



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIENE AIRY NAGASHIMA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE FATOR(ES)
HEMOLÍTICO(S) DE *Arthrographis kalrae***

LUCIENE AIRY NAGASHIMA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE FATOR(ES)
HEMOLÍTICO(S) DE *Arthrographis kalrae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2009

LUCIENE AIRY NAGASHIMA

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE FATOR(ES) HEMOLÍTICO(S) DE
Arthrographis kalrae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina, 12 de janeiro de 2009.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina e contou com apoio financeiro da CAPES, SETI/PR, Fundação Araucária e FAEP/PROPPG.

Aos meus pais, Getúlio e Michiko, pela vida,
amor, dedicação e incentivo;
À minha irmã, Agnes, pelo amor, compreensão
e apoio.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e protetor, que sempre me protege e me ilumina em todos os passos da minha vida, por Ele ser tão bom comigo;

À minha família, meu *tudo* na vida, pelo amor eterno e incondicional. Pelo carinho e pela preocupação; pelo colo e pelas broncas; pela educação e pela disciplina; pelos princípios morais, pelas alegrias, pela compreensão; por sempre estar ao meu lado, por sempre me apoiar, sempre me guardar, me ensinar, não importa o esforço e o sacrifício;

À minha orientadora, Professora Doutora Eiko Nakagawa Itano, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, incentivos e pela amizade;

Aos professores doutores Marco Antonio Nogueira e Mário Augusto Ono, por aceitarem prontamente participar da banca de defesa, pelas contribuições para este trabalho e pela dedicação.

Aos técnicos Mári Sumigawa Kaminami e Nilson de Jesus Carlos, pela disposição, por tudo o que me ensinaram e por todo o apoio sempre que precisei;

A todos do Laboratório de Imunologia Aplicada: Audrey de Souza Marquez, Carina Harumi Takahama, Carla Cristine Crude dos Santos, Cauê Zortéa Fernandes Costa, Franciele Ayumi Semêncio Chiyoda, Rafaela Cristina de Almeida, Rosália Hernandez Fernandes-Vivan, Tânia Maris Pedrini Soares da Costa, Thiago Cesar Fujita, Thiago Yuiti Castillho Massuda e Wilson Candido Junior. Àqueles que não somente me ajudaram no trabalho de alguma forma, mas que também se tornaram amigos. Especialmente às colegas e amigas: Fernanda Akemi Nakanishi e Kátia Key Oshiro, que têm minha sincera amizade.

À minha colega e querida amiga Paula Cesar Leonello, que me acompanhou inteiramente neste trabalho, sempre com disposição para me ajudar, seja em qual hora fosse, e que sempre me incentivou e me apoiou.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, pelo suporte e ajuda.

A todos os professores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas que, de alguma forma, ajudaram na minha formação e por todo o apoio, em especial aos funcionários Jesus Antônio Vargas (Zui) e Ediel Clementino da Costa;

Aos meus familiares, que me apoiaram desde o começo e sempre torceram por mim;

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela oportunidade de realizar o curso e pela infra-estrutura;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa e por tratar a pesquisa de forma séria e profissional;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

NAGASHIMA, Luciene Airy. **Caracterização parcial de fator(es) hemolítico(s) de *Arthrographis kalrae***. 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

No presente estudo, componentes solúveis de *Arthrographis kalrae* foram investigados em relação à imunogenicidade/antigenicidade e atividade hemolítica. Para avaliação da imunogenicidade/antigenicidade, o estudo foi realizado utilizando *cell-free antigens* (CFA) e antígenos sonicados e anticorpos anti-CFA de coelho por imunodifusão (ID)/ELISA/*western blotting* e também análise de frações cromatográficas de Sephadex G-100 e G-200 por ELISA. A atividade hemolítica foi estudada em duas etapas: na primeira foram utilizadas hemácias de carneiro e, na segunda, hemácias de camundongo e anticorpos de camundongo anti-CFA e anti-hemácia de camundongo sensibilizada com CFA (anti-He-CFA). Na segunda etapa, amostras de CFA na forma nativa, CFA aquecido (56 °C, 30 min) ou tratado com anti-He-CFA e as frações obtidas por cromatografia de CFA em coluna de Sephadex G-200, foram analisadas pelo teste de hemólise. Adicionalmente, a reatividade de anti-He-CFA e anti-CFA com antígeno CFA foi analisada por ELISA utilizando frações de cromatografia de G-200 ou por *western blotting*. Os resultados da primeira etapa demonstraram um pico de reatividade das frações de CFA em Sephadex G-100 e dois picos de reatividade em Sephadex G-200 com soro imune de coelho. Os resultados de *western blotting* mostraram que anti-CFA de coelho reconheceram várias bandas com MM distintas, sendo o perfil diferenciado em relação ao preparado antigênico. A análise de atividade hemolítica resultou em lise das hemácias de carneiro. Utilizando eritrócitos de camundongo foi observada atividade lítica similar com CFA na forma nativa e CFA aquecido, e diminuição da atividade com amostras de CFA tratadas com anti-He-CFA, sugerindo especificidade dos anticorpos aos fatores responsáveis pela hemólise. Atividade hemolítica foi observada nas frações obtidas por cromatografia em Sephadex G-200, também positivas com IgG de camundongo anti-He-CFA por ELISA. *Western blotting* resultou em duas bandas principais com MM ~252 kDa e ~79 kDa reconhecidas por IgG de camundongo anti-He-CFA. Conclui-se que o fungo *A. kalrae* libera pelo menos dois componentes principais com antigenicidade, imunogenicidade e atividade hemolítica, os quais são termoestáveis e com MM > 200 kDa e ~79 kDa

Palavras-chave: Cromatografia. *Cell-free antigens*. Anticorpos policlonais. ELISA. *Western blotting*

NAGASHIMA, Luciene Airy. **Partial characterization of hemolytic factor(s) of *Arthrographis kalrae***. 2009. 49 f. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

In this study, soluble components of *Arthrographis kalrae* have been investigated for immunogenicity/antigenicity and hemolytic activity. For immunogenicity/antigenicity assays, *A. kalrae* cell-free antigens (CFA), sonicated antigens (SA) and rabbit anti-CFA by immunodiffusion (ID)/enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)/western blotting (WB) were used in addition to Sephadex G-100 and G-200 chromatography fractions analysis by ELISA. The hemolytic activity was performed with either sheep red blood cells (SRBC) or mouse red blood cells (MRBC) and mouse anti-CFA and mouse anti-MRBC sensitized with CFA (anti-MRBC-CFA). For mouse, CFA in its native form, previously heated CFA (56 °C, 30 min) (hCFA) or treated with anti-MRBC-CFA and CFA Sephadex G-200 chromatography fractions were analyzed by hemolytic assay. Additionally, the reactivity of the anti-MRBC-CFA or anti-CFA with CFA Ags was analyzed by ELISA using Sephadex G-200 chromatography fractions or by WB. The results using rabbit serum demonstrated one peak of reactivity in fractions of Sephadex G-100 and two peaks of reactivity in Sephadex G-200 for CFA antigens. Results of WB showed that rabbit anti-CFA recognized several bands with distinct MM, being the profile differentiated in respect to the antigen preparation. Analysis of hemolytic activity resulted in lyses of the SRBC. Using MRBC, hemolytic activity was observed with CFA and hCFA and hemolytic activity decreased with CFA anti-MRBC-CFA treated samples, suggesting specificity of the antibodies to the factors responsible for hemolysis. Hemolytic activity was observed in chromatography G-200 fractions, also positive with anti-MRBC-CFA by ELISA. WB resulted in two main bands with MM ~252 kDa and ~79 kDa recognized by anti-MRBC-CFA. In conclusion, *A. kalrae* releases at least two main components with antigenic, immunogenic and with hemolytic activity, which are thermostable with MM > 200kDa and ~79 kDa.

Keywords: Chromatography. Cell-free antigens. Polyclonal antibodies. ELISA. Western blotting.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO A

- Figura 1** – Spectrophotometric profile at 280 nm of *A. kalrae* CFA in Sephadex G-200 chromatography. Immunoplates were coated with the fractions and incubated with polyclonal antibodies anti-*A. kalrae*, followed by anti-rabbit IgG peroxidase conjugate, ortho-phenylenediamine substrate and read at 492 nm.25
- Figura. 2** – Results of western blotting with polyclonal antibodies anti-*A. kalrae*. Samples: A1) CFA; B1) SA; 2) Sephadex G-100 chromatography: 1st peak fraction; 3) G-100 intermediary fraction; 4) G-100 2nd peak fraction; 5) Sephadex G-200 chromatography: 1st peak fraction; 6) G-200 intermediary fraction; 7) G-200 2nd peak fraction, in respect to CFA (A) and SA (B). MM= molecular mass standard.....25
- Figura 3** – Analysis of hemolytic activity. Samples, in duplicate, from pure and diluted in series (1/2, 1/4 and 1/8): CFA (A) and SA (B). Controls: negative (C1 and C2) and positive (C3 to C6).256

ARTIGO B

- Figura 1** – Teste de hemólise de amostras de CFA de *A. kalrae* na forma nativa (1) e após aquecimento a 56 °C por 30 min (2), puras (A) e nas diluições 1/2 (B) e 1/4 (C)43
- Figura 2** – Análise quantitativa do efeito do aquecimento de amostra de CFA de *A. kalrae* na atividade hemolítica43
- Figura 3** – Análise quantitativa de hemólise das frações de CFA de *A. kalrae* obtidas por cromatografia por gel filtração em coluna de Sephadex G-200 em D.O. a 550 ηm44
- Figura 4** – Análise de reconhecimento das frações de CFA de *A. kalrae* obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 por soro imune de camundongo anti-CFA por ELISA45
- Figura 5** – Análise de reconhecimento das frações de CFA de *A. kalrae* obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 por soro imune de camundongo anti-He-CFA por ELISA.....46

Figura 6 – *Western blotting* de CFA de *A. kalrae* (SDS-PAGE gel gradiente 5-15%) utilizando anticorpos anti-CFA total e anticorpos anti-He autóloga sensibilizada com CFA.....47

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

~	Aproximadamente
Ags	Antígenos
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
CFA	<i>Cell-free Antigens</i>
DAB	Diaminobenzidina
D.O.	Densidade Óptica
DEAE-celulose	Dietilaminoetil-celulose
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
ID	Imunodifusão Radial Dupla
kDa	Quilodalton
mA	Miliampères
MM	Massa Molecular
OPD	Orto-Feniletildenodiamino Diidrocloreto
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
UEL	Universidade Estadual de Londrina
V	Volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 ARTIGO A: PARTIAL CHARACTERIZATION OF SOLUBLE COMPONENTS OF <i>Arthrographis kalrae</i>	20
Summary	20
INTRODUCTION	21
MATERIALS AND METHODS	21
RESULTS.....	22
CONCLUSION.....	23
REFERENCES	23
4 ARTIGO B: PRODUÇÃO E ANÁLISE DE ANTICORPOS POLICLONAIS A ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>Arthrographis kalrae</i> COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA	27
4.1 RESUMO	27
4.2 ABSTRACT.....	28
4.3 INTRODUÇÃO	28
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.4.1 Microrganismo	30
4.4.2 Animais.....	30
4.4.3 Obtenção de Cell-free Antigens (CFA).....	30
4.4.4 Teste de Hemólise com CFA na Forma Nativa e CFA Submetido a Aquecimento.....	31
4.4.5 Cromatografia por Gel Filtração em Sephadex G-200	31
4.4.6 Teste de Hemólise das Frações de Cromatografia de Exclusão em Sephadex G-200	32
4.4.7 Obtenção de Anticorpos Policlonais Anti-CFA	32
4.4.8 Imunização de Camundongos com Hemácia Isogênica Sensibilizada com Antígeno Solúvel (He-CFA)	32
4.4.9 Teste de Inibição de Hemólise com Anti-He-CFA	33

