

JULIANA APARECIDA RIZZO

**ADESÃO DE *PARACOCIDIODES BRASILIENSIS* E OUTROS
FUNGOS ANEMÓFILOS A TEIAS DE ARANHAS: IMPLICAÇÕES
PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NICHOS MICROBIANOS NO
AMBIENTE**

**Adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* and other anemophilous fungi to spider
web samples: implications for the identification of microbial niches in the
environment**



Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Biociências de Botucatu da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como pré-requisito para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas

BOTUCATU – SP

2011

JULIANA APARECIDA RIZZO

**ADESÃO DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* E OUTROS
FUNGOS ANEMÓFILOS A TEIAS DE ARANHAS: IMPLICAÇÕES
PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NICHOS MICROBIANOS NO
AMBIENTE**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Marcio Lourenço Rodrigues e sob Co-orientação do Professor Eduardo Bagagli, Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP-BOTUCATU.

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Rizzo, Juliana Aparecida.

Adesão de *Paracoccidioides brasiliensis* e outros fungos anemófilos a teias de aranhas : implicações para a identificação de nichos microbianos no ambiente / Juliana Aparecida Rizzo. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcio Lourenço Rodrigues

Co-orientador: Eduardo Bagagli

Capes: 21201030

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Aranha. 3. Fungos – Ecologia.

Palavras-chave: Aerossol; Ecologia; *Paracoccidioides brasiliensis*; Teia de aranha.

Adesão de *Paracoccidioides brasiliensis* e outros fungos anemófilos a teias de aranhas: implicações para a identificação de nichos microbianos no ambiente

Rizzo, J. A., Macoris, S.A.G., Rodrigues, M.L., Bagagli, E.

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Unesp, Botucatu/SP

RESUMO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) é um patógeno dimórfico, agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica mais importante da América Latina. Enquanto a fase leveduriforme pode ser isolada de pacientes acometidos pela paracoccidioidomicose, cachorros e tatus naturalmente infectados; vários elementos relacionados a ecologia da fase saprofítica do patógeno, responsável pela produção dos propágulos infectantes, ainda são pouco conhecidos, o que dificulta a adoção de medidas preventivas. A demonstração da alta incidência da infecção por *P. brasiliensis* em tatus-de-nove-bandas (*Dasypus novemcinctus*) abriu novas perspectivas para a identificação do habitat deste patógeno. Na abertura das tocas de tatus comumente encontramos teias de aranhas, biomaterial com formato de rede difusa e peculiar adesividade. O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a presença do *Pb* em amostras de teias de aranhas relacionadas ao habitat de tatus, anteriormente descritos como hospedeiros do patógeno. As amostras de teias de aranhas foram coletadas na Fazenda Lageado, Botucatu/SP, para realização de análises microscópica, molecular e micológica. A análise microscópica evidenciou diferentes esporos fúngicos aderidos às teias; as reações de Nested-PCR das teias de aranhas mostraram amplificação positiva para *Pb* em 4 amostras, com identidade comprovada dos amplicons por sequenciamento. Por cultivo, foram obtidas colônias fúngicas pertencentes a diversos gêneros, dentre eles *Aspergillus*, *Blastobotrys*, *Penicillium*, *Candida* e *Sporothrix*; que estão relacionados a infecções oportunistas e infecções primárias de grande importância médica. Foram também realizados ensaios laboratoriais de adesão de formas miceliais e leveduriforme de *Pb* à teia de aranha, com o intuito de analisarmos a possível atração física entre as células fúngicas e as redes proteicas de teia de aranha. Os resultados mostraram uma evidente adesão das partículas fúngicas aos fios de teia de aranha. Na literatura, não há relatos sobre as propriedades adesivas de microrganismos a teias de aranhas, sendo inéditos os dados obtidos neste trabalho. Estes resultados indicam uma nova estratégia para o estudo de fungos anemófilos, além de contribuir para um maior conhecimento sobre o nicho ecológico do *Pb*, o que poderá facilitar a adoção de medidas de prevenção às infecções.

Adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* and other anemophilous fungi to spider web samples: implications for the identification of microbial niches in the environment

Rizzo, J. A., Macoris, S.A.G., Rodrigues, M.L., Bagagli, E.
Departamento de Microbiologia e Imunologia, Unesp, Botucatu/SP

SUMMARY

The dimorphic pathogenic fungus, *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*), is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), the most important systemic mycosis in Latin America. While the yeast phase can be isolated from patients affected by paracoccidioidomycosis, dogs and naturally infected armadillos; several elements related to the ecology of the saprophytic phase of the pathogen, which is responsible for the production of infective propagules, are poorly understood, hampering the adoption of preventive measures. The demonstration of the high incidence of *Pb* infection in the 9-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*, has opened new perspectives for the identification of the pathogen's habitat. At the opening of the armadillos' burrows, spider webs are commonly found. The objective of this study was to evaluate the presence of *Pb* in spider webs samples related to the habitat of armadillos. Spider web samples were collected at Lageado Farm, Botucatu/SP and prepared for microscopic, molecular and mycological analyses. Microscopic analysis showed that different fungi were closely attached to spider web samples. Nested-PCR reaction showed positive amplification for *Pb* in 4 samples, with identity confirmed by amplicon sequencing. Fungal colonies also included members of *Aspergillus*, *Blastobotrys*, *Penicillium*, *Candida*, and *Sporothrix* genera, which are related to opportunistic disease and primary infections of great medical importance. *In vitro* adhesion tests of mycelia and yeast form of *Pb* to the spider webs were also performed, in order to analyze the possible physical attraction between fungal cells and the spider web protein network. The results showed a clear adherence of fungal particles to spider webs. In the current literature, there are no studies reporting adhesive properties of microorganisms to spider webs. These results indicate a new strategy for the study of airborne fungi and contribute to a better understanding of the ecological niche of *Pb*, which may facilitate the adoption of measures to prevent infections.

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é a fase anamórfica de um ascomiceto pertencente à Ordem Onygenales, Família Ajellomycetaceae, a qual representa a um cladomonofilético que inclui também os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Lacazia* e *Histoplasma* (UNTEREINER et al., 2004). É um fungo termodimórfico que se apresenta na forma de levedura em condições de parasitismo ou quando cultivado em temperatura entre 35°-37°C e micelial na sua forma saprofítica ambiental ou quando cultivado a 25°C. (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994). Sua importância é referente ao fato de ser agente etiológico da Paracoccidioidiomíose (PCM), micose sistêmica e endêmica de alta prevalência na América do Sul e, em especial, no Brasil (WANKE & LONDERO, 1994, PRADO et al., 2009).

Visto que a PCM inicia-se nos pulmões através da inalação de conídias assexuadas infectantes, podemos considerar a forma saprofítica, produtora destes propágulos, como a responsável pela transmissão da doença (RESTREPO-MORENO, 1994). Entretanto, a adoção de medidas preventivas é prejudicada pela carência de informação sobre esta fase e de outros aspectos ecológicos do patógeno. Pois, embora o *P.brasiliensis* já tenha sido isolado na sua forma saprofítica a partir do solo (SHOME & BATISTA, 1963, NEGRONI, 1966, ALBORNOZ, 1971, SILVA-VERGARA et al., 1998,) e outros materiais não convencionais, como fezes de morcegos, pinguim e ração de cachorro (GROSE & NTRAMSITT, 1965; GEZUELE, 1989; FERREIRA et al., 1990), os dados não podem ser aceitos como conclusivos já que esses achados exprimem caráter casual e não reprodutível (FRANCO et al., 2000).

Ao mesmo tempo em que o fungo é dificilmente isolado a partir de sua forma saprofítica ambiental, observou-se que o mesmo pode ser isolado a partir de tecidos de tatus (tatu-de-nove-bandas *Dasypus novemcinctus* e tatu-de-rabo-mole *Cabassous centralis*), com reprodutibilidade, em altas frequências e nas diversas regiões onde a PCM ocorre (NAIFF et al., 1986, BAGAGLI et al., 1998, 2003, MACEDO et al., 1999, SILVA-VERGARA et al., 2000, CORREDOR et al., 1999; 2005). O tatu-de-nove-bandas apresenta sistema imune celular pouco ativo e temperatura corporal baixa em relação aos outros mamíferos (TALMAGE & BUCCHANAN, 1954, PURTILO et al., 1975, ULRICH et al., 1976,). Além da potencial suscetibilidade, esses animais apresentam hábitos escavatórios estando, portanto, intimamente ligados ao solo em que vivem. Esta constatação é um forte indício ambiental da presença do patógeno em solo, principalmente em áreas de tocas do tatu, que poderia apresentar provável

responsabilidade quanto ao habitat da forma saprofítica do fungo e, assim, surge a necessidade de seu estudo.

Teias de aranhas estão distribuídas em praticamente todos os ambientes e são comumente encontradas na abertura de tocas de tatus. Possuem características peculiares em aderir partículas em suspensão (SWANSON et al., 2007), agindo como um filtro natural de ar e podendo representar uma forma simples e eficaz para a obtenção de amostras aerossóis para a pesquisa ambiental do *P. brasiliensis*. Além disso, as amostras de teias de aranhas apresentam carga microbiana bem diminuída quando comparadas com as de solo, o que pode representar uma importante vantagem no isolamento e/ou detecção molecular do fungo.

Uma das dificuldades mais frequentemente apontadas para o isolamento do *P. brasiliensis* na sua forma ambiental é a baixa sensibilidade das técnicas microbiológicas tradicionais que, devido à grande quantidade de outros micro-organismos existentes em material de solo, mostram-se falhas mesmo em áreas endêmicas da Paracoccidioidomicose (FRANCO et al., 2000). Um determinante muito forte desta baixa sensibilidade é a presença de fungos saprofíticos de crescimento rápido, que podem, em pouco tempo, cobrir toda a extensão da placa de *Petri* e dificultando, assim, a identificação do fungo de interesse. Uma forma de contornar este problema poderia ser o emprego dos chamados “meios seletivos” para semear as teias de aranhas amostradas.

