



FUNGOS DEMATIÁCEOS

*Rachel Basques Caligiorne
*Mária Aparecida de Resende
*Rita de Cássia B. W. Oliveira
*Henrique Maia Valério
*Rossana Aguiar Cordeiro
**Vasco Azevedo

Pesquisadores do
Departamento de Microbiologia * e
Biologia Geral ** do
Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de
Minas Gerais.
rachel@mono.icb.ufmg.br

Fotos cedidas pelos autores

Fungos negros que afetam animais, plantas e o homem

Os fungos dematiáceos, também denominados de fungos negros, formam um grupo de microrganismos que possuem pigmentação escura, devido à presença do complexo melanínico na sua parede celular. A melanina destes fungos é formada pelo polímero Diidroxinaftaleno (DNH) que é produzido no citoplasma e excretado na parede celular (Polak, 1990). Este polímero faz interações com lipídeos, proteínas e carboidratos da parede, formando o complexo melanínico. Este complexo é um importante fator de virulência dos fungos negros, onde a sua porção lipídica está relacionada à indução do granuloma nos tecidos do hospedeiro, enquanto a porção peptídica tem a função de quelar cátions, competindo com proteínas do soro e a porção de carboidratos tem um papel importante na interação célula-célula, facilitando a interação do agente com os tecidos do hospedeiro (Alviano *et alii*, 1991). Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que a melanina tem função antioxidante, neutralizando os efeitos da descarga oxidativa dos neutrófilos nos tecidos do hospedeiro e também permitindo que o fungo resista a maiores concentrações de permanganato e hipoclorito (Schnitzler *et alii*, 1999; Jacobson *et alii*, 1995).

As espécies de fungos dematiáceos são saprófitas, ou seja, vivem no solo, absorvendo os nutrientes oriundos da decomposição de matéria orgânica. O ar é um importante veículo de dispersão dos seus esporos. As inúmeras espécies estão amplamente distribuídas em todos os continentes e se diversificam de acordo com o clima e a umidade de cada região, o que sugere um longo período de evolução e especiação dos fungos negros.

Apesar de se apresentarem bem adap-

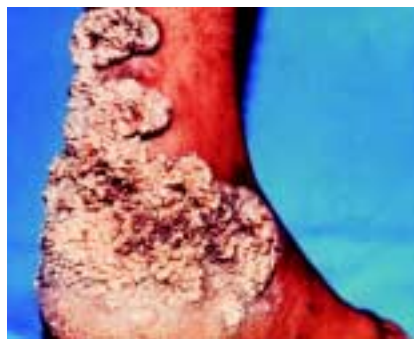


Figura 1: Lesão do tipo “couve-flor” (Cromoblastomicose) causada pelo fungo negro *Fonsecaea pedrosoi* (foto gentilmente cedida pelo Dr. Claudemir R. Aguiar, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais)

tados ao solo, a cada ano que passa têm surgido inúmeros relatos de espécies de fungos negros causando doenças em animais vertebrados e em plantas. Estas espécies também vêm sendo implicadas em casos de micotoxicoses em animais de criação extensiva. Em humanos, os fungos dematiáceos são descritos como agentes etiológicos da cromoblastomicose, da feohifomicose e do micetoma em menor grau de importância.

Cromoblastomicose e Feohifomicose

A cromoblastomicose é uma infecção crônica, granulomatosa que acomete pele e tecidos subcutâneos, onde o fungo se implanta por algum traumatismo na pele. Lesões satélites podem também ocorrer próximas à área da infecção, através da difusão das formas infectivas pelos vasos linfáticos (Figura 1). A frequência desta doença é muito maior entre os lavradores,

devido ao seu contato freqüente com o solo. Estas lesões são secas, não provocam dor, não têm mal cheiro e portanto torna-se muito comum observarmos casos de lavradores que apresentam a lesão por muitos anos. Entretanto, a lesão tende a se expandir pelo órgão afetado, tornando o tratamento cada vez mais difícil. Esta doença tem distribuição mundial e o principal agente é a *Fonsecaea pedrosoi*.

Feohifomicose é um termo adotado para designar infecções cutâneas ou sistêmicas onde os fungos se desenvolvem nos tecidos do hospedeiro na forma de hifas septadas, pseudo-hifas, ou leveduras negras. Dependendo de onde se localiza a lesão a doença pode ser designada como feohifomicose cutânea, subcutânea, corneal, ou sistêmica, podendo atingir o baço, fígado ou cérebro. A forma mais comum é a feohifomicose cerebral. A feohifomicose é considerada uma infecção do tipo oportunista, uma vez que apresenta-se em pacientes imunodeprimidos portadores de doenças como diabetes *mellitus*, câncer, AIDS e em indivíduos transplantados. Devido ao diagnóstico tardio e à falta de um tratamento eficaz o óbito costuma ocorrer em menos de um ano.