4.4.10 Análise da Reatividade das Frações de CFA de <i>A. kalrae</i> (Sephadex G-200) com os Anticorpos Anti-CFA e Anti-He-CFA	33
4.4.11 Western Blotting	34
4.4.12 Análise Estatística	34
4.5 RESULTADOS.....	35
4.5.1 Teste de Hemólise com Antígenos: CFA e CFA Submetido a Aquecimento.....	35
4.5.2 Teste de Hemólise das Frações de cromatografia de Exclusão em Sephadex G-200	35
4.5.3 Teste de Inibição de Hemólise com Anti-He-CFA	35
4.5.4 ELISA para Reconhecimento das Frações de Sephadex G-200 por Anticorpos anti-CFA e anti-He-CFA	35
4.5.5 Western Blotting	36
4.6 DISCUSSÃO	36
4.7 REFERÊNCIAS.....	39
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Arthrographis kalrae, anteriormente denominado *Oidiodendron kalrai*, é um fungo dimórfico, cosmopolita, neurotrópico, ocasionalmente descrito como um patógeno oportunista humano.

A patogenicidade do fungo e seus efeitos neurológicos já foram demonstrados em camundongos infectados, causando síndrome neurológica e lesões principalmente no cérebro e rins. Em humanos, o fungo já foi descrito em diversas manifestações clínicas, como queratites, eumicetoma, onicomicoses, sinusites e meningite, podendo ser fatal. No entanto, seus fatores de virulência e mecanismo de patogenicidade ainda não estão esclarecidos.

A atividade proteolítica que o fungo possui, com produção de um complexo de pelo menos seis enzimas proteolíticas intracelulares capazes de hidrolisar caseína, hemoglobina, gelatina, lactalbumina, orceína-elastina, colágeno e membrana basal de rim de coelho, parece ter um papel importante na patogênese do fungo.

Foi demonstrado, em encefalite micótica em camundongos, que a forma invasiva do fungo é a fase micelial, sendo capaz de penetração vascular por entre as células endoteliais.

Considerando que os fatores de virulência do fungo *A. kalrae* são pouco conhecidos, o seu estudo poderá contribuir para melhor compreensão do mecanismo de patogenicidade das diferentes manifestações clínicas da doença.

No presente trabalho, objetivou-se caracterizar parcialmente os componentes solúveis de *A. kalrae* isolado de águas termais e investigar a atividade hemolítica do fungo, atividade esta descrita pela primeira vez na literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Arthrographis kalrae é um fungo dimórfico que se apresenta na fase filamentosa em temperatura ambiente (25 °C) e na fase leveduriforme a 37 °C. No entanto, o dimorfismo apresentado pelo fungo é, além de temperatura-dependente, nutrição-dependente, sendo que no tecido infectado, o fungo ocorre predominantemente na forma micelial (TEWARI; MACPHERSON, 1968; 1971). Sua forma filamentosa consiste de hifas septadas, ramificadas ou não, com artroconídias ovais a redondas em cadeia na extremidade de conidióforos arborescentes ou não ramificados, com ocasionais clamidósporos uni ou multicelulares. Macroscopicamente forma colônias brancas ou cor creme, com aspecto aveludado ou com textura poeirenta a granular. Na sua forma leveduriforme forma células ovais ou elípticas, podendo-se encontrar uma mistura de blastóporos, artrósporos e até hifas septadas. Macroscopicamente foram observadas colônias de cor creme, com aparência enrugada, passando a aveludadas depois de três a sete dias de incubação. O fungo também tem capacidade de crescimento a 42 °C (TEWARI; MACPHERSON, 1968, 1971; CHIN-HONG et al., 2001; XI et al., 2004; PICHON et al., 2008).

O microrganismo foi descrito pela primeira vez em 1971 por Tewari e Macpherson e denominado de *Oidiodendron kalrai*, originalmente isolado de escarro humano e de lesões na pele de animais (cachorro e cavalos) (TEWARI; MACPHERSON, 1971). Posteriormente, foi re-classificado como *Arthrographis kalrae* com base em seu conidióforo e conídios. O gênero *Oidiodendron* possui septos entre os conídios sésseis e seus conidióforos e conídios geralmente são pigmentados (SIGLER; CARMICHAEL, 1983). Recentemente o referido fungo tem sido isolado de águas termais naturais usadas em recreação no Japão (SANO A., 2005, comunicação pessoal).

Arthrographis kalrae pertence ao filo Ascomycota, da classe dos Euascomycetes, da ordem Eurotiales e da família Eremomycetaceae. O gênero *Arthrographis* é caracterizado pela presença de conidióforos diferenciados e a formação de artroconídia a partir de hifas férteis. A fase anamórfica (assexual) do gênero consiste de cinco espécies: *A. cuboidea*, *A. lignicola*, *A. pinicola*, *A. alba* e *A. kalrae*, sendo que as três primeiras ocorrem em madeira, enquanto que *A. alba* foi

recentemente descrita e isolada de sedimentos marinhos e de excrementos de carneiro (GENÉ et al., 1996). Sua forma teleomórfica é considerada como sendo *Eremomyces langeronii* (MALLOCH; SIGLER, 1988).

A análise da composição química de células de *A. kalrae* em diferentes estágios de crescimento revelou que componentes como o RNA, proteína, lipídio e carboidrato, variaram conforme a idade da cultura. Comparando o cultivo do fungo após 48 h em meio líquido sintético com sais de amônio e em caldo de triptona, verificou-se que as células cresceram mais rapidamente no meio de triptona, contendo menor nível de carboidratos e maior nível de lipídios. As células crescidas no meio sintético, entretanto, continham mais carboidratos e menos lipídios. Os resultados sugerem que tanto o tipo de meio quanto a idade da cultura são determinantes na composição química deste fungo (CINO; TEWARI, 1976a).

Dentre suas características bioquímicas, está sua capacidade de hidrolisar uréia em 24 h e caseína em 48 h a 37 °C, sendo que a hidrólise da caseína foi maior na forma micelial do fungo. Além disso, não houve fermentação de glucose, galactose, maltose, lactose, sacarose, salicina, adonitol, rafinose, trealose e inulina (TEWARI; MACPHERSON, 1971).

Tewari e Macpherson (1968) demonstraram a patogenicidade de *A. kalrae* e seus efeitos neurológicos em camundongos. Os animais infectados com a fase leveduriforme do fungo apresentaram uma síndrome neurológica complexa, com hiperirritabilidade, ataxia, giros e saltos. Houve taxa de mortalidade de 60% quando a inoculação foi via intravenosa (iv) e de 10% por via intraperitoneal (ip), além de os efeitos produzidos pela iv terem sido mais graves que os produzidos pela ip, embora a quantidade de células inoculadas no primeiro grupo fosse quase a metade da quantidade inoculada no último grupo. Lesões foram demonstradas nos rins, cérebro e baço, com focos necróticos e infiltrado inflamatório. Elementos fúngicos (artrósporos e blastóporos e/ou células leveduriformes) foram encontrados nesses órgãos e também no fígado e pulmões.

Swenberg et al. (1969a) usaram este microrganismo como modelo experimental de encefalite micótica, demonstrando a síndrome neurológica e lesões no sistema nervoso central de camundongos infectados com leveduras do fungo, confirmando os resultados anteriores. Além disso, foi visto que o micélio penetra rapidamente nos vasos sangüíneos e nos tecidos adjacentes, sendo esta fase a sua forma invasiva; e que os artrósporos representam a forma mais resistente à resposta

inflamatória do hospedeiro. Neste modelo também foi notada a diferença entre camundongos tratados ou não com cortisona, uma vez que a cortisona deprime o sistema imune, simulando as circunstâncias em que as infecções micóticas ocorrem no homem. A proliferação e invasão do fungo no grupo não tratado diminuíram com o aumento da resposta celular; já no grupo tratado com cortisona, a taxa de mortalidade e a proliferação do fungo foram maiores, continuando as estruturas fúngicas intactas.

Swenberg et al. (1969b) investigaram a patogenicidade de encefalite micótica experimental com *A. kalrae* com microscopia eletrônica. Em camundongos normais, a proliferação do fungo foi maior no segundo dia após infecção e, no terceiro, com edema, áreas de vasculite, e células necróticas, mas com nódulos de células mononucleares e polimorfonucleares, raramente o fungo estava presente, uma vez que o sistema imune conseguiu controlar a proliferação fúngica. As lesões se tornaram menos freqüentes no quarto e quinto dias, e nenhuma lesão foi observada a partir do sétimo dia. Já em camundongos tratados com cortisona, a proliferação fúngica dentro de capilares foi demonstrada já com 8 h após infecção. Os cérebros apresentavam lesões hemorrágicas, necrose e edema, entre o quarto e sexto dia. Uma vez dentro do cérebro, o fungo parecia capaz de crescer em todas as direções. A penetração vascular se deu pela extensão da hifa entre as células endoteliais. Fagocitose e digestão do fungo por astrócitos e células mono e polimorfonucleares foram demonstradas.

A. kalrae, considerado cosmopolita, vem sendo descrito como um patógeno oportunista em humanos, com menos de dez casos relatados. Já foi isolado de escarro e aspirado de lesão pulmonar em uma mulher da Nova Zelândia na década de 80 (SIGLER; CARMICHAEL, 1983).

Em 1997, na França, foi feito o primeiro relato de micetoma causado por *A. kalrae*. O eumicetoma apresentado na mão do paciente foi curado após quatro meses de terapia com itraconazole (DEGAVRE et al., 1997).

Em um estudo avaliando a incidência de sinusite fúngica alérgica em pacientes com rinosinusite crônica, *A. kalrae* foi identificado em 0,5% dos pacientes (PONIKAU et al., 1999).

Chin-Hong et al. (2001) descreveram um caso de pansinusite e meningite com *A. kalrae*, envolvendo um paciente com AIDS, nos EUA. Ele estava

sendo tratado com itraconazole, porém morreu de pneumonia por *Pneumocystis carinii*.

Foram descritos dois casos de queratites nos EUA, cujos pacientes apresentavam intensa fotofobia. As manifestações clínicas e os primeiros achados clínicos davam forte impressão de infecção por *Acanthamoeba*, mas a infecção por *A. kalrae* foi confirmada. Os dois casos envolviam uso de lente de contato, sugerindo que esta pode ter facilitado a invasão do fungo. Além disso, em ambos os casos os pacientes relataram envolvimento com atividades de jardinagem (PERLMAN; BINNS, 1997; BISER et al., 2004).