Quando se tem como objetivo a obtenção de patógenos específicos, a utilização de meios seletivos torna-se uma ferramenta de grande valor, pois evita o desenvolvimento de contaminantes e favorece a detecção e a identificação do patógeno-alvo (RICHARDSON, 1985). Entre estes meios podemos citar o Mycosel Ágar®, meio seletivo que contém em sua composição, ciclohexamina e clorofenicol. É importante salientar que, devido à sua eficácia, é amplamente usado para o isolamento dos fungos patogênicos principalmente quando o material contém uma grande quantidade de flora ou alguns outros fungos e bactérias (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992, WEITZMAN et al., 1995).

Além dos meios seletivos; outra maneira, um tanto quanto mais eficiente e precisa para a detecção de fungo patogênico em materiais ambientais, é aplicação de técnicas moleculares na qual não há exigência de cultivo (THEODORO et al., 2005). Regiões gênicas como as de rDNA (DNA ribossomal), importante para estudos filogenéticos, possuem certa repetibilidade no genoma e são constituídas por seqüências não variáveis (universais), como 18S (Nuclear SmallrDNA), 5.8S e 28S (Nuclear LargerDNA), usadas

para estudar organismos mais distantes e por seqüências variáveis, as ITS (Internal Transcribed Spacer) que separam as regiões 18S, 5.8S e 28S, são transcritas e processadas para dar origem ao rRNA maduro e podem variar entre diferentes gêneros ou até mesmo dentro de uma única população (WHITE et al., 1990), podendo assim serem usadas para a identificação específica de um micro-organismo. Assim, a biologia molecular passa a ser uma importante ferramenta para a identificação ambiental de um determinado patógeno sem a necessidade de cultivo, através da PCR (SAIKI et al., 1985).

Os estudos de fungos em suspensão aérea, também denominados anemófilos, têm focalizado principalmente os fungos causadores de alergias ou os de interesse fitopatológico (WILLIAMS et al., 2001). Neste trabalho, estamos propondo uma abordagem simples e inovadora de amostragem destes aerossóis pelo uso de teias de aranhas como filtro natural para retenção dos esporos fúngicos. O objetivo geral do presente trabalho foi o de pesquisar a ocorrência de *P. brasiliensis* em amostras ambientais na forma de aerossóis aderidos a teias de aranhas, em locais relacionados ao habitat de tatus, já identificados como positivos para o fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Área de Estudo

As amostras de teias de aranhas foram coletadas em área já identificadas como positivas para *P. brasiliensis*, por cultivo de órgãos de tatus *D. novemcinctus*, em estudos anteriores (BAGAGLI et al., 1998; BAGAGLI et al., 2003). As coletas foram concentradas na Fazenda Lageado, mata da piscicultura, numa área foco de cerca de 5.000 metros quadrados, município de Botucatu, São Paulo.

2) Coleta de amostras em campo para análises gerais

As teias de aranhas foram recolhidas em tubo de ensaio com palito de madeira do tipo espeto para churrasco, ambos previamente autoclavados. As amostras obtidas foram encaminhadas para o laboratório e preparadas para a detecção molecular. Um esquema das análises gerais das amostras de teias de aranha está representado na Figura 1.

- Análises microscópicas

Foram confeccionadas lâminas das amostras de teias obtidas, coradas com Lactofenol Azul-Algodão (LFAA) para a observação, em microscópio óptico, das partículas aderidas e análise do tamanho e da natureza das estruturas encontradas (Figura 1B).

- Análises de cultivo

As amostras aerossóis de teias de aranhas foram semeadas em placas contendo Agar Mycosel, fazendo-se o “rolamento” e/ou “inoculação” dos palitos com as amostras sobre o meio de cultura. As placas foram incubadas nas temperaturas de 25 e 35°C. As placas foram avaliadas após três dias de crescimento e nos dias subsequentes para a obtenção do número total de colônias microbianas.

Ao primeiro sinal de crescimento de colônias semelhantes ao *P. brasiliensis*, estas foram subcultivadas em tubos de ensaios contendo meio BDA (Batata dextrose ágar) e/ou GPY (Glicose peptona e extrato de levedura), nas temperaturas de 25 e 35-37°C e observadas individualmente quanto aos aspectos macroscópicos e presença de dimorfismo térmico. Lâminas foram preparadas em Lacto-fenol-azul algodão e observadas e fotografadas em fotomicroscópio óptico (Figura 1).

- Análises moleculares

Para a detecção molecular do *P. brasiliensis* foi realizada a extração de DNA pelo kit Power Soil DNA (MO BIO Laboratories, Inc), como tentativa de se obter um DNA purificado, sem a presença de ácidos húmicos, fragmentos celulares, proteínas e polissacarídeos que pudessem interferir na PCR (Polymerase Chain Reaction). Este procedimento foi realizado seguindo todos os passos do protocolo do kit (<http://www.mobio.com/soil-dna-isolation/powersoil-dna-isolation-kit.html>), data de acesso: 07/11/2011.

Foram realizadas reações de PCR e Nested-PCR, empregando-se os *primers* ITS4/ITS5 (WHITE et al., 1990) e PbITSE/PbITSR (THEODORO et al., 2005) respectivamente. Para as reações de Nested-PCR empregou-se como “template” 2µL da solução da reação de PCR. As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler gradiente Eppendorf) e a sequência dos *primers* e perfil de ciclagem estão ilustrados na tabela 1:

de aranhas. **A:** Coleta de amostras em campo, cultivo e análises moleculares. **B:** Análise das amostras de teias de aranhas por microscopia óptica direta.

3) Condições de cultivo dos isolados de *Pb* para os ensaios de adesão

Para a primeira etapa do ensaio de adesão, os isolados de *P. brasiliensis* foram primeiramente mantidos a 25°C por 30-60 dias como colônias gigantes no meio Ágar Extrato de Solo (AES). Para o preparo do AES, 1 L de água foi adicionado a 1 Kg de solo (obtido no mesmo local de coleta das teias); a mistura foi autoclavada por 30 minutos. O extrato foi filtrado em gaze e algodão (3 dobras de gaze + algodão + 1 dobra de gaze) e carbonato de cálcio foi adicionado para manter o pH entre 6 e 7. No dia seguinte, o extrato de solo foi novamente autoclavado por 30 minutos.

O meio AES foi então preparado contendo 0,2% de glicose; 0,1% de extrato de levedura; 1,5% de Agar e 50% v/v do extrato de solo. O meio foi autoclavado e distribuído em placas de Petri. Para os testes de adesão, as colônias miceliais foram mortas por vapor de formol 30% (Figura 2A) e, para facilitar o contato com a teia, foram recortados pequenos fragmentos da colônia, em regiões de crescimento mais recente.

As leveduras foram cultivadas a 35°C por 5 dias em meio GPY. Para os ensaios de adesão, foi feita suspensão de 1 alçada de levedura em salina; esta suspensão foi espalhada sobre um fragmento de ágar, para que fosse efetuado o contato levedura-teia (Figura 2B).

4) Coleta de amostras de teia em campo para ensaios de adesão

As amostras de teias de aranhas para os ensaios de adesão foram coletadas na mesma área de estudo descrita anteriormente. Na primeira etapa dos testes de adesão, retângulos de madeira vazados foram utilizados como suporte para a teia, facilitando o posterior contato com o fungo.

Este retângulo de madeira era rotado sobre a teia de aranha, que ficava aderida aos palitos e estendida sobre o suporte. Os retângulos de madeira contendo as amostras de teia foram colocados em contato direto com o micélio morto e com a suspensão de leveduras.

Foi realizado também um experimento com fita adesiva (durex), para observar a taxa de produção de esporos pelos isolados. A fita adesiva foi colocada em contato com o micélio e após contato, tanto o material de fita, como as amostras de teia foram corados com Lactofenol Azul-Algodão (LFAA) e observados em microscópio óptico (Figura 2).

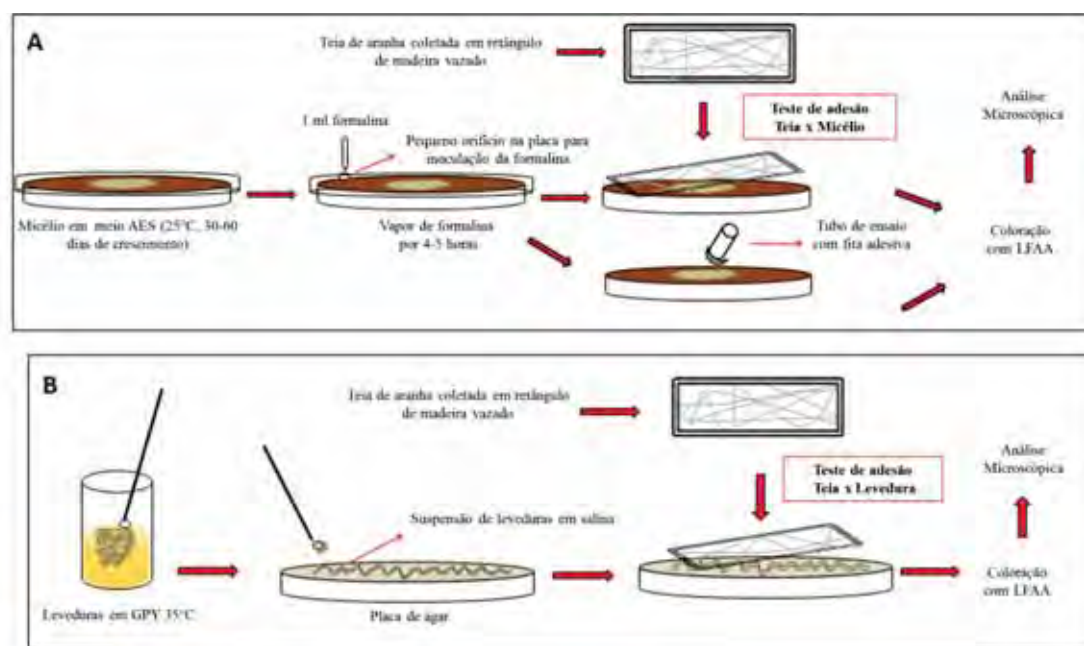


Figura 2: Representação esquemática da metodologia utilizada para ensaios laboratoriais de adesão. **A:** Teste de adesão teia x micélio. **B:** Teste de adesão teia x leveduras.