A cromoblastomicose distingue-se da feohifomicose por diferenças em seu aspecto clínico, na forma de apresentação do agente nos tecidos do hospedeiro e, em menor grau, na classificação taxonômica dos agentes etiológicos. Entretanto, a cada momento surgem novos relatos de espécies agentes da feohifomicose causando cromoblastomicose e vice-versa.

O nosso laboratório tem acompanhado alguns casos de pacientes apresentando estas lesões. O nosso papel é o de identificar o agente causal e realizar antibiogramas para a seleção da droga de escolha para o tratamento (Caligiorne *et alii*, 1999a). A Figura 2 ilustra o relato de

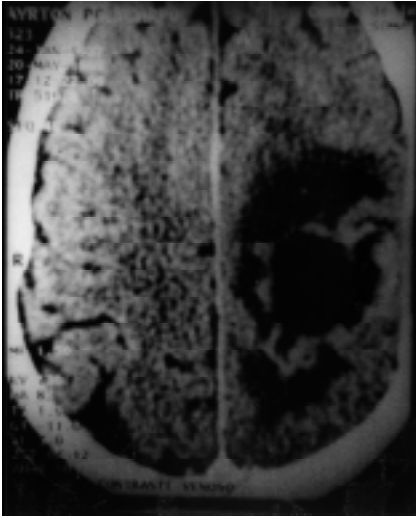


Figura 2: Tomografia dos hemisférios cerebrais de paciente com abscesso cerebral causado pelo fungo negro *Cladophialophora bantiana* (cortesia do Dr. Eduardo R. Silveira, do Hospital Vera Cruz de Belo Horizonte)

um caso ocorrido no Hospital Vera Cruz de Belo Horizonte. Trata-se de um paciente de 61 anos de idade, transplantado renal, e que vinha há quatro anos, recebendo o tratamento usual com imunossuppressores para evitar a rejeição do novo órgão. No final deste período o paciente apresentou um abscesso cerebral semelhante a um tumor. Este paciente sofreu uma cirurgia onde foi retirado o abscesso, que apresentava-se encapsulado e de cor amarronzada. Os exames micológicos demonstraram ser o agente causal um fungo negro da espécie *Cladophialophora bantiana*. Esta espécie, de fato, é um dos agentes mais comuns de feohifomicose cerebral em todo o mundo. O paciente recebeu o tratamento com antifúngicos e as doses de imunossuppressores foram diminuídas. Entretanto, o paciente foi a óbito após um período de 6 meses (Silveira *et alii*, 1999).

Os fungos dematiáceos formam um grupo de inúmeros gêneros e espécies intimamente relacionadas, tornando a sua taxonomia controversa e polêmica. As técnicas de biologia molecular, associadas aos caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos têm dado novos rumos à taxonomia destes fungos (de Hoog, 1997). Desta forma, a família Dematiaceae deixa de existir e os fungos negros patógenos humanos passaram a integrar a família Herpotrichiellaceae (Alexopoulos *et alii*, 1996). Os principais patógenos de plantas passam a pertencer à família Pleosporaceae. Contudo, têm sido descritos vários casos de espécies desta família

infectando o homem (Rao *et alii*, 1989; Gadallah *et alii*, 1995; Fryen *et alii*, 1999).

Apesar de não mais existir a família Dematiaceae, o termo Fungos Dematiáceos continua sendo uma expressão preservada pelos micologistas.

Helminthosporiose e Antracnose

A maior parte das doenças de plantas é causada pelos fungos. Enquanto as bactérias e os vírus estão associados a centenas, os fungos estão associados a milhares de fitopatologias. Doenças como as ferrugens, os carvões, a requeima da batatinha, as murchas do algodoeiro e do tomateiro, a brasone do arroz, a antracnose do feijoeiro e do sorgo, as helmintosporioses do milho, do sorgo, do arroz e do trigo são exemplos de micoses de plantas.