O primeiro caso de doença causada pelo fungo na China foi descrito em 2004, em um paciente aparentemente saudável antes de receber um trauma em seu olho esquerdo. Ele apresentou panoftalmite e sinusite invasiva envolvendo os seios maxilar e etmóide. Após tratamento com agentes antibacterianos e esteróides, os sintomas pioraram, quando então o agente causal foi identificado e o paciente tratado com antifúngicos. No entanto, foi necessária uma intervenção cirúrgica e o paciente perdeu a visão no olho acometido (XI et al., 2004).

Recentemente foram descritos dois casos envolvendo o fungo *A. kalrae*. Na Eslováquia, esse microrganismo foi isolado de dois pacientes que apresentavam onicomicose (VOLLEKOVÁ et al., 2008). Pichon et al. (2008) descreveram o caso de um paciente, na França, admitido com sinusite aguda, diagnosticado com pneumonia por *Streptococcus pneumoniae* e tratado. No entanto, após duas semanas, apresentou sinusite, hemiplegia e acidente vascular cerebral, levando à morte encefálica. Exames revelaram infecção fúngica no sistema nervoso central, com necrose e trombose, responsáveis pelo infarto e acidente vascular cerebral, com isolamento de *A. kalrae* do fluido cérebro-espinhal.

O mecanismo de infecção de *A. kalrae* ainda não está totalmente esclarecido. A habilidade de formar micélio parece ser um importante fator na patogênese do fungo, uma vez que essa fase representa sua forma invasiva em vasos e tecidos, sendo que os artrósporos representam a forma mais resistente à resposta inflamatória do hospedeiro, além de a penetração vascular ocorrer pela extensão da hifa entre as células endoteliais, conforme foi demonstrado em estudos (SWENBERG et al., 1969a e 1969b).

As características de enzimas proteolíticas intracelulares, com capacidade de hidrolisar caseína, hemoglobina, gelatina, lactalbumina, orceína-

elastina, colágeno e membrana basal de rim de coelho, já foram demonstradas. Purificando essas proteases por combinações de métodos de precipitação em sulfato de amônio, cromatografia em Sephadex G-200 e DEAE-celulose, foi possível identificar um complexo de pelo menos seis enzimas proteolíticas intracelulares. Essa atividade proteolítica que o fungo possui parece ter um papel importante na patogênese do fungo, ainda mais considerando que o microrganismo é encontrado associado aos tecidos do hospedeiro, indicando um papel dessas enzimas no processo infeccioso (CINO; TEWARI, 1975, 1976b).

Assim, na literatura existem poucos dados sobre fatores de virulência de *A. kalrae*, tornando importante a sua investigação tanto pelo fato desse fungo atuar como microrganismo oportunista, podendo estar associado a várias outras doenças ligadas à imunodepressão e principalmente pela inexistência de anticorpos específicos ao fungo, que poderiam contribuir para o estudo da interação parasito hospedeiro e também para fins de diagnóstico.

Dentre os fatores de virulência, a atividade hemolítica, já descrita em *Candida albicans* (MANNIS et al., 1994) e *Histoplasma capsulatum* (FERNANDES-VIVAN, 2008) também poderia estar presente em *A. kalrae*. O estudo desse fator é importante porque, além do papel no transporte de oxigênio no organismo, as hemácias possuem um papel importante na ligação a imunocomplexos circulantes, levando-os para o fígado e baço (GOLDSBY et al., 2002) e a redução no nível de eritrócitos poderia interferir em várias funções biológicas.

3 ARTIGO A: PARTIAL CHARACTERIZATION OF SOLUBLE COMPONENTS OF *Arthrographis kalrae*

NAGASHIMA, L.A.; SANO, A.; KAMEI, K.; NISHIMURA, K.; NAKANISHI, F.A.; ONO, E.Y.S.; ITANO, E.N. Partial characterization of soluble components of *Arthrographis kalrae*. In: Kalil J., Cunha-Neto E., Rizzo L.V. 13th International Congress of Immunology. MEDIMOND International Proceedings, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, p. 557-561, 2007.

Partial characterization of soluble components of *Arthrographis kalrae*

L.A. Nagashima¹; A. Sano²; K. Kamei²; K. Nishimura²; F.A. Nakanishi¹; E.Y.S. Ono¹; E.N. Itano¹

¹State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil, ² Chiba University, Chiba, Japan

SUMMARY

The present study was carried out to partially characterize the soluble components of *Arthrographis kalrae*, an opportunistic human pathogen. The antigens obtained from *A. kalrae* (isolated from thermal waters) were analyzed by immunodiffusion and the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and western blotting (WB) were performed with antigens fractions obtained from Sephadex G-100 and G-200 chromatography. Additionally, the hemolytic activity was investigated. From this study, we concluded that the fungus *A. kalrae* shows at least two main components of molecular mass above 200 kDa and another below 100 kDa with antigenic and immunogenic activity. The profiles of the antigenic components differed in respect to the antigen preparation and *A. kalrae* releases a component with hemolytic activity.

INTRODUCTION

The microorganism *Arthrographis kalrae*, which can be isolated from soil, is a dimorphic fungus (temperature- and nutrition-dependent) that grows in the mycelial phase at room temperature and in the yeast phase at 37 °C¹. This fungus has been described as a pathogen in eumycetoma of dorsal hand²; sinusitis and meningitis in a patient with AIDS³; panophthalmitis and invasive sinusitis⁴, and keratitis^{5,6}.

The pathogenicity of the fungus and its neurologic effects were demonstrated in infected mice, which showed a complex neurologic syndrome and lesions mainly in the kidney and brain¹. The mechanism of infection of *A. kalrae* is unknown. The ability to form mycelia and the existence of proteolytic activity in the fungus seem to be important factors in its pathogenesis^{1,7}.

Considering that virulence factors of this organism are few known, especially when *A. kalrae* is isolated from thermal waters, this study was carried out to partially characterize the soluble components and to investigate the hemolytic activity of *A. kalrae*.

MATERIALS AND METHODS

Antigens preparation: yeast culture of *A. kalrae* isolated from recreation baths of natural thermal waters in Japan were used to prepare the antigens Cell Free Antigen (CFA) and sonicated antigen (SA). CFA was obtained according to Camargo *et al.*⁸, modified by the addition of phenylmethanesulfonyl fluoride protease inhibitor to the supernatant. To obtain SA, the fungal mass was initially triturated and then sonicated 15 cycles (50 hertz) of 2 minutes each.

Polyclonal antibodies anti-*A. kalrae*: 200 µg of CFA was subcutaneously injected into rabbit. Immunization was performed in 3 doses with intervals of 15 days. Ten days after the last dose, rabbit serum was collected.

Chromatography in Sephadex: CFA or SA samples were applied to Sephadex G-100 or G-200 columns, using PBS as eluent. Fractions of 2 mL were collected and read at 280 nm.

ELISA for chromatography fractions: Immunoplates were coated with the fractions of Sephadex columns. Plates were incubated with polyclonal antibodies anti-*A. kalrae*, followed by anti-rabbit IgG peroxidase conjugate and ortho-phenylenediamine substrate. The absorbance was read at 492 nm.

Western blotting: CFA, SA and Sephadex G-100 and G-200 chromatography peaks were subjected to SDS-PAGE gradient gel (5-15%) and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with polyclonal antibodies anti-*A. kalrae* followed by anti-rabbit IgG peroxidase conjugate and diaminobenzidine substrate solution.

Double radial immunodiffusion: glass slides were covered with agar 1%. The central well was filled with anti-*A. kalrae* rabbit serum and the others, with CFA or SA samples (pure and diluted 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32).

Hemolytic activity: CFA and SA samples were diluted in series from pure to 1:32 and then incubated with a 1% sheep red blood cells suspension for 1 h at 37 °C and 24 h at 4 °C.

RESULTS

The results demonstrated two well-defined peaks in Sephadex G-100 and G-200 chromatography for both CFA and SA. ELISA tests demonstrated one peak of reactivity in fractions of Sephadex G-100 and two peaks of reactivity in Sephadex G-200 for CFA antigens (Fig. 1). Molecular mass (MM) of the two positive fractions was estimated as being higher than 200 kDa and lower than 100 kDa based on the exclusion volume. There was no recognition of the second peak of Sephadex G-100 and G-200 chromatography in both CFA and SA by ELISA or WB. The results of WB showed that polyclonal antibodies recognized innumerable bands, of which the most evident in several samples were those of high MM and others of lower MM (105, 80, 65, 55, 43 e 35 kDa), being the profile differentiated in respect to the antigen preparation (Fig. 2). Immunodiffusion showed two lines of precipitation and the analysis of hemolytic activity resulted in lyses of the sheep red blood cells after

incubation with CFA of *A. kalrae* (Fig. 3). The results suggest that the fungus can release a component with hemolytic activity. It could be one new virulence factor of *A. kalrae*. Further studies of characterization of immunogenic components may contribute to the diagnosis and studies of virulence factors and thus with the best understanding of pathogenesis of disease caused by fungus *A. kalrae*.

CONCLUSION

From these results it can be concluded that: a) the two main components of fungus *A. kalrae* can be better separate by Sephadex G-200 than G-100 chromatography; b) the SA preparation presents a higher number of antigenic and immunogenic components than CFA; c) the fungus seems to release a component with hemolytic activity.

REFERENCES

1. TEWARI, R.P.; MACPHERSON, C.R. Pathogenicity and neurological effects of *Oidiiodendron kalrai* for mice. *J. Bacteriol.*, v. 95, n. 3, p. 1130-1139, 1968.
2. DEGAVRE, B.; JOUJOUX, J.M.; DANDURAND, M.; GUILLOT, B. First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: successful treatment with itraconazole. *J. Am. Aca. Dermatol.*, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 318-320, 1997.
3. CHIN-HONG, P.V.; SUTTON, D.A.; ROEMER, M.; JACOBSON, M.A.; ABERG, J.A. Invasive fungal sinusitis and meningitis due to *Arthrographis kalrae* in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 2, p. 804-807, 2001.
4. XI, L; FUKUSHIMA, K; LU, C; TAKIZAWA, K; LIAO, R; NISHIMURA, K. First case of *Arthrographis kalrae* ethmoid sinusitis and ophtalmitis in the People's Republic of China. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 10, p. 4828-4831, 2004.
5. PERLMAN, E.M.; BINNS, L. Intense photophobia caused by *Arthrographis kalrae* in a contact lens-wearing patient. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 123, n. 4, p. 547-549, 1997.
6. BISER, S.A.; PERRY H.D.; DONNENFELD, E.D.; DOSHI, S.J; CHATURVEDI, V. *Arthrographis* keratitis mimicking *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.*, v. 23, n. 3, p. 314-317, 2004.

7. CINO, P.M.; TEWARI, R.P. Purification of *Oidiodendron kalrai* proteases. *Can. J. Microbiol.*, v. 22, n. 3, p. 327-333, 1976.

8. CAMARGO, Z.P.; TABORDA C.P.; RODRIGUES E.G.; TRAVASSOS L.R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 29, p. 31-38, 1991.