A segunda etapa do ensaio de adesão foi similar à primeira, com pequenas mudanças no método de coleta da teia e no estabelecimento do contato entre fungo e teia. Utilizamos apenas os isolados miceliais de *Pb*, cultivados em meio AES, por um período de aproximadamente 3 meses a 25°C. Foram utilizados garfos plásticos como instrumentos de coleta; os dentes internos do garfo foram retirados e então este foi rotado sobre a teia, como na etapa anterior, permitindo que a teia permanecesse estendida e não afrouxasse após a coleta.

Nesta fase, as amostras de teias foram primeiramente colocadas em contato com o micélio morto e, logo após, transferidas para lamínulas/discos de silicone redondos estéreis, que foram posteriormente armazenadas em placas de cultura celular com 400uL de fixador cacodilato de sódio 0.1M contendo 2.5% glutaraldeído.

5) Análise dos ensaios de adesão

As amostras da primeira etapa dos ensaios de adesão foram coradas com LFAA e analisadas por Microscopia Óptica. As amostras da segunda etapa dos ensaios foram analisadas por Microscopia de Fluorescência (MF) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Nas análises por MF, as amostras foram marcadas por anticorpos monoclonais reconhecedores da glicoproteína gp43, um antígeno dominante de *P. brasiliensis* muito utilizado no diagnóstico da PCM. Este anticorpo, produzido em camundongo e

gentilmente cedido pela Profa. Rosana Puccia (UNIFESP), foi utilizado com o intuito de observarmos esporos individualizados de *Pb* em amostras de teias de aranhas naturais e também naquelas que foram expostas ao contato prévio com micélio de *Pb*.

O pré-processamento das amostras para MF iniciou-se com a fixação em tampão cacodilato de sódio 0.1M contendo 2.5% glutaraldeído, seguida de lavagem com PBS (três vezes) e bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente com PBS suplementado com albumina bovina (BSA) 1% (PBS-BSA). Após o bloqueio as amostras foram incubadas com anticorpo anti-gp43 na concentração de 1µg/ml por 30 minutos a 37°C, seguido de lavagem com PBS. Por fim, incubação com Anticorpo Secundário (IgG mouse – FITC) por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz e lavagem com PBS (três vezes). Após processamento, as amostras foram observadas e fotografadas em microscópio AxioPlan Zeiss.

Para as análises por MEV, as amostras foram fixadas em tampão cacodilato de sódio 0.1M contendo 2.5% glutaraldeído. Os complexos foram lavados em um tampão contendo cacodilato de sódio 0.1M, sacarose 0.2M e MgCl₂ 2mM. As preparações passaram por uma desidratação seriada em álcool (30%, 50% e 70% por 5 minutos e 95%, 100% e 100% por 10 minutos), secagem em ponto crítico e metalização. Após o processamento foram observadas as amostras: teias controle (sem contato com o micélio de *Pb*) e teias que entraram em contato com o esporo de *Pb*, em microscópio de varredura JEOL JSM-5310.

RESULTADOS

1) Teias de aranhas: aspectos microscópicos e moleculares

Pela análise microscópica direta das teias de aranhas, pudemos observar diversos elementos fúngicos aderidos às teias, o que evidencia a capacidade da teia em reter esporos e diversas estruturas ainda não identificadas (Figura 3).

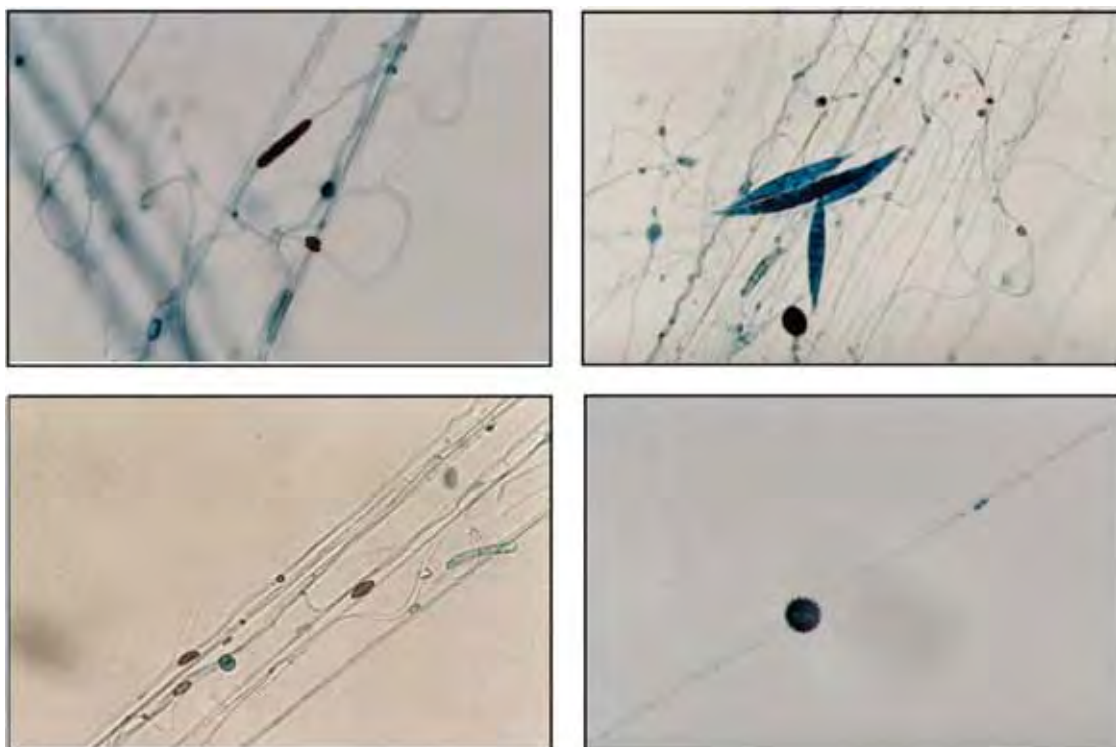


Figura 3: Imagens de lâminas de teias de aranhas coradas com Lactofenol Azul-Algodão, evidenciando partículas aderidas, de formas e tamanhos variados; provavelmente esporos de fungos (coradas em azul, para fungos hialinos; marrom, para fungos dematiáceos, com melanina). Objetiva 40X.

Observamos amplificação específica positiva para a detecção molecular do patógeno, com a presença de banda com 387 bp em 4 amostras de teias de aranhas e 1 amostra de solo de toca de tatu (Figura 4).

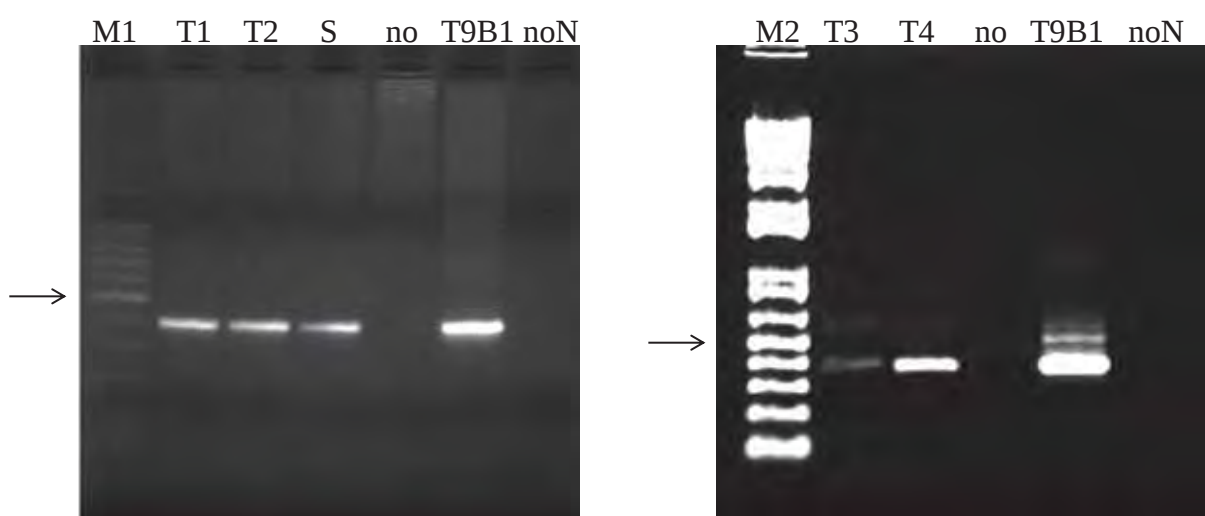


Figura 4: Nested-PCR (*primers* PbITSE/PbITSR) de amostras ambientais de teias de aranhas e solo em gel de agarose 1,5%. **M1)** marcador molecular 100 pb; **M2)** marcador molecular 1Kb; **T1-T4)** Amostras de teia de aranha; **S)** Amostras de solo; **no)** Controle

negativo da PCR; **noN**) Controle negativo do Nested-PCR; **T9B1**) Controle positivo, DNA do isolado T9B1 de *P. brasiliensis*. Seta corresponde a 500bp.

Os resultados da análise das sequências de nucleotídeos dos *amplicons* ambientais positivos, feitos por sequenciamento de DNA, mostrou identidade comprovada a *Paracoccidioides brasiliensis* (Tabela 2).

Tabela 2: Análise comparativa das sequências de nucleotídeos dos *amplicons* ambientais obtidos de teias de aranhas com as depositadas no Banco de dados do GenBank, pela ferramenta Blastn.