Os fungos dematiáceos causam a helmintosporiose ou manchas em diversas famílias de plantas, tendo uma grande importância em culturas como o trigo, milho, arroz, sorgo, cevada, aveia e centeio. As espécies dos gêneros Drechslera, Bipolaris e Exserohilum são fungos negros bem conhecidos entre os agricultores de todo o mundo. Alguns grupos de plantas, como as palmeiras, os cactos, as leguminosas, as gramíneas, as plantas produtoras de látex, o trigo, o milho, o arroz e o café, são afetados por estas espécies.

Nas plantas a infecção ocorre pela penetração do micélio dos fungos através de ferimentos ou pelas aberturas naturais, como os estômatos. Os traumatismos causados por insetos no colo das plantas constituem porta de entrada para a invasão dos fungos. Após ocorrer a penetração, as células fúngicas são capazes de elaborar enzimas e ácidos orgânicos que têm a capacidade de desdobrar substâncias

como celulose, açúcares, gorduras e proteínas, transformando-as em formas possíveis de serem assimiladas e utilizadas pelo fungo como fonte de energia para seu crescimento e reprodução. A remoção desses nutrientes, que seriam aproveitados pelo próprio hospedeiro, pode ser suficiente para levar a planta a exibir os sintomas característicos da helmintosporiose.

Estudos da parede destes fungos revelaram a presença da enzima xilanase. Esta enzima está relacionada ao parasitismo do hospedeiro e a sua atividade extracelular foi bem estudada em *Helminthosporium turcicum*, agente da helmintosporiose no milho. Alguns estudos demonstram o aumento de sua produção quando o fungo está em crescimento nos tecidos da planta, demonstrando a natureza adaptativa desta enzima (Choudhary, 1990, Degefu *et alii*, 1995).

Outras substâncias também são formadas pelo metabolismo do fungo, tais como as toxinas, hormônios reguladores de crescimento, polissacarídeos e antibióticos. Estas substâncias podem atuar diretamente por injuriar as células vegetativas, ou, indiretamente, por interferir nos processos metabólicos da planta. Nos tecidos afetados pode haver, por exemplo, um aumento na taxa de respiração e um decréscimo na eficiência respiratória.

A gravidade de muitas doenças depende da dose de nitrogênio aplicado no solo. Desse modo, a mancha da folha do milho, causada por *Exserohilum turcicum* é uma doença cuja incidência e gravidade são maiores quando se usa nitrogênio na forma de nitrato (Soave & Moraes, 1987).

Uma significativa parcela dos agentes fitopatogênicos, entre eles os fungos negros, encontra-se comumente associada às sementes das plantas. As sementes são suscetíveis à invasão de fungos durante o



Figura 3: Antracnose foliar com lesões coalescentes e abundante produção de acérvulos, causada pelo fungo negro *C. graminicola* (foto gentilmente cedida pelo Dr. Carlos R. Casela – EMBRAPA- Milho e Sorgo- Sete Lagoas -MG)

seu crescimento, na maturação e mesmo após a colheita, durante o armazenamento. A semente é um dos veículos mais eficientes na disseminação de patógenos das culturas que alimentam a espécie humana e animal, pois qualquer microrganismo que sobreviva na semente, da colheita ao plantio seguinte, pode ser levado a qualquer parte do mundo, não havendo barreiras geográficas que o detenha. O fungo *Drechslera oryzae*, agente da helmintosporiose em arroz é capaz de sobreviver nas sementes e nos restos de cultura de um ano para o outro.

Normalmente a semente apresenta, na sua superfície, uma flora microbiana composta de inúmeras bactérias e fungos saprofiticos que podem ser antagonicos aos patógenos que atacam as sementes e as plântulas. Estudos da atividade antimicrobica de bactérias revelaram que algumas apresentam eficiência antagonica contra *Drechslera oryzae* em sementes de arroz. Testes de sanidade de sementes demonstraram que sementes de trigo, sabidamente contaminadas com *Bipolaris sorokiniana*, tiveram a incidência desse fungo reduzida quando colocadas em contato com colônias de *Bacillus subtilis*, por períodos de tempo determinados. A capacidade protetora exibida por *Saccharomyces cerevisiae* na possível redução da helmintosporiose em plântulas de milho também foi avaliada por alguns autores, evidenciando a possibilidade da proteção ocorrer através de mecanismos que envolvam o fenômeno da antibiose e/ou a indução de resistência.

A antracnose é outra patologia causada por um fungo dematiáceo. Neste caso o agente é o *Colletotrichum graminicola*, que apresenta uma alta especificidade ao sorgo. A fase foliar da doença pode causar reduções acima de 50% na produção de grãos (Figura 3). Os danos causados pela doença são influenciados pelo grau de susceptibilidade da cultivar, pela ocorrência de condições ambientais favoráveis, pela agressividade do patógeno e pelo estágio fisiológico da planta (Casela & Ferreira, 1998). A alta variabilidade genética deste patógeno tem dificultado a obtenção de linhagens de plantas resistentes.