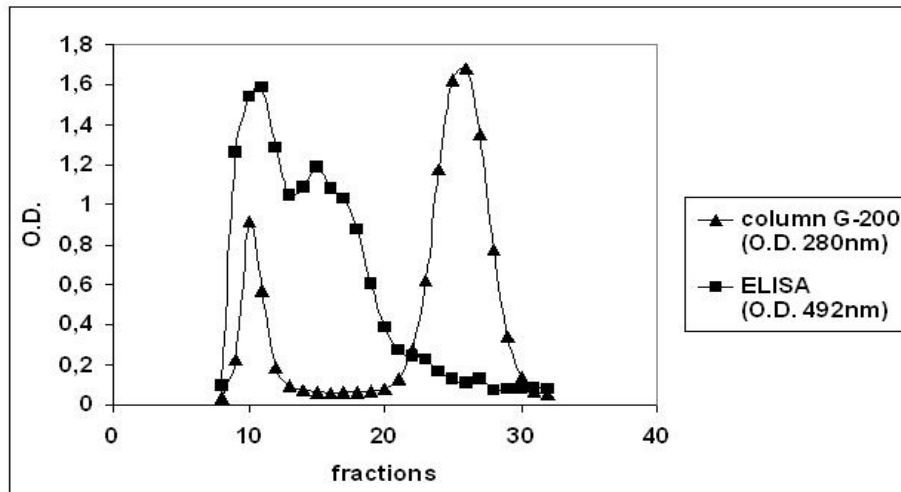


Figura1 – Spectrophotometric profile at 280 nm of *A. kalrae* CFA in Sephadex G-200 chromatography. Immunoplates were coated with the fractions and incubated with polyclonal antibodies anti-*A. kalrae*, followed by anti-rabbit IgG peroxidase conjugate, ortho-phenylenediamine substrate and read at 492 nm.

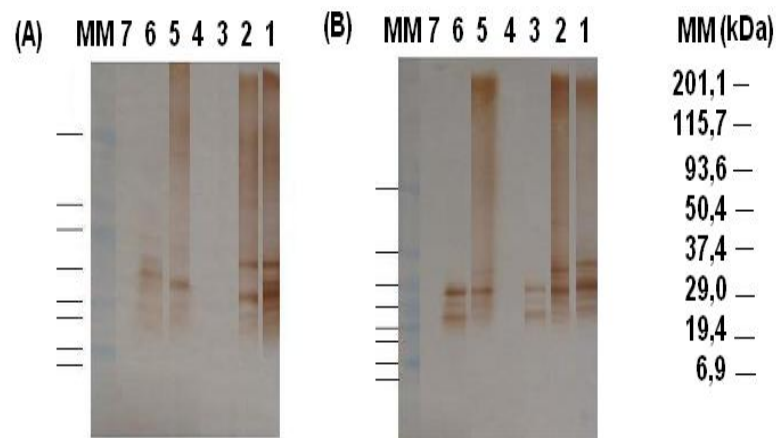


Figura. 2 – Results of western blotting with polyclonal antibodies anti-*A. kalrae*. Samples: A1) CFA; B1) SA; 2) Sephadex G-100 chromatography: 1st peak fraction; 3) G-100 intermediary fraction; 4) G-100 2nd peak fraction; 5) Sephadex G-200 chromatography: 1st peak fraction; 6) G-200 intermediary fraction; 7) G-200 2nd peak fraction, in respect to CFA (A) and SA (B). MM= molecular mass standard.

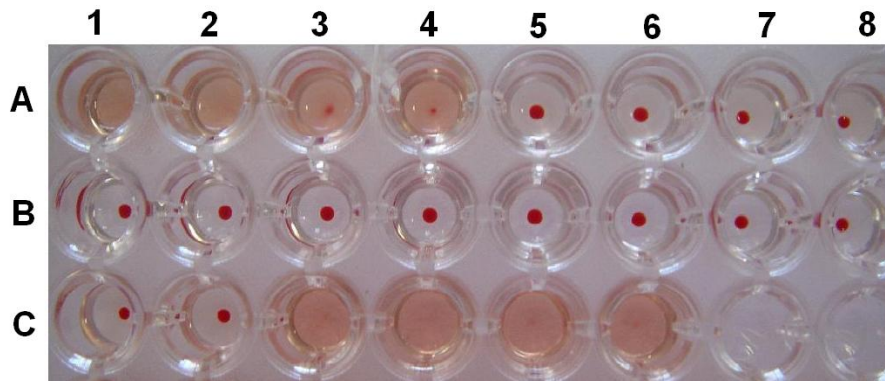


Figura 3 – Analysis of hemolytic activity. Samples, in duplicate, from pure and diluted in series (1/2, 1/4 and 1/8): CFA (A) and SA (B). Controls: negative (C1 and C2) and positive (C3 to C6).

4 ARTIGO B: PRODUÇÃO E ANÁLISE DE ANTICORPOS POLICLONAIS A ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Arthrographis kalrae* COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA

4.1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivo obter e analisar anticorpos policlonais mais específicos a antígenos solúveis para investigar a atividade hemolítica de *Arthrographis kalrae*, um fungo dimórfico considerado patógeno oportunista. Antígenos solúveis (CFA), na sua forma nativa e aquecida (56 °C, 30 min), e frações de CFA obtidas por cromatografia em Sephadex G-200 foram testadas em relação à atividade hemolítica. Camundongos foram imunizados com CFA e com hemácias isogênicas sensibilizadas com CFA (He-CFA) e os soros imunes, denominados de anti-CFA e anti-He-CFA, obtidos foram analisados por *western blotting* e quanto a sua capacidade de interagir com as frações de CFA por ELISA. Adicionalmente, anticorpos anti-He-CFA foram utilizados para teste de inibição de hemólise. Os resultados mostraram atividade hemolítica de CFA, tanto na sua forma nativa quanto aquecida. A análise das frações obtidas por Sephadex G-200 resultou em hemólise de três frações, sendo as duas primeiras positivas também por ELISA. O *western blotting* demonstrou reconhecimento de várias bandas de CFA por anticorpos anti-CFA total e reatividade de duas bandas principais por anti-He-CFA. A atividade hemolítica diminuiu com amostras de CFA tratadas com anti-He-CFA, sugerindo especificidade dos anticorpos aos fatores responsáveis pela hemólise. Assim, pode-se concluir que o fungo libera fatores solúveis termoestáveis, com capacidade de lisar hemácias de camundongos e que os mesmos são constituídos de pelo menos duas frações com MM ~252 kDa e ~79 kDa, detectados por anticorpos e uma outra fração de baixa MM não imunogênica/antigênica. Além disso, os anticorpos anti-He-CFA são mais específicos, reconhecendo pelo menos duas bandas distintas.

Palavras-chave: Hemólise. Cromatografia. Hemaglutinação. ELISA. *Western blotting*.

PRODUCTION AND ANALYSIS OF POLYCLONAL ANTIBODIES TO *Arthrographis kalrae* SOLUBLE ANTIGENS WITH HEMOLYTIC ACTIVITY

4.2 ABSTRACT

This study aimed to obtain and analyze polyclonal antibodies more specific to soluble antigens in order to investigate the hemolytic activity of *Arthrographis kalrae* a dimorphic fungus considered as an opportunistic pathogen. Soluble antigens (CFA) in its native form and heated (56 °C, 30 min), and fractions of CFA obtained by chromatography in Sephadex G-200 were tested in relation to hemolytic activity. Mice were immunized with CFA and with isogenic red blood cells (MRBC) sensitized with CFA (anti-MRBC-CFA) and the immune sera, called as anti-CFA and anti-MRBC-CFA, were analyzed by western blotting and by their ability to interact with fractions of CFA by ELISA. Additionally, anti-MRBC-CFA antibodies were used for hemolysis inhibition test. The results showed hemolytic activity of CFA, both in its native form or heated. The analysis of fractions obtained by Sephadex G-200 resulted in hemolysis of three fractions, which two were also positive by ELISA. The western blotting demonstrated recognition of several bands of CFA by anti-CFA and reactivity of two main bands of anti-He-CFA. Hemolytic activity decreased with CFA anti-MRBC-CFA treated samples, indicating specificity of the antibodies to the factors responsible for hemolysis. Thus, it can be concluded that the fungus releases thermostable soluble factors with the ability to lyse mice red blood cells, consisting at least of two fractions with ~252 kDa and ~79 kDa MM, detectable with antibodies and another one with low MM not immunogenic/antigenic. Moreover, the anti-MRBC-CFA are more specific, recognizing at least two distinct bands.

Keywords: Hemolysis. Chromatography. Hemagglutination,. ELISA. Western blotting.

4.3 INTRODUÇÃO

O microrganismo *Arthrographis kalrae* é um fungo dimórfico que vem sendo descrito como um patógeno oportunista em humanos. Ele pode ser isolado do

solo e foi originalmente isolado de humanos e animais (TEWARI; MACPHERSON, 1968, 1971; PICHON et al., 2008).

Apresenta-se na forma filamentosa em temperatura ambiente, consistindo de hifas septadas com conidióforos dendríticos e cadeias de arthroconídias; e na forma de levedura a 37 °C, com células leveduriformes ovais ou elípticas, podendo ser encontrada uma mistura de blastóporos e artrósporos (TEWARI; MACPHERSON, 1968; XI et al., 2004).

Tewari e Macpherson (1968) demonstraram a patogenicidade do fungo e seus efeitos neurológicos quando inoculado em camundongos. Os animais infectados apresentaram uma síndrome neurológica complexa, alta taxa de mortalidade e lesões principalmente nos rins e cérebro.

O fungo tem sido descrito em caso de eumicetoma na mão (DEGAVRE et al., 1997); sinusite e meningite em um paciente com AIDS (CHIN-HONG et al., 2001); infecção do olho (panoftalmite) e sinusite invasiva envolvendo os seios maxilar e etmóide (XI et al., 2004). Além disso, já foram descritos casos de queratites, que se manifestam com intensa fotofobia e em que há a hipótese de a lente de contato dos pacientes ter facilitado a invasão do fungo (PERLMAN; BINNS, 1997; BISER et al., 2004). Os mais recentes casos foram de onicomicoses (VOLLEKOVÁ et al., 2008) e vasculite cerebral levando a acidente vascular cerebral fatal (PICHON et al., 2008).

O mecanismo de infecção de *A. kalrae* ainda não é conhecido. Foi demonstrado que a fase micelial do fungo representa sua forma invasiva em encefalite micótica em camundongos, sendo que os artrósporos representam a forma mais resistente à resposta inflamatória do hospedeiro (Svenberg et al., 1969). A atividade proteolítica que o fungo possui, com produção de um complexo de pelo menos seis enzimas proteolíticas intracelulares parece ter um papel importante na patogênese do fungo (CINO; TEWARI, 1975, 1976).