Amostra	Identidade Molecular	Acesso	Fragmento Consenso(bp)	Query coverage	E value	Max ident
T1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AB304448.1	303	100%	6e-151	99%
T2	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AY374336.1	306	100%	3e-154	100%
T3	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AB304448.1	372	100%	0.0	100%
T4	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AB304448.1	367	99%	0.0	100%
S1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AB304448.1	300	100%	5e-151	100%

2) Colônias isoladas: aspectos morfológicos e moleculares

Diversas colônias fúngicas foram obtidas pelo cultivo das teias de aranhas, as principais pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Blastobotrys*, *Penicillium*, *Candida* e *Sporothrix* (Figura 5); sendo os dois primeiros causadores de infecção oportunista e os dois últimos gêneros de reconhecida importância médica. A classificação taxonômica em nível de gênero (Tabela 3) foi possível através do sequenciamento dos amplicons obtidos por PCR com *primers* universais para fungos (ITS4 e ITS5).

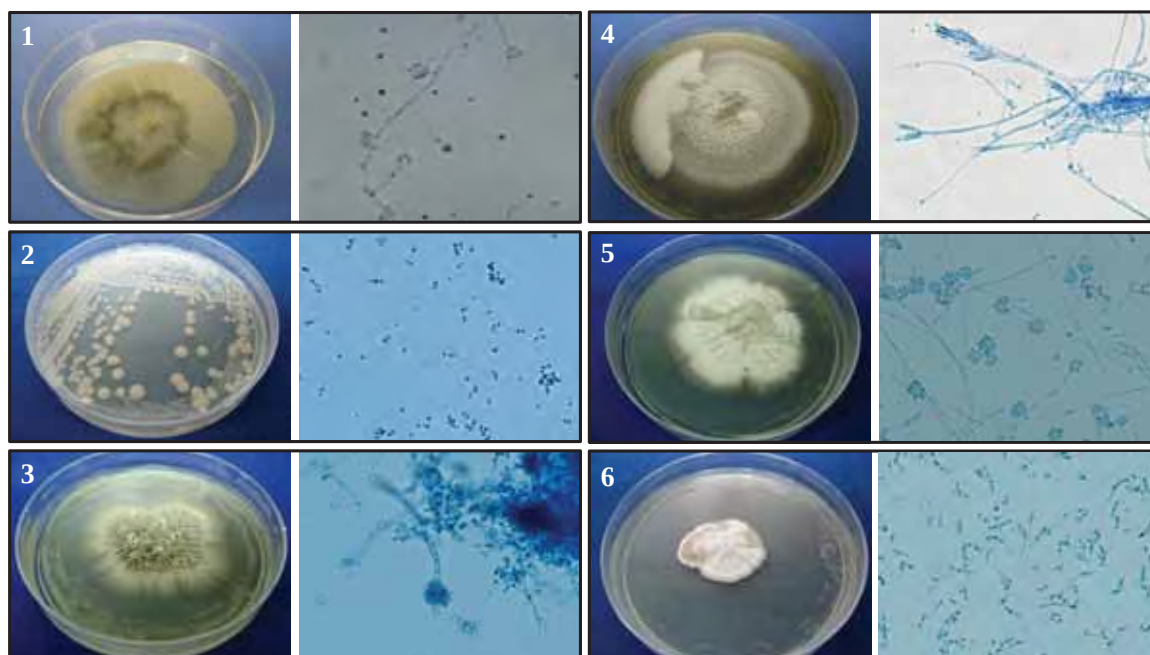


Figura 5: Aspectos macro e microscópicos de fungos ambientais isolados de teias de aranhas, cultivados em placas contendo meio BDA a 35°C. Lâminas coradas com LFAA. Objetiva de 40X. Amostras: **1)** *Sporothrix inflata*; **2)** *Candida homilientoma*; **3)** *Aspergillus versicolor*; **4)** *Penicillium funiculosum*; **5)** *Blastobotrys terrestris*; **6)** *Blastobotrys proliferans*.

Tabela 3: Análise comparativa das sequências nucleotídicas dos *amplicons* (colônias isoladas de teias de aranhas) com as depositadas no Banco de dados do GenBank, pela ferramenta Blastn.

Identidade molecular	Acesso	Fragmento consenso (bp)	Query coverage	E value	Max ident
<i>Aspergillus versicolor</i>	FJ878627.1	569	100%	0.0	100%
<i>Penicillium funiculosum</i>	GQ337425.1	550	99%	0.0	99%
<i>Blastobotrys terrestris</i>	FM178345.1	495	72%	2e-95	93%
<i>Blastobotrys proliferans</i>	EF584542.1	522	100%	8e-114	84%
<i>Sporothrix inflata</i>	DQ093704.1	596	99%	0.0	91%
<i>Candida homilientoma</i>	GU246261.1	430	100%	0.0	99%

Importante ressaltar os aspectos do isolado *Blastobotrys terrestris*; a colônia filamentosa apresenta aspecto macroscópico de “cratera de vulcão” e estruturas

microscópicas com corpo de frutificação no formato de “roda-de-leme”, muito semelhantes às leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 6).

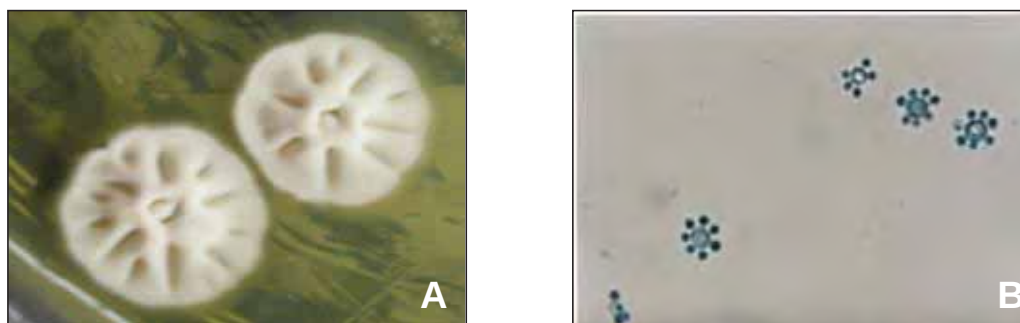


Figura 6: **A)** Análise macroscópica do isolado *Blastobotrys terrestris*, com aspecto de “cratera de vulcão” a 35°C. **B)** Análise microscópica do mesmo isolado a 25°C corado com LFAA. Objetiva de 40x.

Em relação ao isolado *Sporothrix inflata*, observou-se um evidente termodimorfismo. À temperatura de 25°C apresenta-se na forma de micélio, com a presença de corpo de frutificação e a 37°C apresenta-se na forma de levedura (Figura 7).

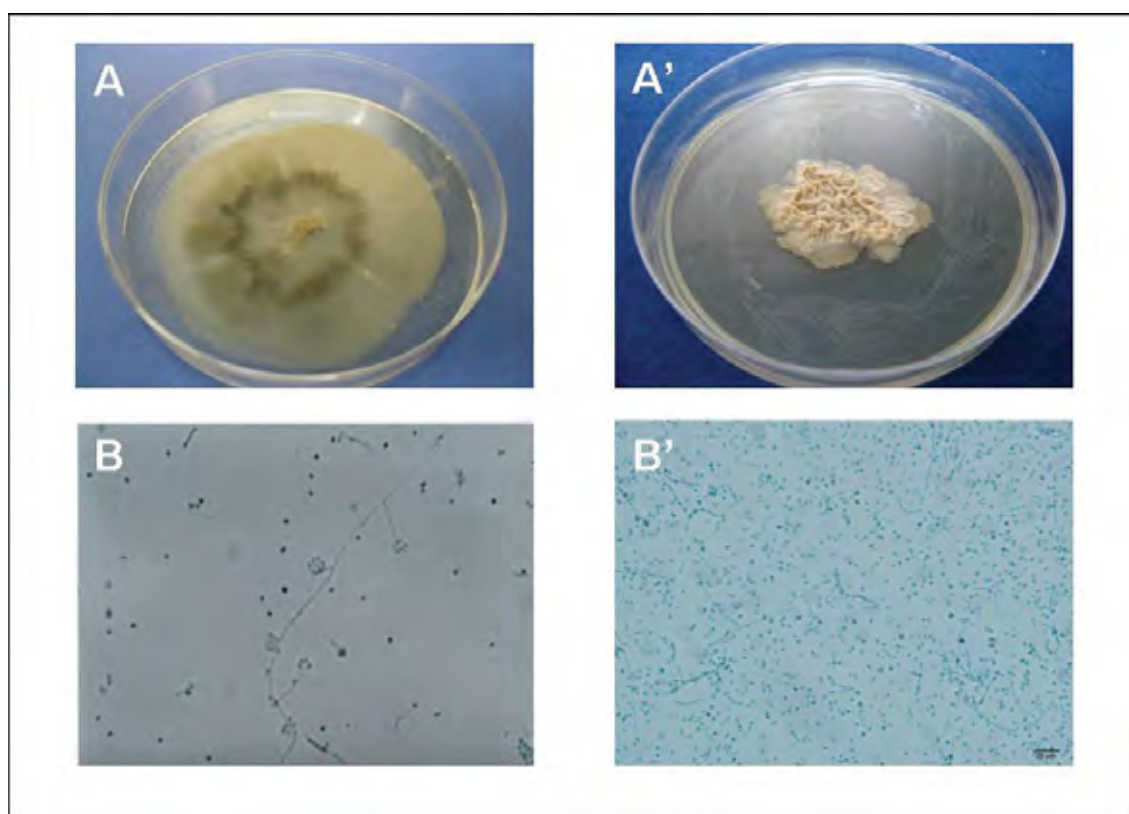


Figura 7: Dimorfismo térmico apresentado pelo isolado *Sporothrix inflata*. **A)** Aspecto macroscópico em meio BDA a 25°. **A’)** Aspecto macroscópico em meio BDA a 35°. **B)** Aspecto microscópico de microcultivo a 25°, evidenciando corpo de frutificação. **B’)** Aspecto microscópico a 35°. Lâminas coradas com LFAA. Objetiva de 40X.

