MARK, D.F. Quantification of mRNA by the polimerase chain reaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.9717-9721, 1989.
- WANG, C. J. K. Fungi of pulp and paper of New York. **State University Call Forestry tech Pub**, v.87, p.76, 1965.
- WANG, L. D.; LI, R. Y.; WANG, X. H. Observations os sporulation in *Fonsecaea* and *Phialophora* by scanning electron microscopy. **Mycopathologia**, v.98, p.105-109, 1987.
- WEIR, T. L.; HUFF, D. R.; CHRIST, B. J.; ROMAINE, C. P. RAPD – PCR analysis of genetic cariation among isolateds of *Alternaria solani* and *Alternaria alternaria* from potato and tomato. **Mycologia**, v.90 (5), p.813-821, 1998.
- WHEELER. M. H.; BELL, A. A. In: McGINNIS, M. R., Ed. Corrent Topics in Medical Mycology. Melanins and their importance in pathogeic fungi. New York: Springer-Verlag, 1988.
- WELSH,J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primed . **Nucleic Acids Research**, v.19, p.303-306,1990.
- WELSH, J.; PATERSON, C.; McCLELLAND, M. Polymorfims denenerated by arbitrarily primed PCR in the mouse: Application to strain identification and genetic mapping. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.303-306, 1991.

- 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**. New York Academic, Press, 1990. p 315-322.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, LIVAK, A.R.; RAFALSKI, J.A.; TINGSLEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-35, 1990.
- YAN, Z. H.; ROGERS, S. O.; WANG, C. J. K. Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. **Mycologia**, v.87, p.72-83, 1995.
- YAP, I. V., ; NELSON, R. J. Winboot: A program for performing bootstrap analysis os binary data to determine the confidense limits of UPGMA-based dendograms. IRRI discussion paper n.14, 1996. 22p.
- YEGRES. F. Cromomicosis por *Cladosporium carrionii* en criadores del Estado de Falcón. **Investigación Clínica**, v.26, p.235-246, 1985.
- YURLOVA, N. A., HOOG, G. S. de. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.72, p.141-147, 1997.
- ZALAR, P.; HOOG, G. S. de; GUNDE-CINERMAN. Ecology of halotolerant dothidiaceous black yeasts. **Studies in Mycology**, v.43, p.38-48, 1999.

APÉNDICE 1

Tabela 1. Fontes de carbono utilizadas para a confecção de soluções (Van der Walt & Yarrow, 1984).

Nº.	Fontes
C1	D-glicose
C2	D-galactose
C3	L-sorbose
C4	D-glicosamine
C5	D-ribose
C6	D-xilose
C7	L-arabinose
C8	D-arabinose
C9	L-raminose
C10	Sucrose (Sacarose)
C11	Maltose
C12	α, α trealose
C13	Metil α -glicosídeo
C14	Celobiose
C15	Salicina
C16	Arbutina
C17	Melibiose
C18	Lactose
C19	Rafinose
C20	Melzitose
C21	Inulina
C22	Solução "starch" (inicial)
C23	Glicerol
C24	Meso eritritol
C25	Rivitol
C26	Xilitol
C27	L-arabinitol
C28	D-glucitol
C29	D-manitol
C30	Galactiol
C31	Mioinositol
C32	Glucono δ -lactona
C33	2 keto-D-gluconato
C34	5-keto-D-gluconato
C35	D-gluconato
C36	D-glucononato
C37	D-galacturonato
C38	DL-lactato
C39	Succinato
C40	Citrato
C41	Metanol
C42	Etanol

Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos no sentido 5'→3' dos “primers” da Operon Technologies selecionados para o estudo de RAPD.

“Primer”	“Kit”	Seqüência 5'→3'
11	Opx	GGAGCCTCAG
12	Opx	TCGCCAGCCA
14	Opx	ACAGGTCCTG
17	Opx	GACACGACC
19	Opx	TGGCAAGGCA

APÊNDICE 2

Características fisiográficas do Estado do Paraná

O Estado do Paraná, com uma superfície de 199.575 km², situa-se na Região Sul do Brasil, limita-se: ao Norte com o Estado de São Paulo; a Leste com o Oceano Atlântico; ao Sul com o Estado de Santa Catarina; a Sudoeste com a República Argentina; a Oeste com a República do Paraguai e a Noroeste com o Estado de Mato Grosso do Sul. Suas coordenadas geográficas são: no extremo Norte, 22°30', no extremo Leste 25°19', no extremo Sul 26°43' e no extremo Oeste 22°27', que correspondem aos municípios de Jardim Olímpia, Guaraqueçaba, General Carneiro e Fóz do Iguaçu, respectivamente. Aos 23°27' de latitude Sul, o Paraná é cortado, em sua região Norte, pelo Trópico de Capricórnio. Por estar no limite entre a Região Sudeste e Sul do Brasil, o território paranaense configura-se como um espaço de contatos e transições em termos físicos e naturais. (Figuras 1 e 2).