Recentemente foi demonstrada a presença de fator hemolítico no preparado “*cell-free antigens*” (CFA) de *A. kalrae* (NAGASHIMA et al., 2007). Dando continuidade ao trabalho, o presente trabalho teve como objetivo obter e analisar anticorpos mais específicos aos antígenos solúveis (CFA) de *A. kalrae* para a investigação da sua atividade hemolítica.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Microrganismo

Foi utilizado fungo *Arthrographis kalrae*, isolado de águas termais naturais usadas em recreação no Japão, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Ayako Sano (Research Center of Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japan).

4.4.2 Animais

Para este trabalho foram utilizados camundongos das linhagens Swiss e Balb/c, alojados no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da UEL. Os animais foram manuseados conforme orientação do Biotério Central/UEL. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina sob nº 69/07.

4.4.3 Obtenção de *Cell-Free Antigens* (CFA)

O CFA foi obtido segundo Camargo et al. (1991), com algumas modificações. *A. kalrae* foi cultivado em meio ágar sabouraud dextrosado 4% (Acumedia, Lansing, MI, USA) por sete dias a 35 °C. O fungo foi coletado, adicionando-se tampão salina-fosfato (PBS) 0,15 M pH 7,2 (v/v), timerosol 0,02% e inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 2,5 mM (P7626, Sigma, St. Louis, MO, USA). Após agitação em vórtex (Biomatic, Porto Alegre, RS, Brasil) por 15 min, repouso por 1,5 h a 4 °C e novamente agitação em vórtex por cinco min, o fungo foi homogeneizado (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) e centrifugado sob refrigeração a 1005 x g por 15 min e o sobrenadante coletado foi centrifugado a 12870 x g (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany) por 15 min. Amostra de sobrenadante foi coletada e a concentração protéica do CFA obtido foi dosada

pelo método Folin (LOWRY et al., 1951) e ajustada para 2 mg proteína/ml. A seguir, o CFA foi alíquotado e armazenado em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a utilização.

4.4.4 Teste de Hemólise com CFA na Forma Nativa e CFA Submetido a Aquecimento

Primeiramente fez-se a coleta de sangue de camundongo em Alsever e as hemácias foram lavadas três vezes com PBS (centrifugação a $175 \times g$ por dez min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany)). Preparou-se então uma suspensão de hemácias a 1% (v/v) com PBS. Foram feitas diluições seriadas na razão dois, a partir do puro, das amostras de CFA e CFA após aquecimento em banho-maria a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Como controle negativo foi usado PBS e como controle positivo de hemólise, água destilada. A seguir, as amostras foram incubadas 1:1 com a suspensão de hemácias a 1%, em microplacas de fundo "V", por 1 h a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 3 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse período, as placas foram centrifugadas a $155 \times g$, por dez min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, os sobrenadantes foram coletados e analisados pela leitura das absorbâncias em 550 nm (Multiskan EX, Uniscience – LabSystems, Helsinki, Finland).

4.4.5 Cromatografia por Gel Filtração em Sephadex G-200

Amostras de CFA de 2 mg/ml, na quantidade de 3 a 4 ml, foram aplicadas à coluna de cromatografia de Sephadex G-200 (Sigma, St. Louis, MO, USA) equilibrada com tampão PBS 0,15 M pH 7,2, utilizando PBS como eluente. Dois ml de cada fração foram coletados com um coletor de frações automático (Analítica, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brasil) e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro (Ultrospec-200, Pharmacia Biotech UV/VIS, Uppsala, Sweden) a 280 nm . Para o teste de hemólise, as frações foram dialisadas em água destilada por 24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizadas (Terroni, São Carlos, SP, Brasil) e ressuspendidas em PBS. As frações foram armazenadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.6 Teste de Hemólise das Frações de Cromatografia de Exclusão em Sephadex G-200

Este teste foi feito nas mesmas condições descritas anteriormente. Após coleta de sangue de camundongo em Alsever e lavagem das hemácias com PBS, fez-se uma suspensão de hemácias a 1%. As amostras de frações de CFA de *A. kalrae* obtidas por cromatografia por gel filtração em coluna de Sephadex G-200, dialisadas e liofilizadas, foram incubadas 1:1 com a suspensão de hemácias, por 1 h a 35 °C e 3 h a 4 °C. A placa foi então centrifugada a 155 x g, por dez min a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados e analisados em 550 nm (Multiskan EX, Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finland). Para análise dos resultados do teste de hemólise das frações de CFA de *A. kalrae* obtidas pela cromatografia (G-200), as leituras de absorbância das amostras (550 nm) foram subtraídas das leituras obtidas pós-teste de hemólise e submetidas à análise estatística (n=4).

4.4.7 Obtenção de Anticorpos Policlonais Anti-CFA

Para obtenção de anticorpos anti-CFA, camundongos Swiss foram imunizados com antígeno de CFA de *A. kalrae* (75 µg de proteínas totais/camundongo) em três doses por via subcutânea com intervalos de 15 dias, sendo a primeira dose com adjuvante completo de Freund (F5881, Sigma, St. Louis, MO, USA) e as demais, adjuvante incompleto de Freund (F5506, Sigma, St. Louis, MO, USA). Após a terceira dose, foi feita a sangria de prova com análise por imunodifusão radial dupla (ID).

4.4.8 Imunização de Camundongos com Hemácia Isogênica Sensibilizada com Antígeno Solúvel (He-CFA)

Inicialmente, sangue de camundongo Balb/c foi coletado em Alsever e as hemácias foram lavadas três vezes com PBS. Fez-se então uma suspensão de hemácias a 5% (v/v). A amostra de CFA de *A. kalrae*, em diluição sublimiar à concentração de lise (1/2), foi incubada 1:1 com a suspensão de hemácias 5% por 1

h a 35 °C e 1 h a 4 °C. A seguir, as hemácias foram lavadas três vezes com solução Hank's e ressuspensas nessa mesma solução. A partir dessa solução foi feita a emulsão com adjuvante de Freund (completo ou incompleto) (F5881/F5506, Sigma, St. Louis, MO, USA) para imunização de camundongos Balb/c seguindo o procedimento do item 4.4.7.

4.4.9 Teste de Inibição de Hemólise com Anti-He-CFA

As amostras de soro (anti-He-CFA) inativado por 1 h a 56 °C e diluído 1/5 com CFA puro, na proporção 1:1, num volume final de 50 µl, incubadas a 35 °C, 1 h ou imediatamente após a diluição do soro com CFA, foram adicionadas a 50 µl de hemácia 1%. As placas foram incubadas novamente por 1 h a 35 °C e 3 h a 4 °C e centrifugadas a 155 x g, por dez minutos a 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany). Os sobrenadantes foram coletados e analisados em 550 nm (Multiskan EX, Uniscience – LabSystems, Helsinki, Finland). Como controle foi usado soro de camundongo pré-imune normal, também diluído a 1/5. Além disso, como controles positivo e negativo de hemólise, foram utilizados CFA puro e PBS, respectivamente.

4.4.10 Análise da reatividade das frações de CFA de *A. kalrae* (Sephadex G-200) com os anticorpos anti-CFA e anti-He-CFA

Microplacas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µl/orifício das frações da coluna de Sephadex G-200 diluídas 1:10 com tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6 por 1 h a 35 °C e *overnight* a 4 °C. Como controle positivo, utilizou-se CFA na concentração de 25 µg/ml. As placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem de PBS-leite-tween (leite desnatado 0,5%, tween 20 0,05%) e bloqueadas com tampão de bloqueio de PBS-leite-tween (leite desnatado 5%, tween 20 0,5%) (200 µl/orifício) por 1,5 h em temperatura ambiente. Após lavagens com tampão de lavagem, as placas foram incubadas por 2 h a 35 °C com 100 µl/orifício de soro de camundongo anti-*A. kalrae* diluído 1:400 ou com 100 µl/orifício de anti-He-CFA na diluição de 1:200. Como controle negativo foi usado soro de

camundongo normal. Após lavagens, fez-se incubação (100 µl/orifício) com conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A8924, Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído 1:8000 por 1,5 h a 35 °C. A revelação foi feita com OPD (Sigma, St. Louis, MO, USA) e H₂O₂ (100 µl/orifício) e a reação interrompida com 50 µl de H₂SO₄ 4 N. A leitura da densidade óptica foi feita em aparelho do tipo Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finland) em 492 nm.

4.4.11 *Western blotting*

Amostras de CFA e padrão de massa molecular (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) foram corridos em gel de eletroforese (gel gradiente 5-15%) de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 80-100 V com tampão tris-glicina pH 8,2. Após transferência do gel para membrana de nitrocelulose, feita por 1 h e 15 min a 100 V e 350 mA, a membrana foi bloqueada por 1,5 h em temperatura ambiente com tampão de bloqueio de PBS-leite-tween e lavada com tampão de lavagem de PBS-leite-tween. Em seguida, fez-se a incubação por 2 h a 35 °C com anticorpos anti-CFA e anti-He-CFA, ambos diluídos 1:50. A membrana foi lavada novamente e então incubada com conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A8924, Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído 1:1000 por 1,5 h a 35 °C. Após lavagem, a membrana foi revelada com DAB (Sigma, St. Louis, MO, USA) e H₂O₂ e a reação foi interrompida com água destilada. O resultado foi analisado com o software LabImage 1D 2006 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

4.4.12 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ou teste t, através do programa BioEstat 4.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Teste de Hemólise com Antígenos: CFA e CFA Submetido a Aquecimento

Os resultados mostraram hemólise de hemácias de camundongo pelo CFA puro, não ocorrendo reatividade com as amostras diluídas. A atividade hemolítica se manteve mesmo após aquecimento da amostra a 56 °C por 30 min (Figuras 1 e 2), indicando ser termoestável.

4.5.2 Teste de Hemólise das Frações de Cromatografia de Exclusão em Sephadex G-200

Os resultados de análise quantitativa de hemólise das frações obtidas demonstram hemólise nas frações 8 – 9, e 12 – 17 e 19 – 21. O perfil espectrofotométrico das frações de CFA obtidas por cromatografia em Sephadex G-200 e a análise quantitativa de hemólise dessas frações são mostradas na Figura 3.

4.5.3 Teste de Inibição de Hemólise com Anti-He-CFA

Os resultados mostraram que os anticorpos anti-He-CFA inibiram aproximadamente 78% da atividade hemolítica, porém não ocorreu inibição total. O soro de camundongo pré-imune normal inibiu parcialmente a hemólise (61%). Não houve diferença entre incubar previamente ou não o soro com CFA (Tabela 1).

4.5.4 ELISA para Reconhecimento das Frações de Sephadex G-200 por Anticorpos Anti-CFA e Anti-He-CFA

Os resultados de ELISA demonstraram que, tanto os anticorpos anti-CFA quanto os anti-He-CFA, tiveram o mesmo perfil de reatividade com as frações (Figuras 4 e 5). No entanto, os anticorpos anti-CFA reconheceram todas as frações da coluna cromatográfica G-200, enquanto que a extensão de reatividade dos anti-

He-CFA foi menor, reconhecendo as frações 6 a 22 (em relação ao controle com soro pré-imune normal, teste t, $p < 0,05$). O perfil de D.O. a 550 nm demonstra dois picos, considerando que houve diferença significativa entre o final do primeiro pico e o segundo pico. (Figuras 4 e 5).