3) Adesividade de teias de aranhas a esporos e leveduras de *Pb*

Através dos ensaios de adesão, observou-se que há uma real interação de partículas fúngicas a teias de aranhas, quando ambos são colocados em contato. O ensaio de adesão com a fita durex possibilitou a evidência de que os isolados estavam produzindo esporos (Figura 8). As lâminas preparadas com as amostras de teia, colocadas em contato com o micélio de *Pb*, mostraram uma clara adesão entre teia e partículas fúngicas. Observou-se que, tanto esporos isolados (Figura 9), como também fragmentos de micélio (Figura 10) ficaram fortemente aderidos à teia.

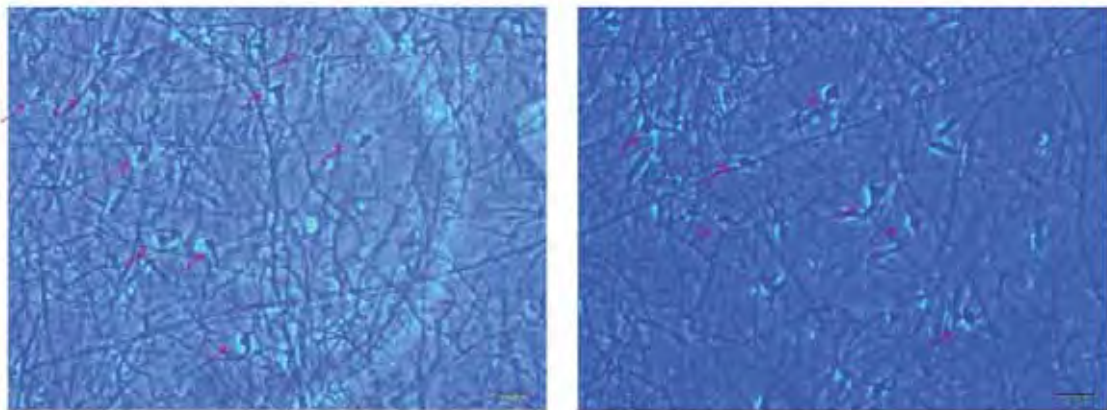


Figura 8: Lâmina preparada com fita adesiva colocada em contato com micélio de *Pb* (Isolado *Pb*-cão). Setas apontam para conídeas de *Pb*.

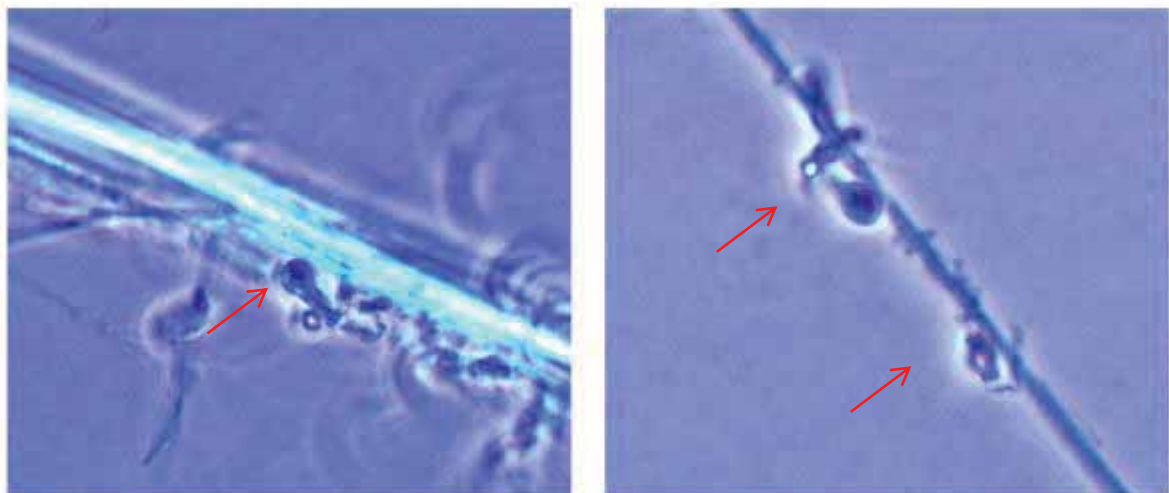


Figura 9: Ensaio de adesão teia de aranha – micélio *Pb*-cão, evidenciando esporos isolados de *Pb* aderidos à teia (foto recortada). Coloração com LFAA.

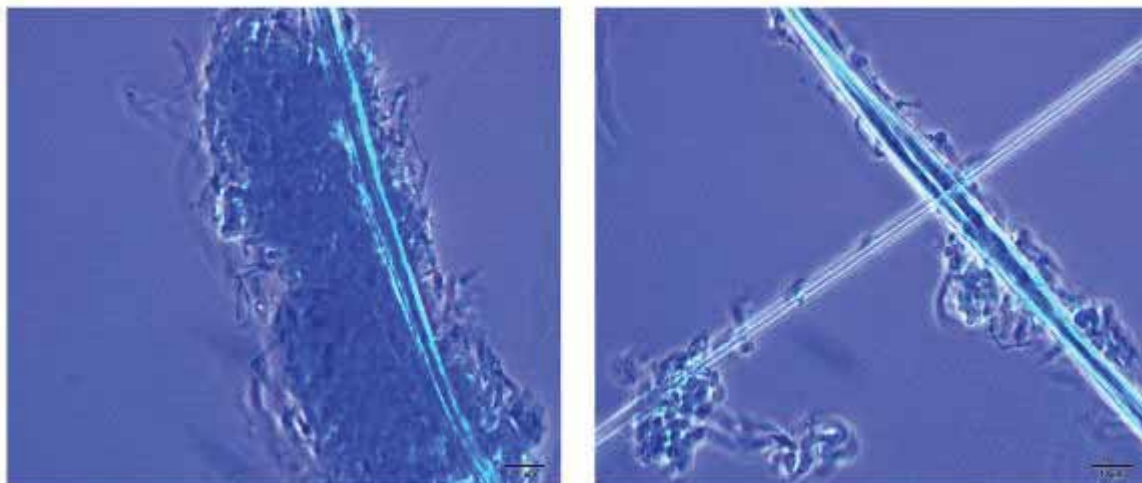


Figura 10: Ensaio de adesão teia de aranha – micélio *Pb-cão*, evidenciando fragmentos de micélio e esporos aderidos à teia. Coloração com LFAA. Barra corresponde a 10µm.

O ensaio de adesão com leveduras também demonstrou adesão das células fúngicas à teia. Neste caso, observou-se tanto leveduras individualizadas (Figura 11), como também emaranhados de células fúngicas aderidas (Figura 12).

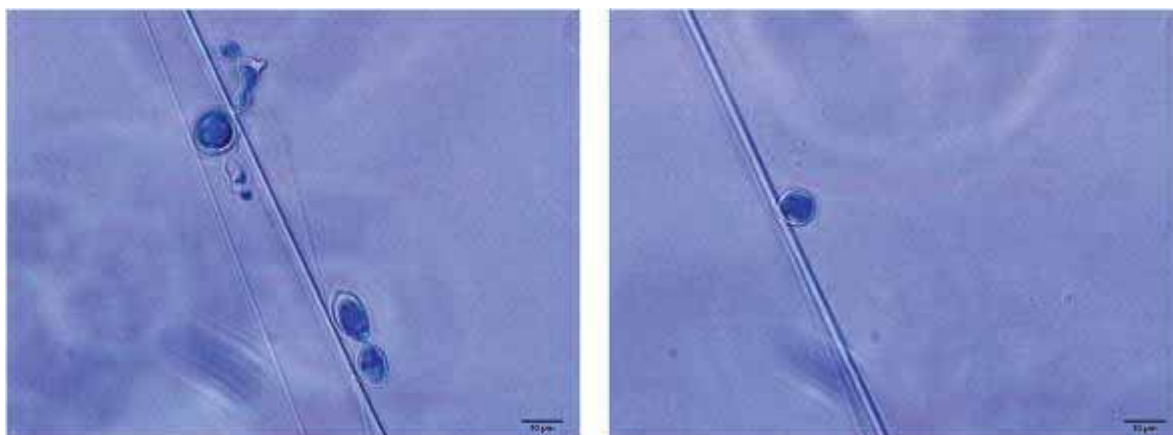


Figura 11: Ensaio de adesão teia de aranha – leveduras T9B1. Leveduras fúngicas isoladas aderidas à teia. Coloração com LFAA. Barra corresponde a 10µm.

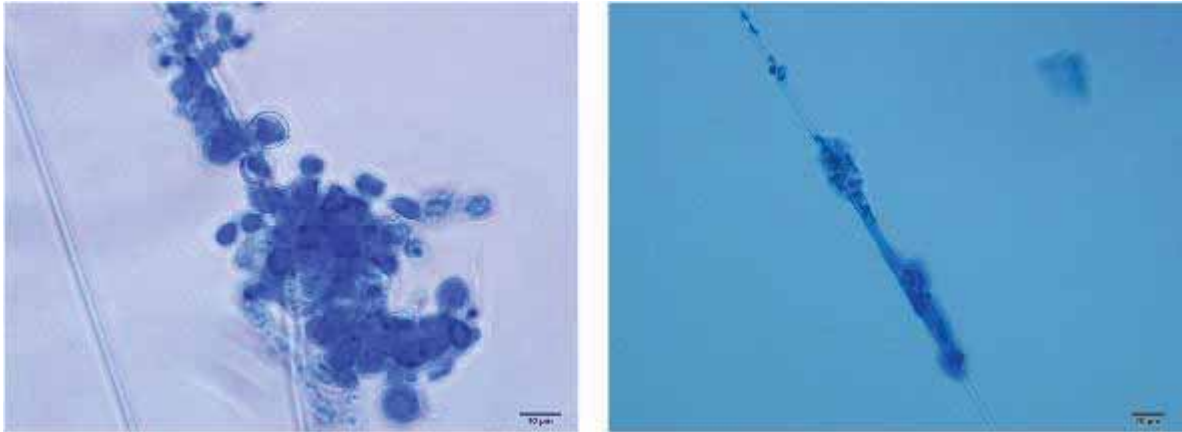


Figura 12: Ensaio de adesão teia de aranha – leveduras T9B1. Aglomerados de células fúngicas aderidas à teia. Coloração com LFAA. Barra à esquerda corresponde a 10µm; à direita corresponde a 20µm.