Marcadores moleculares

Desde que tem sido facilitada a extração do material genético dos fungos, através da utilização do nitrogênio líquido ou de enzimas específicas que permitem a quebra da sua parede celular, a

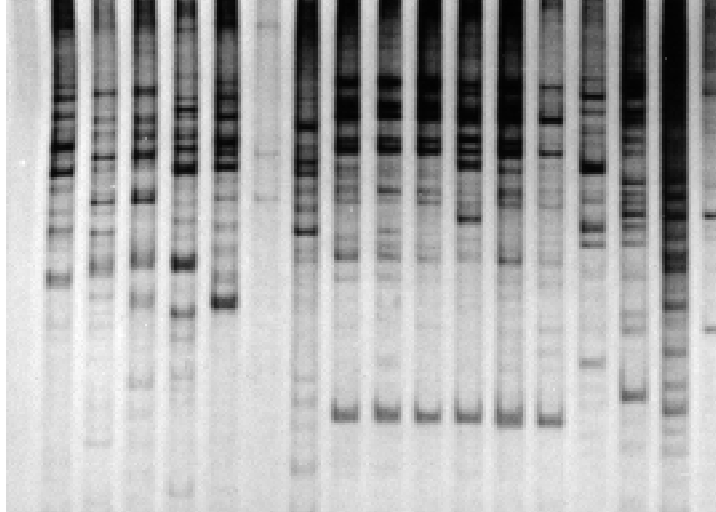


Figura 4: Gel de eletroforese em acrilamida a 6%, corado pela prata, apresentado os perfis de amplificação das amostras pela técnica de RAPD. As amostras estão dispostas na seguinte ordem: isolados de *D. oryzae* - canaletas 2 a 8; isolados de *B. sorokiniana* - 9 a 14; isolados de *D. maydis* - canaletas 15 e 16; isolados de *E. turcicum* - 17 e 18. O controle negativo está na canaleta 1

biologia molecular tem sido cada vez mais explorada no estudo da variabilidade genética destes microrganismos. Técnicas moleculares como o uso de oligonucleotídeos fluorescentes, o RAPD (amplificação aleatória de genomas polimórficos) o RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição) e o PFGE (eletroforese em campo de pulso alternado) são exemplos de marcadores moleculares e têm a vantagem de fornecer importantes dados sobre o polimorfismo genético entre populações e espécies afins, mesmo quando ainda conhecemos muito pouco de seus genomas. Com a aplicação destas técnicas torna-se possível analisar a relação entre os agentes, identificando semelhanças e divergências entre seus genomas, explicar o endemismo de algumas espécies em determinadas regiões, mapear genes importantes e entender a sua evolução e disseminação por todo o mundo.

Em nosso laboratório têm sido aplicados marcadores moleculares para a caracterização da variabilidade genética entre diferentes isolados de *C. graminicola*. Desta forma, foram utilizadas trinta e sete amostras, oriundas de 4 culturas de sorgo, distribuídas em diferentes regiões do Brasil. Foi aplicada a técnica de RAPD, utilizando-se 15 iniciadores de 10 bases. Os resultados demonstram polimorfismos entre as amostras das diferentes regiões de plantio, indicando que a distribuição geográfica é um fator que gera polimorfis-

mos entre os agentes da antracnose do sorgo.

Ainda neste trabalho, foram caracterizadas as raças de virulência dos isolados de *C. graminicola*. Para isso os isolados foram inoculados em 10 cultivares diferenciadoras, com seus diferentes graus de susceptibilidade ao patógeno. Não foi possível demonstrar com segurança se há correlação entre os fenótipos de virulência

observados e os perfis obtidos pela RAPD. As raças de *C. graminicola* obtidas nas diferentes regiões apresentam grande similaridade nos seus perfis de virulência, demonstrando que a variação destes está mais associada à diversidade de plantas com diferentes graus de susceptibilidade que às suas origens geográficas de isolamento (Valério, 1999).