4.5.5 *Western Blotting*

Os resultados de análise de anticorpos anti-CFA total e anti-He-CFA por *western blotting* demonstraram maior número de bandas no CFA total com anticorpos anti-CFA total em relação ao anti-He-CFA, como observado na figura 6. Os anticorpos anti-CFA reconheceram diversas bandas do CFA (~252, 225, 202, 197, 112, 106, 99, 90, 79, 69, 49 e 32 kDa), sendo as mais evidentes uma banda altamente dispersa com média em torno de 252 kDa e outra de ~79 kDa. Já os anti-He-CFA reconheceram 2 bandas principais: uma banda difusa de alta massa molecular com aproximadamente 252 kDa e uma banda com menor peso molecular (~79 kDa).

4.6 DISCUSSÃO

A primeira evidência de existência de atividade hemolítica de *A. kalrae* foi observada em 2007 (NAGASHIMA et al., 2007) utilizando hemácias de carneiro. No presente trabalho foi demonstrada atividade hemolítica de CFA de *A. kalrae* com hemácias de camundongo, e a lise observada apenas em amostras não diluídas sugere baixa atividade ou baixa concentração dos fatores responsáveis pela lise. Essa atividade pode ter um papel relevante na patogenicidade do fungo, e possivelmente deve atuar em hemácias independentemente da espécie, o que requer estudos com outras espécies.

A hemólise pode ser um importante fator de virulência, já que o ferro é um nutriente essencial para a maioria dos organismos, mas a concentração de ferro livre em hospedeiros mamíferos é extremamente baixa para o crescimento de microrganismos. Um dos mecanismos desenvolvidos para aquisição de ferro do

hospedeiro é o uso do componente heme liberado após a lise de eritrócitos (NYILASI et al., 2005).

Estudos com *Candida albicans* indicam que esse microrganismo deve adquirir ferro pela produção de um fator, presente no microrganismo e secretado no meio de cultura, que libera hemoglobina pela lise de hemácias (MANNS et al., 1994).

A atividade de hemólise não se perdeu mesmo após o aquecimento a 56 °C por 30 min, o que poderia se esperar, uma vez que o fungo é capaz de crescer em alta temperatura (42 °C) (CHIN-HONG et al., 2001; XI et al., 2004; PICHON et al., 2008), além do fungo objeto de estudo ter sido isolado de águas termais.

Pelo teste qualitativo das frações de CFA obtidas por cromatografia de Sephadex G-200, a observação da hemólise foi dificultada em função de coloração do próprio preparado de CFA presente em algumas frações. Assim, a seguir, foi realizada a análise quantitativa avaliando-se a lise por meio de leitura a 550 nm, retirando-se o *background* por meio da subtração da leitura das frações sem as hemácias. Por este procedimento, foi possível demonstrar atividade hemolítica em três frações de MM distintas.

Para melhor caracterizar os componentes de atividade hemolítica, camundongos Balb/c foram imunizados com hemácia isogênica sensibilizada com CFA. Com este processo os componentes responsáveis pela hemólise poderiam ser selecionados e, como consequência, possibilitando a obtenção de anticorpos específicos aos fatores responsáveis pela hemólise. Fernandes-Vivan (2008) estudou a atividade hemaglutinante de *Histoplasma capsulatum* utilizando também hemácias sensibilizadas com antígenos solúveis para obtenção de anticorpos policlonais a antígeno solúvel com capacidade hemaglutinante. Estes anticorpos inibiram a hemaglutinação, sendo, portanto, específicos e demonstrando que essa técnica é útil no estudo de caracterização desses componentes.

Os anticorpos assim obtidos, denominados anti-He-CFA foram analisados quanto a sua capacidade de inibir a atividade hemolítica, resultando em diminuição significativa quando comparado com soro pré-imune, sugerindo assim que anti-He-CFA contém anticorpos específicos a componentes hemolíticos de *A. kalrae*. A inibição parcial de hemólise pelo soro normal de camundongo pode ser devido à presença de anticorpos naturais ou mesmo pela proteção em função de

proteínas presentes no soro, conferindo maior estabilidade à membrana celular. Hosogi et al. (2001) também demonstraram inibição das atividades hemaglutinante e hemolítica de *Porphyromonas gingivalis* utilizando anticorpo monoclonal.

Utilizando os anticorpos policlonais obtidos neste trabalho, foi evidenciado o reconhecimento de pelo menos duas frações de MM distintas por ELISA, compatível com as eluições das duas primeiras frações que apresentaram atividade hemolítica. Resultado similar foi obtido pela utilização de anticorpos anti-CFA total, sugerindo que ambos os anticorpos policlonais contêm anticorpos que reconhecem as duas frações de CFA com atividade hemolítica. A leitura de D.O. a 550 nm foi alta entre os dois picos possivelmente devido a uma pequena contaminação das duas frações e alta sensibilidade de ELISA, o que poderia ser reduzida pela utilização de coluna de maior dimensão ou pela coleta de quantidade menor de amostras de frações eluídas de coluna. Todavia considerando a diferença estatística entre o final do primeiro pico a 550 nm e o segundo pico, consideramos como duas frações distintas. A não detecção da terceira fração com atividade hemolítica observada no ensaio de hemólise possivelmente se deve a sua baixa MM e conseqüentemente baixa imunogenicidade.

Considerando a baixa resolução de cromatografia em coluna de Sephadex G-200 ou mesmo pela possibilidade de interação com partículas de Sephadex retardando a eluição da segunda fração, a seguir, foi realizada a análise de soros imunes por *western blotting*. Como esperado, foi evidenciada a presença de pelo menos duas frações (bandas) principais de MM distintas reconhecidas pelos anticorpos anti-He-CFA, concordando com os resultados de análise de frações cromatográficas pelo teste de atividade hemolítica e de reatividade com os anticorpos. Como já mencionado, o componente de baixa MM não foi evidenciada também por *western blotting*, possivelmente por baixa imunogenicidade.

O reconhecimento de menor número de bandas com anti-He-CFA por *western blotting* em relação ao anti-CFA total, sugere maior especificidade do primeiro anticorpo. Os componentes mais evidentes reconhecidos por anti-He-CFA, foram de aproximadamente 252 kDa e ~79 kDa. Embora, coincidentemente sejam as frações também mais evidentes com anti-CFA total, possivelmente não se tratam de adsorção inespecífica, uma vez que a análise de reatividade das frações também demonstrou a presença de duas frações de MM distintas.

O estudo de atividade hemolítica é importante porque, além do papel de transporte de oxigênio no organismo, as hemácias possuem um papel importante na ligação a imunocomplexos circulantes, levando-os para o fígado e baço (GOLDSBY et al., 2002) e a redução no nível de eritrócitos poderia assim interferir em vários sistemas.

Na infecção por *A. kalrae* a presença de imunocomplexos ainda não foi estudada, mas considerando que o preparado CFA contém Ags solúveis e que os mesmos apresentam imunogenicidade/antigenicidade (Nagashima et al., 2007), em casos de infecção por *A. kalrae* poderia ocorrer a formação de imunocomplexos contribuindo dessa forma na patogenicidade.

No presente trabalho foram evidenciadas pela primeira vez três frações com MM distintas com atividade hemolítica em CFA de *A. kalrae*. Isto pode significar a existência de três componentes distintos com atividade hemolítica ou por outro lado é possível que o componente responsável pela hemólise seja de baixa MM e que se associa a outras moléculas de MM maiores, o que requer estudos adicionais. A presença de duas diferentes hemolisinas tem sido descrita em outros microrganismos como *Proteus spp* (WELCH, 1987; UPHOFF; WELCH, 1990).

Os anticorpos mais específicos obtidos no presente trabalho poderão contribuir para o estudo futuro de interação fungo-hospedeiro e também para fins de diagnóstico.

4.7 REFERÊNCIAS

BISER, S.A. et al. *Arthrographis* keratitis mimicking *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea.**, v. 23, n. 3, p. 314-317, 2004.

CAMARGO, Z.P. et al. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, n. 1, p. 31-8, 1991.

CHIN-HONG, P.V. et al. Invasive fungal sinusitis and meningitis due to *Arthrographis kalrae* in a patient with AIDS. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 804-807, 2001.

CINO, P.M.; TEWARI, R.P. Proteolytic activity of *Oidiodendron kalrai*. **Can. J. Microbiol.**, v. 21, n. 9, p. 1362-1368, 1975.

CINO, P.M.; TEWARI, R.P. Purification of *Oidiodendron kalrai* proteases. **Can. J. Microbiol.**, v. 22, n. 3, p. 327-333, 1976.

DEGAVRE, B. et al. First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: successful treatment with itraconazole. **J. Am. Aca. Dermatol.**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 318-320, 1997.

FERNANDES-VIVAN, R.H. **Caracterização parcial de antígeno solúvel de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* com atividade hemaglutinante.** Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Imunologia.** 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

HOSOGI, Y.; HAYAKAWA, M.; ABIKO, Y. Monoclonal antibody against *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin inhibits hemolytic activity. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 109, p. 109-113, 2001.

LOWRY, O.H. et al. Colorimetric assays: Lowry's method for protein determination. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANNS, J.M.; MOSSER, D.M.; BUCKLEY, H.R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 11, p. 5154-5156, 1994.

NAGASHIMA, L.A. et al. Partial characterization of soluble components of *Arthrographis kalrae*. In: KALIL J., CUNHA-NETO E., RIZZO L.V. INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 13th. MEDIMOND International Proceedings, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, p. 557-561, 2007.

NYILASI, I. et al. Iron gathering of opportunistic pathogenic fungi. A mini review. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, v. 52, n. 2, p. 185-197, 2005.

PERLMAN, E.M.; BINNS, L. Intense photophobia caused by *Arthrographis kalrae* in a contact lens-wearing patient. **Am. J. Ophthalmo.**, v. 123, n. 4, p. 547-549, 1997.

PICHON, N. et al. Fatal-stroke syndrome revealing fungal cerebral vasculitis due to *Arthrographis kalrae* in an immunocompetent patient. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 9, p. 3152-3155, 2008.

SWENBERG, J.A.; KOESTNER, A.; TEWARI, R.P. Experimental mycotic encephalitis. **Acta Neuropathol.**, v. 13, n. 1, p. 75-90, 1969.

TEWARI, R.P.; MACPHERSON, C.R. Pathogenicity and neurological effects of *Oidiodendron kalrai* for mice. **J. Bacteriol.**, v. 95, n. 3, p. 1130-1139, 1968.

TEWARI, R.P.; MACPHERSON, C.R. A new dimorphic fungus, *Oidiodendron kalrai*: morphological and biochemical characteristics. **Mycologia**, v. 63, n. 3, p. 602-611, 1971.

UPHOFF, T.S.; WELCH R.A. Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium independent hemolysin genes (*hpmA* and *hpmB*) reveals sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (*shIA* and *shIB*). **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 3, p. 1206-1216, 1990.

VOLLEKOVÁ, A.; LISALOVÁ, M.; POCZOVÁ, M. (Abstract) *Arthrographis kalrae* - an uncommon causative agent of onychomycosis. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.**, v. 57, n. 2, p. 53-56, 2008.