Interessante notar que, em alguns casos, as leveduras se dispuseram sobre a teia acompanhando seu formato flexível (Figura 13). Em outras fotos, observou-se que as leveduras se aderiram à teia exatamente no sítio de brotamento das células filhas (Figura 14).

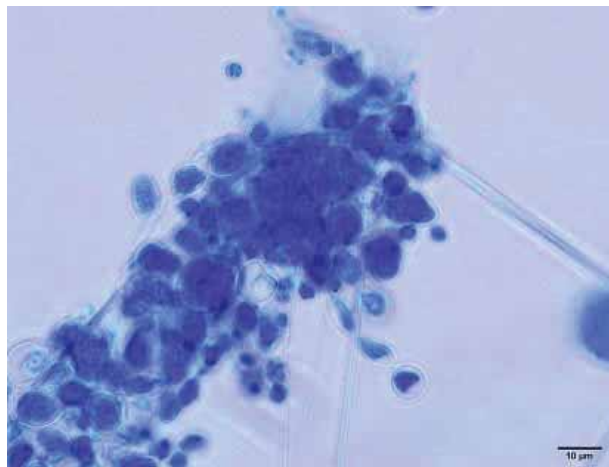


Figura 13: Ensaio de adesão teia de aranha – leveduras T9B1. Disposição de leveduras por toda a extensão da teia, que assume formatos curvos devido à sua flexibilidade. Coloração com LFAA. Barra corresponde a 10µm.

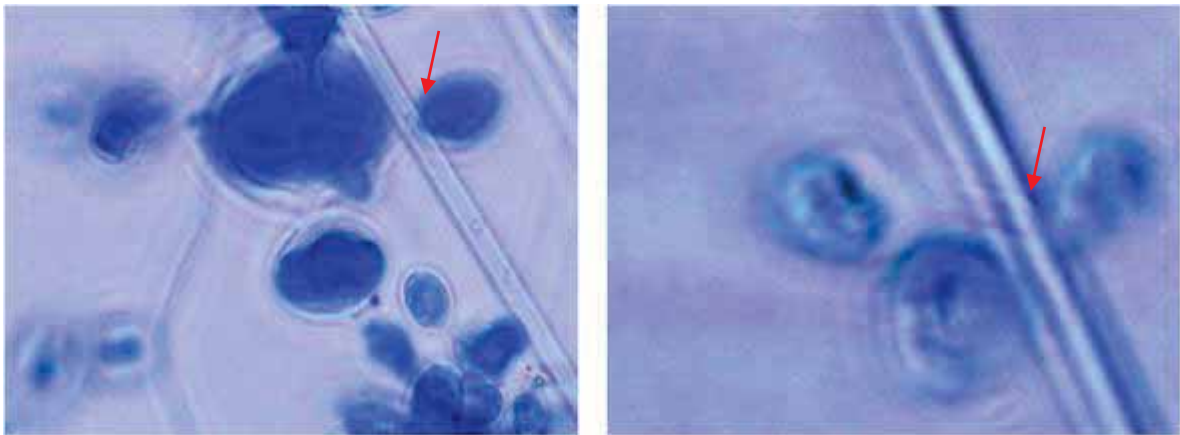


Figura 14: Ensaio de adesão teia de aranha – leveduras T9B1. Ligação da levedura à teia no ponto de brotamento (Foto recortada). Coloração com LFAA.

Nas análises por MF, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-gp43. Observou-se que nas amostras de teias que haviam sido submetidas ao contato prévio com *Pb* houve uma forte marcação para esporos e diferentes estruturas aderidas, inclusive para os próprios fios da teia (Figura 15), provavelmente devido a alta carga fúngica presente na amostra. Observou-se a marcação para segmentos de hifas de *Pb* aderidos à teia e também para prováveis esporos de outros fungos ambientais, alguns macroconídios-like, septados e/ou dematiáceos, como indicado pelas setas na Figura 15.

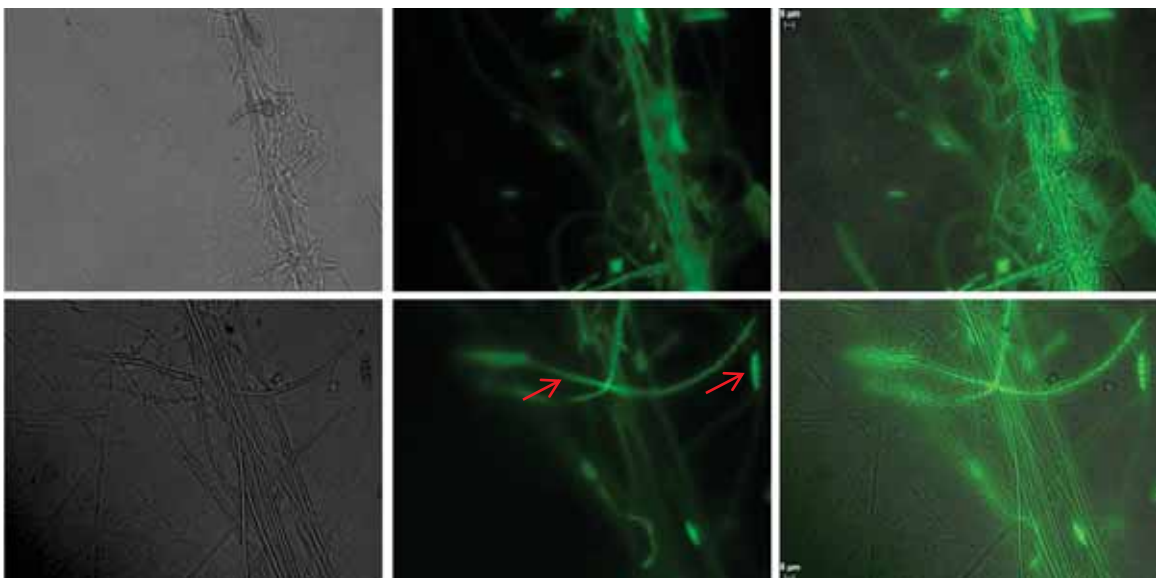


Figura 15: Microscopia de fluorescência do ensaio de adesão entre teia de aranha e micélio de *Pb*, marcados com anticorpo monoclonal anti-gp43. Estão evidenciadas diversas estruturas, incluindo hifas septadas de *Pb* e prováveis invertebrados segmentados. São mostradas as análises em campo claro (coluna esquerda), modo de fluorescência (coluna central) e a sobreposição de imagens (coluna direita).

A imunofluorescência para teias de aranhas “naturais” (sem contato prévio com micélio *Pb*) mostrou uma interessante marcação para esporos. Pudemos notar que algumas partículas aderidas não foram marcadas pelo anticorpo, como o indicado pelas setas da Figura 16; enquanto que outras, provavelmente esporos, apresentaram marcações pontuais e específicas.

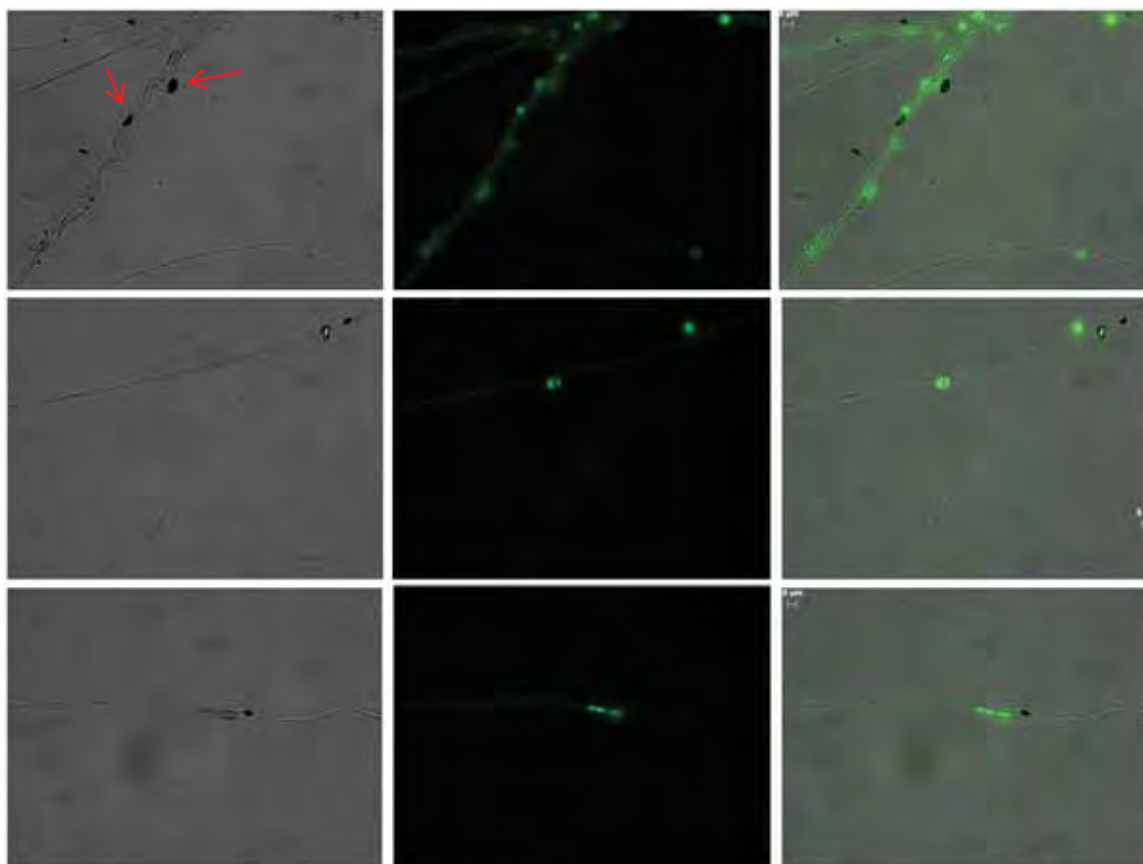


Figura 16: Microscopia de fluorescência de teias de aranhas “naturais” marcadas com anticorpo monoclonal anti-gp43, evidenciando esporos intimamente aderidos. São mostradas as análises em campo claro (coluna esquerda), modo de fluorescência (coluna central) e a sobreposição de imagens (coluna direita).