A técnica de RAPD também foi aplicada na caracterização da variabilidade genética entre os agentes das helmintosporioses do arroz, milho e trigo. Foram estudadas 7 amostras de *Drechslera oryzae*, isoladas de cultivos de arroz de diferentes regiões do Brasil, 6 amostras de *Bipolaris sorokiniana*, isoladas de diferentes cultivos de trigo, 2 amostras de *D. maydis* e 2 de *Exserohilum turcicum*, isolados de diferentes culturas do milho. Foram utilizados 13 iniciadores gerando 159 bandas polimórficas entre as amostras estudadas. Os perfis de amplificação dos genomas dos agentes do milho e do arroz foram altamente polimórficos entre si, apresentando diferenças de acordo com as suas distribuições geográficas. Por outro lado os 7 isolados do trigo apresentaram perfis de amplificação bastante monomórficos entre si (Figura 4). Estes resultados prévios demonstram que apesar de serem provenientes de diferentes regiões do Brasil, os fungos negros, agentes da helmintosporiose do trigo, não apresentam diferenças nos seus genomas. Uma análise mais extensiva, com um maior número de isolados, poderá fortalecer os estudos sobre a interação do fungo com os cultivares de trigo (Oliveira *et alii*, 1999).

As técnicas de RAPD e PCR-RFLP também foram aplicadas com o objetivo de padronizar uma técnica voltada para a identificação de espécies e diagnóstico da cromoblatomicose e feohifomicose (Caligiorno, 1999b). A técnica de PCR-RFLP consiste na amplificação de regiões do genoma de interesse com a posterior digestão com enzimas de restrição. Os resultados obtidos revelam os polimorfismos nos sítios de reconhecimento das

enzimas. Os genes das subunidades ribossômicas são bastante utilizados uma vez que esta região do genoma permite a diferenciação entre gêneros e espécies afins.

Em uma experimentação prévia, utilizamos 12 isolados clínicos de diferentes espécies. O DNA das amostras foram amplificadas utilizando-se iniciadores específicos para o gene da subunidade 18S. O fragmento gerado foi digerido com 12 enzimas de restrição a fim de se obter perfis polimórficos entre as espécies testadas. Os perfis de restrição obtidos pela digestão com as enzimas *HinfI* e *HaeIII* diferenciam o gênero *Fonsecaea* dos demais gêneros (Figura 5). Este resultado abre perspectivas para a padronização desta técnica na identificação precisa das espécies deste gênero e portanto, no diagnóstico da cromoblastomicose e feohifomicose. (Caligiorne *et alii*, 1999c).

Os resultados apresentados neste artigo têm o propósito de ilustrar uma linha de pesquisa voltada para a caracterização da variabilidade genética entre os diversos grupos de fungos dematiáceos. Os marcadores moleculares têm contribuído enormemente nesta tarefa. Os dados gerados por estas técnicas têm sido aplicados na taxonomia, identificação das espécies e na padronização de um diagnóstico preciso, o que resulta em um tratamento mais eficaz para as diversas patologias causadas pelos fungos negros. Além disso, entendendo o processo evolutivo destas espécies, ou seja, a sua interação com os diferentes hospedeiros e a diferenciação de acordo com sua distribuição geográfica, poderemos estender estes conhecimentos para outras análises evolutivas, criando bases mais sólidas para o pleno conhecimento do ecossistema em que estas espécies estão inseridas e a sua evolução.

REFERÊNCIAS

ALVIANO, C.S.; FARBIARZ, S.R. *et alii*. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* Melanin. **J. Gen. Microbiol.**, v.137, p.837-844. 1991.

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. John Wiley & Sons, INC. New York, 1996.

CALIGIORNE, R.B., RESENDE, M.A., MELILLO, P.H.C., PELUSO, C.P., CARMO, F.H.S. and AZEVEDO, V. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. **Medical Mycology**, v. 37. 1999 (a). [In press]

CALIGIORNE, R.B., RESENDE, M.A., PAIVA, E. and AZEVEDO, V. Use of RAPD (random amplified polymorphic DNA) to analyse genetic diversity of dematiaceous fungal pathogens. **Can. J. Microbiol.**, v.45, n.5, p.408-12. 1999 (b).