WELCH R.A. Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 9, p. 2183-2190, 1987.

XI, L. et al. First case of *Arthrographis kalrae* ethmoid sinusitis and ophtalmitis in the People's Republic of China. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 10, p. 4828-4831, 2004.

5 CONCLUSÕES

Arthrographis kalrae libera fator solúvel com capacidade de lisar hemácias de camundongos.

Os fatores hemolíticos solúveis de *A. kalrae* são termoestáveis.

O fracionamento de Ags solúveis por gel filtração permite evidenciar a presença de três frações/componentes de MM distintas com atividade hemolítica.

O processo de sensibilização de hemácias com Ags solúveis permite a obtenção de anticorpos (anti-He-CFA) com capacidade de inibir hemólise.

Os anticorpos anti-He-CFA são menos heterogêneos que os anticorpos anti-CFA total sugerindo maior especificidade.

Os anticorpos anti-He-CFA reconhecem pelo menos duas frações de MM distintas.

Os fatores hemolíticos parecem apresentar MM ~ 252 kDa e 79 kDa.

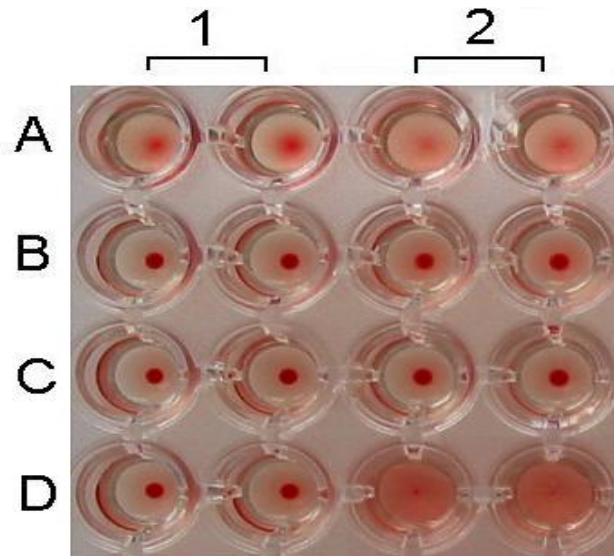


Figura 1 – Teste de hemólise de amostras de CFA de *A. kalrae* na forma nativa (1) e após aquecimento a 56 °C por 30 min (2), puras (A) e nas diluições $\frac{1}{2}$ (B) e $\frac{1}{4}$ (C). As amostras foram incubadas com suspensão de hemácias de camundongo (1%) 1:1 v/v por 1 h a 35 °C e 3 h a 4 °C. PBS como controle negativo (D1) e água destilada como controle positivo de hemólise (D2).

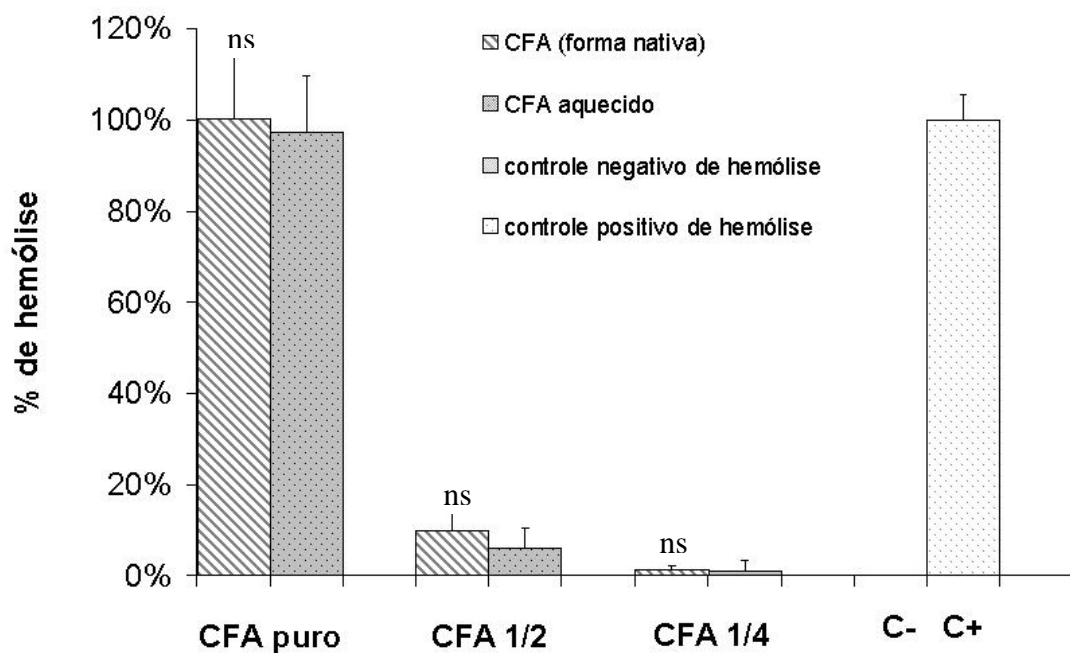


Figura 2 – Análise quantitativa do efeito do aquecimento de amostra de CFA de *A. kalrae* na atividade hemolítica. Os resultados estão expressos em porcentagem de hemólise das amostras de sobrenadantes oriundas de incubação de suspensão de hemácias de camundongo (1%) 1:1 com amostras de CFA (puro, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$) na forma nativa e aquecida a 56 °C durante 30 min. Controle negativo de hemólise (C-) = hemácia (1%) + PBS, 1:1. Controle positivo de hemólise (C+) = hemácia (1%) + H₂O destilada, 1:1. Forma nativa x aquecida = $p > 0,05$, CFA puro x C+ = $p > 0,05$, CFA puro x controle negativo = $p < 0,05$. (n= 4). ns = não significativo; teste Tukey.

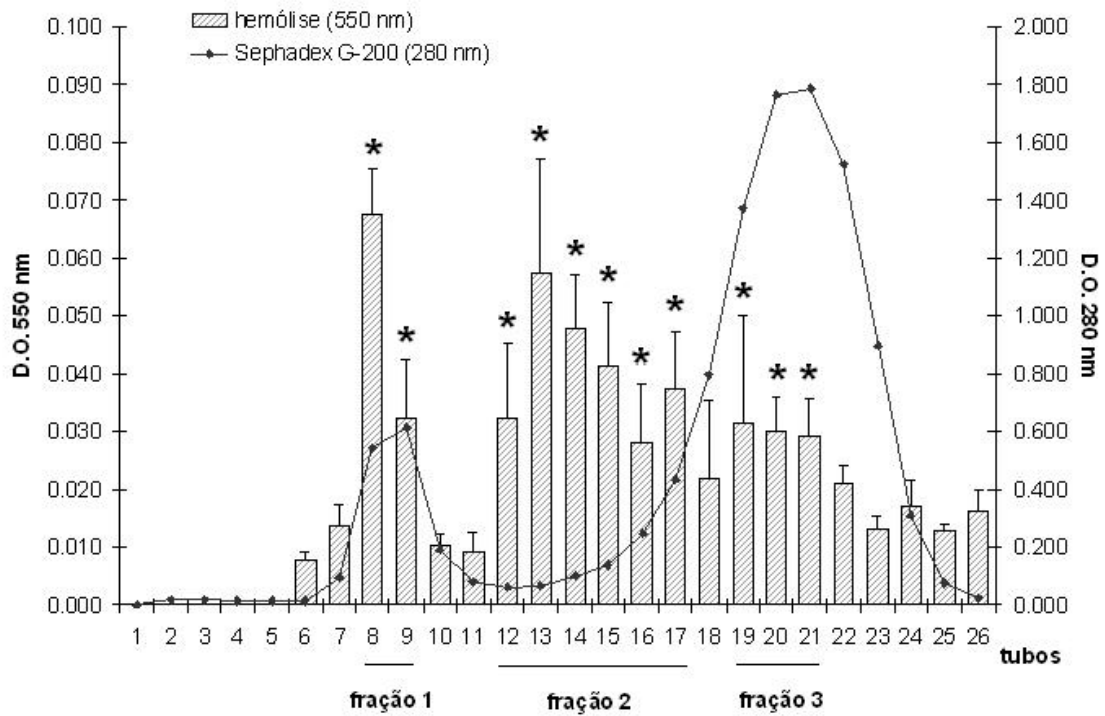


Figura 3 – Análise quantitativa de hemólise das frações de CFA de *A. kalrae* obtidas por cromatografia por gel filtração em coluna de Sephadex G-200 em D.O. a 550 nm. (*) frações positivas para hemólise ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (D.O.=0,009), suspensão de hemácia incubada com PBS 1:1 (C-), pelo teste t. (n=4).

Tabela 1 – Teste de inibição da hemólise de CFA de *A. kalrae* com soro anti-He-CFA.

	Amostras				
	CFA	CFA + soro anti-He-CFA (previamente incubado)	CFA + soro anti-He-CFA	CFA + soro normal	PBS
Média em D.O.	0,250 a	0,090 c	0,089 c	0,124 b	0,045 d
Desvio padrão	0,028	0,006	0,003	0,005	0,002
Porcentagem de hemólise	100,00%	21,88%	21,52%	38,75%	0,00%

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Inibição da hemólise com soro anti-He-CFA diluído 1/5, incubando previamente amostra de CFA de *A. kalrae* e soro anti-He-CFA durante 1 h a 35 °C e posteriormente adição de hemácia de camundongo (1%) e nova incubação ou adição conjunta de CFA, soro anti-He-CFA e hemácia de camundongo (1%), seguida de incubação. (n=4).

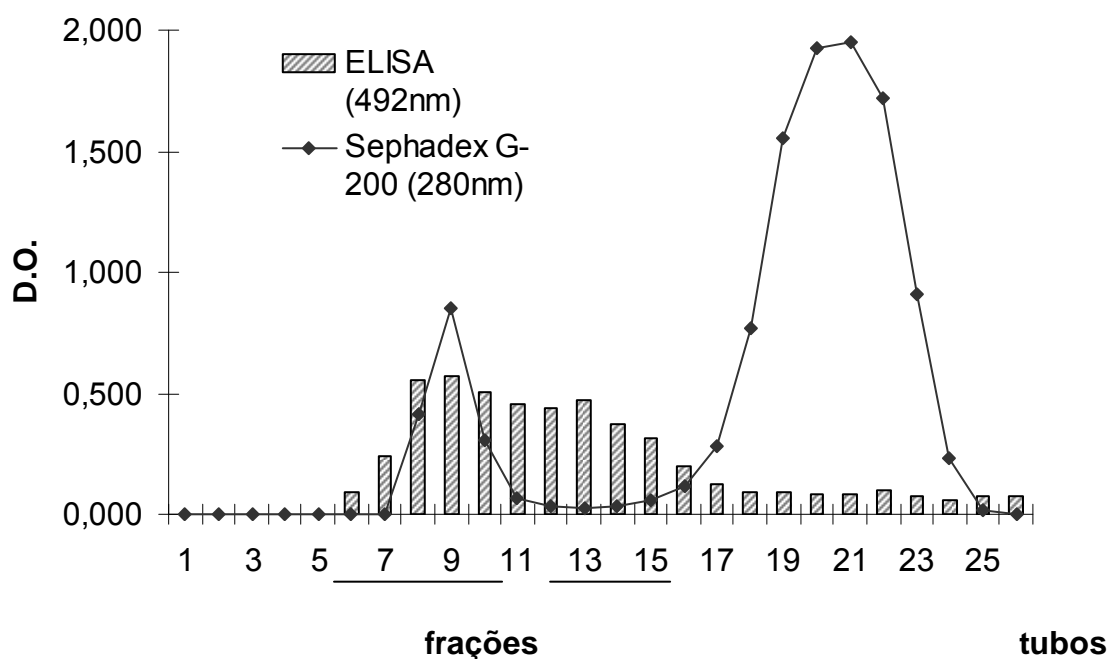


Figura 4 – Análise de reconhecimento das frações de CFA de *A. kalrae* obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 por soro imune de camundongo anti-CFA por ELISA. As frações 6 a 26 obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 (280 η m) foram analisadas por ELISA. As frações reativas foram evidenciadas utilizando *pool* de soros de camundongos Swiss imunizados com CFA de *A. kalrae*, conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo, OPD e leitura a 492 η m. Como controle negativo foi utilizado soro pré-imune. ELISA 6-26 x controle negativo soro pré-imune $p < 0,05$. Tubos 11-12 x 13 $p < 0,05$. Teste t (n=3), considerando-se assim como duas frações distintas.