Nas análises por MEV da interação *Pb* x teia de aranha também foi possível observar diferentes estruturas aderidas; porém, não foi possível identificar especificamente esporos de *Pb*. Importante ressaltar que as teias de aranhas são provenientes de seu ambiente natural; portanto, já possuem uma grande carga de outras partículas aderidas, não necessariamente fúngicas. Dessa forma, a identificação de esporos fúngicos foi dificultada. No entanto, algumas estruturas arredondadas (como observado na foto inferior à direita da Figura 17 e também na Figura 18) nos chamaram a atenção, por apresentarem um padrão morfológico distinto do que foi mais comumente visto ao longo da extensão dos fios de teia.

Nos painéis superiores da Figura 17, observa-se que a teia, por vezes, assume formato espiralado, provavelmente devido ao método de transferência da mesma para as lamínulas de vidro e discos de silicone, que causou grande pressão sobre os fios, levando-os ao rompimento. Apesar de não terem sido encontrados esporos de *Pb* aderidos, observou-se hifas septadas do micélio em contato com o fio de teia (Figura 19).

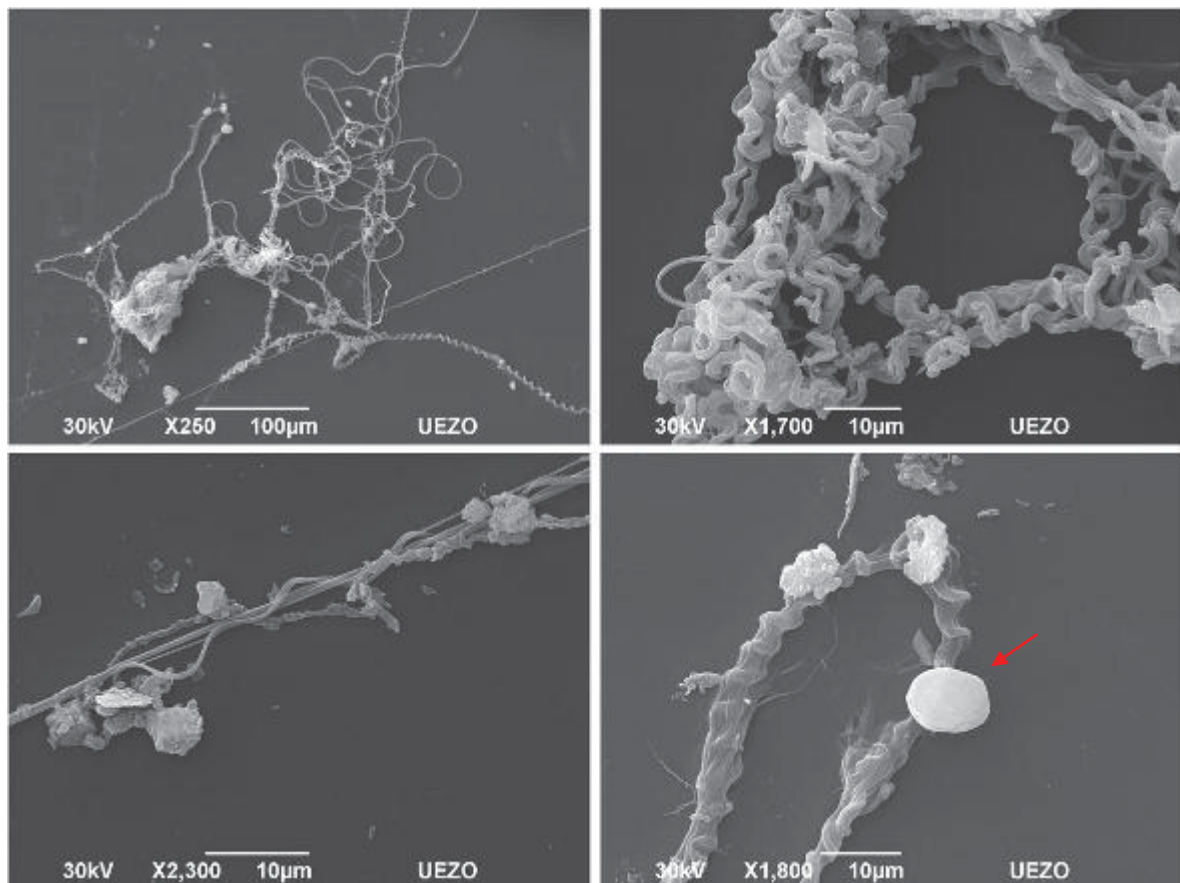


Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura do ensaio de adesão entre teia de aranha e micélio de *Pb*, evidenciando o formato espiralado assumido pelas teias, além de diversas partículas aderidas. Seta aponta um provável esporo fúngico.

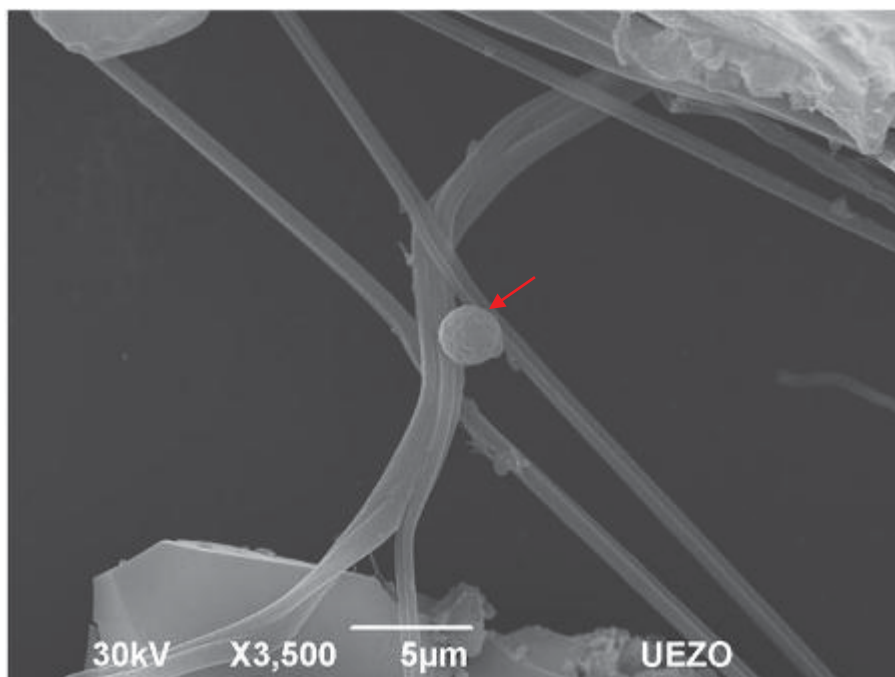


Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura do ensaio de adesão entre teia de aranha e micélio de *Pb*, evidenciando provável esporo fúngico aderido.

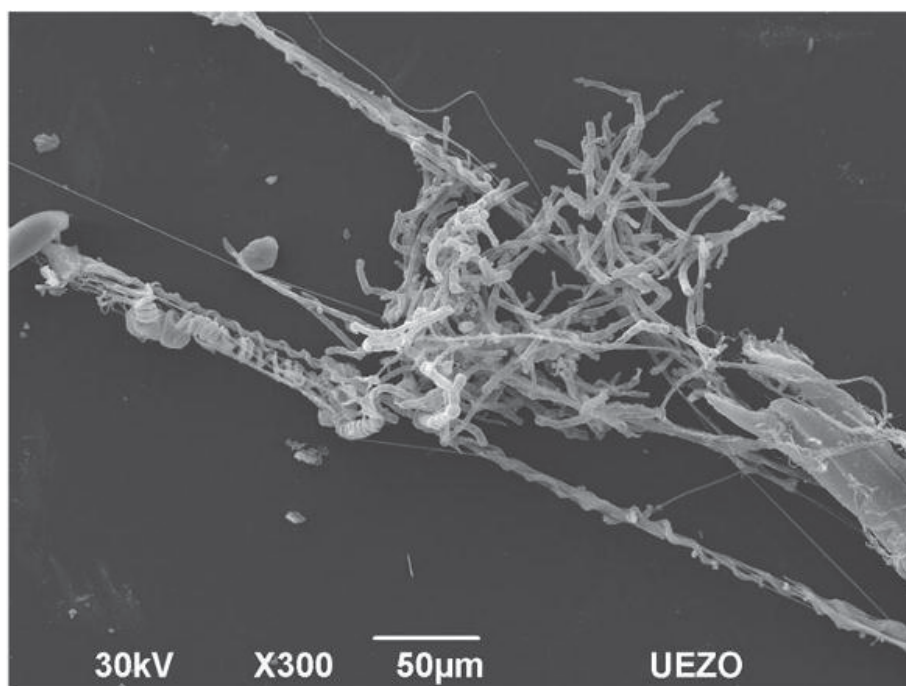


Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura do ensaio de adesão entre teia de aranha e micélio de *Pb*, evidenciando hifas de *Pb* aderidas ao filamento de teia.

DISCUSSÃO

Uma das maiores dificuldades para o isolamento do *P. brasiliensis* na sua forma ambiental é a baixa adequação das técnicas microbiológicas tradicionais que, devido à grande quantidade de outros micro-organismos existentes em material de solo, mostram-

se ineficazes, mesmo em áreas endêmicas da paracoccidioidomicose (FRANCO et al., 2000). A amostragem de fungos anemófilos através de teias de aranhas se mostrou mais eficaz, em comparação com as metodologias tradicionais, uma vez que diminuiu significativamente a carga microbiológica ambiental coletada.