A transição climática é caracterizada pela existência de zona de clima tropical, em sua região Norte, e zona de clima subtropical, em quase todo o restante de seu território, onde as precipitações pluviométricas ocorrem com regularidade e são bem distribuídas ao longo do ano. Em linhas gerais, o volume das chuvas diminui no sentido Sul para o Norte do Estado, com médias pluviométricas situadas entre 1.200 a 1.300 mm anuais. Há diversas ocorrências de tipos de solo e de cobertura vegetal, possuindo também diferenciada formação geológica e conformação geomorfológica. O relevo apresenta três aspectos fundamentais: 1 - As altitudes mais elevadas situam-se ao longo da Serra do Mar. 2 - Da Serra do Mar as altitudes diminuem no sentido do Leste para Oeste e do Sudeste para o Noroeste. 3 - A maior parte de seu território, porém, está situado entre 300 e 600 metros de altitudes. Da conjunção dos fatores físicos e naturais resulta uma densa e perene rede hidrográfica, que, em função de sua geomorfologia, distribui-se em dois conjuntos de bacias hidrográficas diferenciadas pela direção do curso dos seus rios que é determinado pelo grande divisor de águas, a

Serra do Mar. A Leste desta estrutura, os rios desaguam no Oceano Atlântico e a Oeste, no Rio Paraná. A partir da Serra do Mar, o declive do terreno em direção a Oeste e ao Rio Paraná caracteriza-se pela existência de 3 planaltos, separados por 2 conjuntos de escarpas. Sob este aspecto, o território paranaense pode ser dividido em 5 zonas de paisagens naturais. São elas, o Litoral, a Serra do Mar e três planaltos.

Litoral - O litoral paranaense é estreito, com uma largura média de 20 km, alcançando 50 km na baía de Paranaguá. A parte interna de seu território é formada pela zona montanhosa litorânea, caracterizada por planícies interrompidas por morros, com altitude inferior a 300 m. Entre essa zona e o Oceano Atlântico, encontra-se a planície litorânea, de relevo aplainado, formada por uma sucessão de mangues, antigas restingas, praias e cordões arenosos. O clima predominante é do Af - tropical superúmido, na classificação de Koepen. sem estações secas, isento de geadas e médias de temperatura anuais entre 18°C e 22°C.

Serra do Mar - No território paranaense, destaca-se como uma escarpa abrupta. Que atinge altitudes superiores a 1.000 m. tendo como ponto culminante o pico Paraná, com 1922 m. A Serra do Mar é a região mais chuvosa do Estado. Constitui-se em barreira natural às massas de ar atlânticas que provocam em sua vertente oriental um índice pluviométrico próximo a 4.000 mm anuais, igualando-se aos da Amazônia.

Primeiro Planalto - É continuação da vertente ocidental da Serra do Mar e pode ser dividido em 3 subzonas delimitadas pelos divisores de água dos rios Iguaçu e Ribeira. As temperaturas médias anuais oscilam entre 16°C e 18°C e seu clima é do tipo Cfb - subtropical úmido mesotérmico, predominando os verões frescos, invernos com ocorrência de geadas freqüentes e intensas e sem estações secas.

Segundo Planalto - Apresenta-se como um patamar intermediário na sucessão dos grandes planaltos do Paraná. Alcança altitudes de 1 .100 a 1 .200 m, inclina-se suavemente para Oeste a altitudes de 700 a 800 m. Seu relevo pode ser dividido em 2 grandes zonas: a Leste, a escarpa denominada Serrinha, com altitudes mais elevadas e vales mais fechados, e a Oeste, a erosão fluvial entalhou vales mais amplos, originando um relevo suave constituído por mesetas, morros e platôs. O clima também é do tipo Cfb, com índices médios de umidade relativa do ar entre 80 a 85%. A porção

Sul do Segundo Planalto possui características térmicas semelhantes às do Primeiro, ao Norte, as médias anuais são mais elevadas.

Terceiro Planalto - É a maior das regiões naturais. Apresenta-se como um grande plano inclinado para Oeste, passando da altitude de 1.150 m correspondente à Serra da Boa Esperança, na borda do Segundo Planalto, até 300 m no vale do rio Paraná. A maior parte de seu território situa-se entre as altitudes de 300 e 600 m. O aspecto dominante é o de uma série de patamares formados pela sucessão de derrames de rocha basáltica ocorridos na época de sua formação geológica. Pode ser subdividido em 5 sub-regiões pelos divisores de água, formados pelos rios Tibagi, Ivaí, Piquiri e Iguaçu. Esses rios esculpiram, na região, vales, ora mais abertos, formando lageados com corredeiras, saltos e cachoeiras; ora mais fechados, formando "canyons". O clima, do tipo Cfb, apresenta variações regionais, com temperatura média de 15°C ao Sul, elevando-se para 22°C ao Norte (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, INSTITUTO DE TERRAS E CARTOGRAFIA DO ESTADO DO PARANÁ & UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 1988).