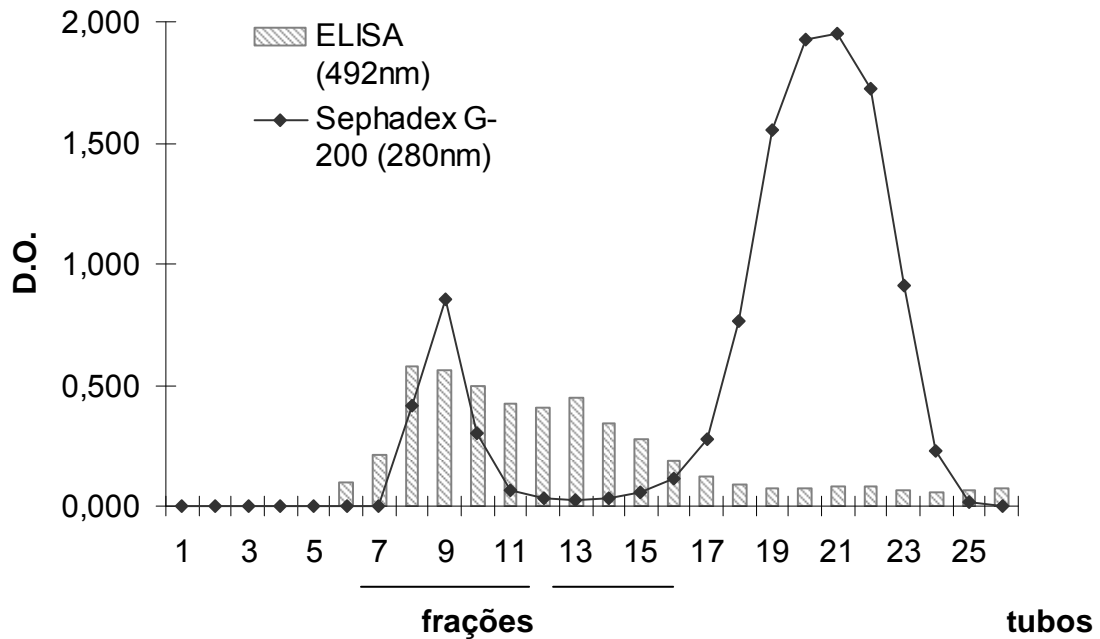


Figura 5 – Análise de reconhecimento das frações de CFA de *A. kalrae* obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 por soro imune de camundongo anti-He-CFA por ELISA. As frações 6 a 26 obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 (280 nm) foram analisadas por ELISA. As frações reativas foram evidenciadas utilizando *pool* de soros de camundongos Balb/c imunizados com hemácias isogênicas com CFA de *A. kalrae* (He-CFA), conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo, OPD e leitura a 492 nm. Como controle negativo foi utilizado soro pré-imune. ELISA 6 – 22 x controle negativo soro pré-imune $p < 0,05$. Tubo 12 x 13 $p < 0,05$. Teste t. (n=3). Considerando-se assim como duas frações distintas.

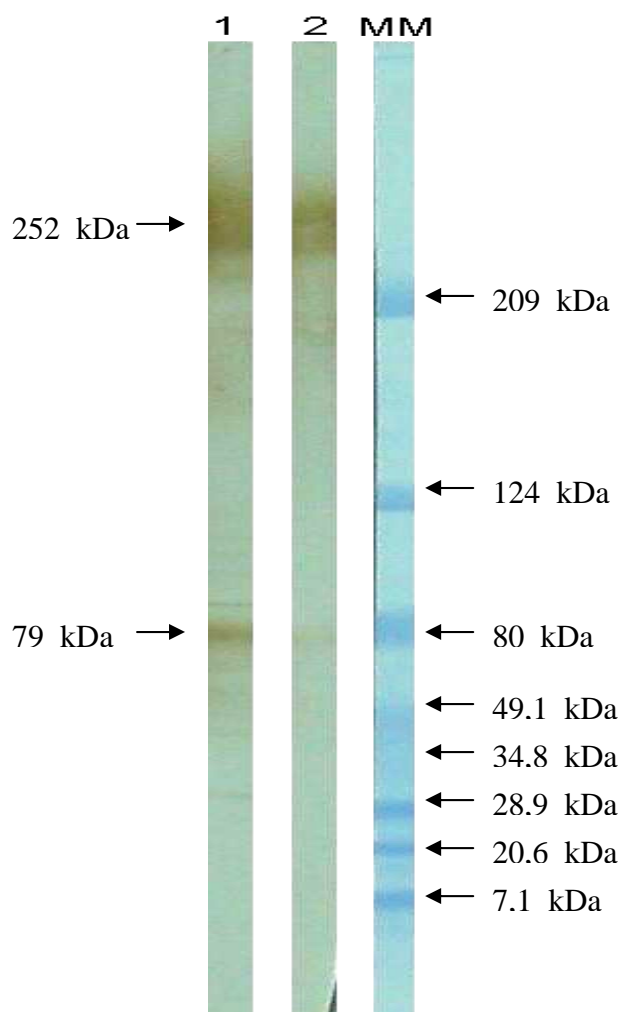


Figura 6 – *Western blotting* de CFA de *A. kalrae* (SDS-PAGE gel gradiente 5-15%) utilizando anticorpos anti-CFA total e anticorpos anti-He autóloga sensibilizada com CFA. As bandas reativas foram evidenciadas utilizando *pool* de soros de camundongos Swiss imunizados com CFA (1) e *pool* de soros de camundongos Balb/c imunizados com hemácias isogênicas com CFA de *A. kalrae* (He-CFA) (2), conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo e DAB. Setas () do lado esquerdo indicam as bandas mais evidentes de anti-He-CFA de ~252 e 79 kDa. (MM) Padrão de massa molecular: miosina (209 kDa), beta-galactosidase (124 kDa), BSA (80 kDa), ovalbumina (49,1 kDa), anidrase carbônica (34,8 kDa), inibidor de tripsina de soja (28,9 kDa), lisozima (20,6 kDa) e aprotinina (7,1 kDa).

REFERÊNCIAS

- BISER, S.A. et al. *Arthrographis* keratitis mimicking *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea.**, v. 23, n. 3, p. 314-317, 2004.
- CHIN-HONG, P.V. et al. Invasive fungal sinusitis and meningitis due to *Arthrographis kalrae* in a patient with AIDS. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 804-807, 2001.
- CINO, P.M.; TEWARI, R.P. Proteolytic activity of *Oidiodendron kalrai*. **Can. J. Microbiol.**, v. 21, n. 9, p. 1362-1368, 1975.
- _____. Chemical composition of *Oidiodendron kalrai*. **Mycopathologia.**, v. 58, n. 3, p. 131-135, 1976a.
- _____. Purification of *Oidiodendron kalrai* proteases. **Can. J. Microbiol.**, v. 22, n. 3, p. 327-333, 1976b.
- DEGAVRE, B. et al. First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: successful treatment with itraconazole. **J. Am. Aca. Dermatol.**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 318-320, 1997.
- FERNANDES-VIVAN, R.H. Caracterização parcial de antígeno solúvel de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* com atividade hemaglutinante. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.
- GENÉ, J. et al. Studies on keratinophilic fungi. X. *Arthrographis Alba* sp.nov. **Can. J. Microbiol.**, v. 42, p. 1185-1189, 1996.
- GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Imunologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.
- MALLOCH, D.; SIGLER, L. The Eremomycetaceae (Ascomycotina). **Can. J. Bot.**, v. 66, p. 1929-1932, 1988.
- MANNS, J.M.; MOSSER, D.M.; BUCKLEY, H.R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 11, p. 5154-5156, 1994.
- PERLMAN, E.M.; BINNS, L. Intense photophobia caused by *Arthrographis kalrae* in a contact lens-wearing patient. **Am. J. Ophthalmo.**, v. 123, n. 4, p. 547-549, 1997.
- PICHON, N. et al. Fatal-stroke syndrome revealing fungal cerebral vasculitis due to *Arthrographis kalrae* in an immunocompetent patient. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 9, p. 3152-3155, 2008.
- PONIKAU, J.U. et al. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. **Mayo Clin. Proc.**, v. 74, p. 877-884, 1999.
- SIGLER, L.; CARMICHAEL, J.W. Redisposition of some fungi referred to *Oidium Micorspermum* and a review of *Arthrographis*. **Mycotaxon.**, v. 18, n. 2, p. 495-507, 1983.

SWENBERG, J.A.; KOESTNER, A.; TEWARI, R.P. Experimental mycotic encephalitis. **Acta Neuropathol.**, v. 13, n. 1, p. 75-90, 1969a.

SWENBERG, J.A.; KOESTNER, A.; TEWARI, R.P. The pathogenesis of experimental mycotic encephalitis – An ultrastructural study. **Lab. Invest.**, v. 21, n. 5, p. 365-373, 1969b.

TEWARI, R.P.; MACPHERSON, C.R. Pathogenicity and neurological effects of *Oidiodendron kalrai* for mice. **J. Bacteriol.**, v. 95, n. 3, p. 1130-1139, 1968.

TEWARI, R.P.; MACPHERSON, C.R. A new dimorphic fungus, *Oidiodendron kalrai*: morphological and biochemical characteristics. **Mycologia**, v. 63, n. 3, p. 602-611, 1971.

VOLLEKOVÁ, A.; LISALOVÁ, M.; POCZOVÁ, M. (Abstract) *Arthrographis kalrae* - an uncommon causative agent of onychomycosis. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.**, v. 57, n. 2, p. 53-56, 2008.

XI, L. et al. First case of *Arthrographis kalrae* ethmoid sinusitis and ophtalmitis in the People's Republic of China. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 10, p. 4828-4831, 2004.