Neste trabalho, apesar da detecção molecular positiva de *P. brasiliensis* em teias de aranhas; não foi possível o isolamento de colônias do patógeno nas amostras analisadas. Porém, outros fungos foram encontrados como os dos gêneros *Candida*, *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

A espécie isolada *B. proliferans* aparenta uma pronunciada diferença na capacidade de crescimento a 25 e 35°C (cresce bem a 35 e muito pouco a 25°C) e foi relatada como causadora de infecção em pacientes submetidos à diálise peritoneal (QUIRIN et al, 2007). Importante ressaltar que estas espécies do gênero *Blastobotrys* apresentam algumas características bastante peculiares que poderiam facilmente ser confundidas com propriedades de membros do gênero *Paracoccidioides*. Essas propriedades incluem o fato de aparentarem ser dimórficos, formarem colônias filamentosas com aspecto macroscópico de “cratera de vulcão” e com estruturas microscópicas com corpo de frutificação no formato de “roda-de-leme”. Suas leveduras, entretanto, são pequenas e sem o aspecto característico de *P. brasiliensis* quando observadas nos isolados dimórficos.

Muitos isolados ambientais de teias de aranhas crescem bem quando cultivados tanto a 25, quanto a 35°C, indicando um potencial para o isolamento de espécies patogênicas e/ou oportunistas. Essa característica foi observada através do isolamento de fungos oportunistas e também de importância médica, como os dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Sporothrix*.

A espécie *Candida homilientona* foi isolada de várias teias de aranhas e em diferentes épocas do ano. Consideramos este achado surpreendente, uma vez que o gênero *Candida* é majoritariamente constituído por espécies leveduriformes, que portanto, não produzem esporos para sua dispersão ambiental. Essa observação nos faz acreditar que leveduras também sejam capazes de aderir a teias de aranha, o que de fato foi comprovado nos testes de adesão entre teia e leveduras de *Pb*.

Os ensaios *in vitro* de adesão demonstraram que o *Pb* realmente é aderente à teia, tanto em sua forma micelial, como também leveduriforme. No entanto, nossos dados não nos permitem identificar qual seria o mediador fúngico dessa adesão. Para tal fim, serão

necessários ensaios posteriores que incluirão o bloqueio de moléculas com potencial de mediar processos adesivos, incluindo a gp43. Apesar de esta molécula ser característica de *P. brasiliensis*, nossas análises por imunofluorescência revelaram positividade para muitas partículas ambientais. Esses resultados sugerem o compartilhamento de determinantes sorológicos da gp43 por diferentes espécies ambientais.

STRAUS e colaboradores (1996) demonstraram que a gp43 pode ser encontrada no citoplasma e na parede celular de *P. brasiliensis*. Majoritariamente, entretanto, a molécula é endereçada para o ambiente extracelular. Nesse caso, poderia haver impregnação das teias por glicoproteínas similares secretados por micro-organismos ambientais. Outros estudos deverão ser realizados, com o intuito de analisarmos a real especificidade de reação do anticorpo anti-gp43 com esporos de *Paracoccidioides brasiliensis*, frente aos demais fungos ambientais.

CONCLUSÃO

Amostras ambientais de teias de aranhas, pela organização em formato de rede dispersa e peculiar adesividade a partículas em suspensão, representam uma simples e eficiente estratégia para o estudo de fungos anemófilos patogênicos e/ou oportunistas. Esse modelo parece ser também promissor para estudos de determinantes de adesão do patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis* a potenciais nichos ambientais, os quais podem ser importantes na seleção de "fatores de virulência" com potencial de influenciar tanto a propagação ambiental do patógeno como o estabelecimento de infecções humanas e animais.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer às agências financiadoras deste trabalho, FAPESP e CNPq, aos pesquisadores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Unesp de Botucatu, em especial, Raquel Theodoro e Sandra Bosco pelas sugestões gentilmente concedidas ao longo de todo trabalho. Aos integrantes do Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, UFRJ, pelas importantes contribuições a este estudo, em especial às alunas Luna Sobrino Joffe, Ana Claudia Guimarães e Priscila Albuquerque. Ao Prof. Kildare Miranda do Instituto de Biofísica, UFRJ, e à doutoranda Caroline Ramos pelo uso do microscópio de varredura e auxílio na aquisição das imagens. Somos igualmente gratos à Profa. Rosana Puccia pela concessão dos anticorpos monoclonais

anti-gp43 utilizados neste trabalho e, finalmente, ao Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles pela ideia inicial e inovadora da pesquisa de esporos de *P. brasiliensis* em teias de aranhas associadas a tocas de tatus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248-53, 1971.
- BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K. I., ALQUATI, S., MIYAJI, M., CAMARGO, Z. P., GOMES, G. M., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-12, 1998.
- BAGAGLI, E. ; RESTREPO, A. ; PUCCIA, R. ; TAYLOR, J W ; MCEWEN, J. G. ; MONTES, B. . Pylogenetic relations among *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. In: ISHAM, 2003, COLOMBIA. Anais, 2003. v. 1. p. 346-6.
- CORREDOR, G. G.; CASTAÑO, J. H.; PERALTA, A.; DÍEZ, S.; ARANGO, M.; McEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iber. Micol.**, v. 16, p. 216-20, 1999.
- CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTAÑO, J.H.; ZULUAGA, J.S.; HENAO, B.; ARANGO, M.; TABARES, A.M.; MATUTE, D.R.; McEWEN, J. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med. Mycol.**, v. 43, p. 275-80, 2005.
- FERREIRA, M.S.; FREITAS, L.H.; LACAZ, C. da S., DEL NEGRO, G.M.; MELO, N.T.; GARCIA, N.M.; ASSIS, C.M.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 28, p. 253-6, 1990.
- FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S.A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 185-91, 2000.

- GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. De heces de pinguino de la Antártida. In: San-Blas G, ed. Proceedings IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis. Caracas, Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).1989. Abstract B2.
- GROSE, E.; TRAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, p. 124-5, 1965.
- MACEDO, R. C. L. ; LAZÉRA, M. S. ; TRILLES, L. ; BULCÃO, A. S. ; SILVA JÚNIOR, N. J. ; OLIVEIRA, N. A. ; WANKE, B. *Paracoccidioides brasiliensis* - Infecção natural de tatus. Estudo em Serra da Mesa, Goiás, Brasil. In: VII ENCONTRO INTERNACIONAL DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE, 1999, Campos do Jordão. VII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose, 1999.
- NAIFF, R. D.; FERREIRA, L. C. P.; BARRETOS, T. V.; NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**., v. 28, p. 19-27, 1986.
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo Argentino. **Prensa Med. Argent.**, v. 53, p. 2381-2, 1966.
- PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 3, p. 513-21, 2009.
- PURTILO D.T.; WALSH G.P.; STORRS E.E.; GANNON C. The immune system of the nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn). **Anat. Rec.**, v. 181, p. 725-34, 1975.
- RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M. F.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC Press, 1994. p. 121-8.
- RICHARDSON, G.H. Standard methods for the analysis of dairy products. 15.ed. Washington: **American Publ. Health Assoc**, 1985, 329p.
- RICHINI-PEREIRA,V.B.; BOSCO, S.M.G.; GRIESE, J.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; SILVA, R.J.; BARROZO, L.; TAVARES, P.M.S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med. Mycol.**, v. 46, p. 35-40, 2008.

- QUIRIN, N.; DESNOS-OLLIVIER, M.; CANTIN, J.F.; VALERY, J.C.; DOUSSY, Y.; GOURSAUD, R.; DROMER, F.; TIVOLLIER, J.M. *Peritonitis due to Blastobotrys proliferans in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p. 3453-5, 2007.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science.**, v. 230, p. 1350-4, 1985.
- SAN BLAS, G.; SAN BLAS F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* Dimorphism. In: FRANCO, M. F.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC Press, 1994. p. 49-66.
- SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev. Fac. Med. Univ. Fed. Ceará.**, v. 3, p. 90-4, 1963.
- SILVA-VERGARA, M.L.; MARTÍNEZ , R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of *Paracoccidioidesbrasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 37-42, 1998.
- SILVA-VERGARA, M.L.; MARTÍNEZ , R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; MAFFEI, C. M.; CHADU, J.B. Isolation of *Paracoccidioidesbrasiliensis* from armadillos (*Dasypusnovemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 193-9, 2000.
- STRAUS, AH.; FREYMULLER, E.;TRAVASSOS, LR.;TAKAHASHI, HK. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioidesbrasiliensis*with monoclonal antibodies. **J. Med. Vet. Mycol.** v.34, p. 181–6, 1996.
- SWANSON, B.O.; BLACKLEDGE, T.A.; HAYASHI, C.Y. Spider capture silk: performance implications of variation in an exceptional biomaterial. **J. Exp. Zool.**, v. 307A, p. 654-66, 2007.
- TALMAGE, R.V.; BUCCHANAN, G. D. The armadillo *Dasypus novemcinctus* - a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. **Rice Inst. Pamphlet Houston.**, v. 41, p. 135, 1954.
- THEODORO, R.C.; CANDEIAS, J.M.G.; ARAÚJO JR, J.P.; BOSCO, S.M.G.; MACORIS, S.A.G.; PADULA JR, L.O.; FRANCO, M.; BAGAGLI. E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol.**, v. 43, p. 725-9, 2005.

- ULRICH M.; CONVIT J.; CENTENO M.; RAPETTI M. Immunological characteristics of the armadillo, *Dasypus sabanicola*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 25, p. 170-6, 1976.
- UNTEREINER, W.A.; SCOTT, J.A.; NAVEAU, F.A.; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia.**, v.96, p. 812-61, 2004.
- WANKE, B.; LONDERO, A. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M., LACAZ, C., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC Press, 1994. p. 109-120.
- WEITZMAN, KANE; SUMMERBELL. In :MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, M.A.; PFALLER, M.A.; YOLKENM R.H. (Eds). **Manual of clinical microbiology**, 6 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. 1482p.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-22.
- WILLIAMS, R.; WARD, E.; McCARTNEY, H. A. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 67, n.6, p. 2453-9, 2001.