CALIGIORNE, R.B., RESENDE, M.A., DIAS-NETO, E, OLIVEIRA, S.C. and AZEVEDO, V. Dematiaceous fungal pathogens: analysis of ribosomal DNA gene polymorphisms by PCR-RFLP. **Mycoses**,

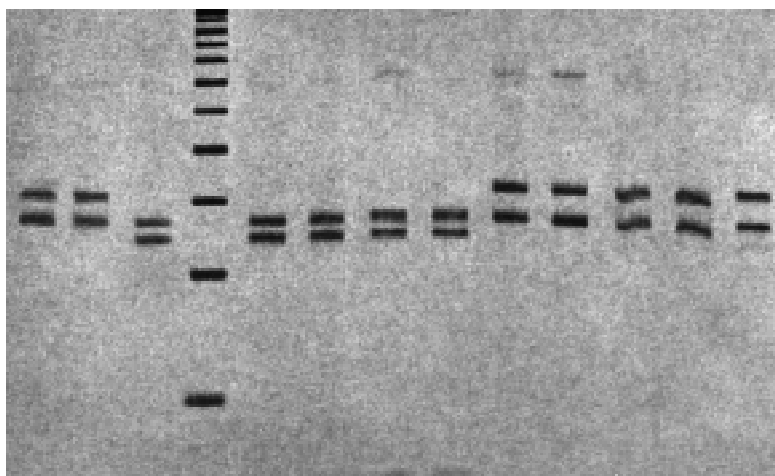


Figura 5. Gel de eletroforese em acrilamida a 6%, corado pela prata, apresentado os perfis de restrição das amostras pela técnica de PCR-RFLP. Isolados de *Rhinacladiella aquaspersa* – canaletas 1 e 2; isolados de *Fonsecaea pedrosoi* – canaletas 3 a 5; Isolados de *Fonsecaea compacta* – canaletas de 6 e 7; isolados de *Cladophialophora carrionii* – canaletas 8 e 9; isolados de *Phialophora verrucosa* – canaletas 10 e 11; Isolado de *C. bantiana* – canaleta 12

v.42, n.11-12. 1999 (c). [In press]

CASELA, C.R., FERREIRA, A. **Antracnose do sorgo (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: EMBRAPA – CNPMS, 1998. 19 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 28).

CHOUHARY, D.P. Extracellular cellulolytic enzyme activity of *Helminthosporium turcicum*, the incitant of leafblight of maize. **Enviro. Ecol.**, v.8, n. 4, p.181-184. 1990.

DEGEFU, Y., FEGERSTROM, R and KALKKINEN, N. Purification na partial

characterization of xylanase from the fungal maize pathogen *Helminthosporium turcicum*. **European J. Plant Pathology**, v.101, n.3, p.291-299. 1995.

FRYEN, A. *et alii*. Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris (Drecheslera) hawaiiensis*. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v.256, n. 7, p. 330-334. 1999.

JACOBSON, E.S, HOVE, E., EMERY, H.S. Antioxidant function of melanin in black fungi. **Infect Immun**, v.63, n.12, p.4944-45. 1995.

GADALLAH, M.F. *et alii*. Peritoneal dialysis complicated by *Bipolaris hawaiiensis* peritonitis. **American J. Nephrology**, v.15, n.4, p.348-352. 1995.

de HOOG, G.S. Significance of the fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. **Mycosis**, v. 40 (suppl.2): p. 5-8. 1997.

OLIVEIRA, R.C.B.W, RESENDE, M.A., PAIVA, E., VALÉRIO, H.M. and CALIGIORNE, R.B. Use of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) to analyse genetic diversity in fungi agents of helminthosporiosis on rice, maize and wheat. **European J. Plant Pathology**. [In Press].

POLAK, A. Melanin as a Virulence Factor in Pathogenic Fungi. **Mycoses**: v.33, n.5, p.215-224. 1990.

RAO, A., FORGAN-SMITH, R., MILLER, S., HASWELL, H. Phaeohyphomycosis of the nasal sinuses caused by *Bipolaris* species. **Pathology**, v.21, n.4, p.280-281. 1989.

SCHNITZLER, N. *et alii*. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. **Infect Immun.**, v.67, p. 94-101. 1999.

SILVEIRA, E.R., RESENDE, M.A MARIA-NO, V.S., COURA, W.A., ALKIMIM. L.D., STARLING, C.E., CRUZ, G.G., BENÍCIO, L.H.A., PAULA, A.M., GOMES, J.A., SANTOS, G.D., MACEDO, M.A.M., SALUM, R.E., RESENDE, L.M.H., GONTIJO, A.M., CALIGIORNE, R.B. Sole *Cladosporium* brain abscess in a renal transplant patient. **Transplantation**. [In press].

SOAVE, J., MOARES, S.A. Fungos em sementes IN: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, cap.2, p. 18-67. 1987.

VALÉRIO, H.M. **Variabilidade genotípica em diferentes populações de *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo (*Sorgum bicolor*)**, através das técnicas de RFLP E RAPD. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 1999.