



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ELAINE CRISTINA E SILVA

**AÇÃO DE *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A de Vries ISOLADO DE
AMBIENTES CLIMATIZADOS SOBRE AS VIAS RESPIRATÓRIAS DE
CAMUNDONGOS**

Maceió - AL

2015

ELAINE CRISTINA E SILVA

**AÇÃO DE *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A de Vries ISOLADO DE
AMBIENTES CLIMATIZADOS SOBRE AS VIAS RESPIRATÓRIAS DE
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho

Maceió – AL

2015

OFEREÇO

Aos amores da minha vida, meus pais (Cícera Silva & José Cazuza), meus irmãos (Edmilson Silva, Edleuza Vitor & Eliane Silva) e meus sobrinhos (Fernanda Vitor, Fabrício Vitor, Wesley Santos, Stephane Santos, Pedro Gomes & Júlia Gomes) pelo amor incondicional, companheirismo, alegrias e felicidades sem fim, paciência, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha vida, por serem meus maiores motivadores e acreditarem sempre em mim.

DEDICO

Aos professores e orientadores que tive no correr da minha vida acadêmica, em especial Janira Couto, Anilda Santos, Eurípedes Alves, Emiliano Barreto, Gentileza Neiva e Luiz Antônio, que acreditaram na minha capacidade e me deram oportunidade de crescimento científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter conseguido cumprir mais esta tarefa.

Aos meus pais por contribuírem na minha formação, personalidade e me proporcionar momentos inesquecíveis, apoiando sempre as minhas decisões e por terem sido tolerantes em meus vastos momentos de ausência e recolhimento. Amo vocês!

Ao meu orientador Luiz Antônio e Co-orientador Eurípedes Alves pelos ensinamentos, amizade, oportunidade concedidas e por acreditar no meu trabalho e enriquecê-lo, serei eternamente grata. Minha especial admiração e gratidão

A Universidade Federal de Alagoas, a Comissão de Ética no Uso dos Animais, ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela formação e aperfeiçoamento profissional. A todos os mestres, professores, graduandos e pós-graduandos pelo exemplo de profissionalismo e conhecimento transmitidos. Meus agradecimentos!

A todos os membros do Laboratório de Ambientes Climatizados, especialmente aqueles que tornam o nosso ambiente de trabalho um segundo lar: Iara Fonseca, Rosana Kézia, Mirelly Silva, Marcos Antônio, Érica Girlane, Kcrystianelle Pedrosa, Silmara Rocha, Rodrigo Calumby, Erivânia Araujo, Bruno Stephane, Tamires Martins, Ranielle Silva, Renata Oliveira, Neilma Santos, Isleane Martins e Yasmim. Meu muito obrigado, especialmente aqueles que me apoiaram e tornaram possível a realização desse trabalho, Janylle Nunes, Silvana Rocha, Jean e Gilvonete Lages. Vocês são inesquecíveis!

Aos meus amigos pelos inesquecíveis momentos de descontração, especialmente aqueles que conviveram comigo nessa etapa, Aline Silva e Michelle Martins. Muito obrigada por todos os momentos que passamos juntas, pelo carinho, conselho e pela eterna amizade que construímos durante esses anos de convivência.

A minha paixão André Queiroz pela paciência, dedicação, atenção e amor. Ao meu sobrinho Wesley Santos, pela "Ajudinha" na busca dos animais. Ao meu irmão patrocinador Edmilson Silva. Meus agradecimentos!

Ao suporte técnico-científico através do portal Periódico da CAPES, e apoio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPEAL por contribuírem para a realização dessa pesquisa.

Por fim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para mais uma meta alcançada em minha vida, e que eventualmente não foram citados, minhas desculpas e agradecimentos.

RESUMO

Entre os principais contaminantes do ar de ambientes climatizados estão os bioaerossóis fúngicos, que estão amplamente distribuídos na atmosfera. Dentre as espécies encontradas muitas apresentam a capacidade de causar manifestações alérgicas e doenças em humanos e animais como *Cladosporium cladosporioides*. No entanto, o perfil de resposta inflamatória que estes fungos causam, quando inalados por indivíduos saudáveis, ainda não se encontra totalmente esclarecido. Portanto, objetivou-se avaliar a ação de *Cladosporium cladosporioides* isolado de ambientes climatizados sobre as vias respiratórias de camundongos. A coleta do ar foi realizada por impactação através de amostrador do tipo Andersen®, utilizando-se placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud, durante 10 minutos em horários de movimento como preconizado pela RE Nº 9 da ANVISA. As placas foram incubadas a 28 °C pelo período de cinco dias. Após o crescimento das colônias, as mesmas foram cultivadas em cultura central e posteriormente identificadas com base nas características macro e microscópicas. Seguindo da identificação, esporos da espécie em estudo foram suspensas em solução salina para obtenção da concentração de 2×10^5 conídios/mL. Posteriormente, 30 µl desta suspensão foram administrados por via intranasal em camundongos Swiss (18–25g, $n = 8$) de ambos os sexos nos tempos de 1, 3, 5, 10 e 15 dias. Grupo controle foi composto por animais que receberam apenas veículo (0,1% de Tween 80 + NaCl a 0,9%). Após 24 horas da última instilação, os animais foram eutanasiados para a obtenção do lavado broncoalveolar (LBA). Todos os procedimentos nos quais foram submetidos os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa, da Universidade Federal de Alagoas no processo nº 009515/2011-87. Animais que receberam conídios por 1 dia e 3 dias não exibiram alterações no parênquima pulmonar. Porém, houve um aumento significativo na contagem de leucócitos totais após o 5º e 10º dia de estímulo com o conídio. A contagem diferencial dos leucócitos no 3º dia de exposição revelou que a população dos linfócitos no LBA mostrou-se aumentada em 57% quando comparado ao controle. Os monócitos do LBA exibiram um aumento de 46% após o quinto dia. Porém, os neutrófilos somente mostraram-se estatisticamente elevados após o 10º dia de exposição ao conídio. Cortes histológicos do pulmão corados por HE mostraram intensa migração de células polimorfonucleares para a cavidade pleural e na coloração por PAS mostrou-se presença de muco a penas no 5º dia de avaliação. A partir do 3º dia, conídios e hifas no tecido pulmonar mostrou-se intenso. Estes dados mostram que a inalação de conídios de *C.cladosporioides* em baixas concentrações, presentes em ambientes climatizados induz influxo de células inflamatórias para o trato respiratório. No entanto, uma pequena concentração de esporos fúngicos pode ser suficiente para desencadear processos inflamatórios em indivíduos saudáveis.

Palavras-chave: *Cladosporium cladosporioides*. Ambientes climatizados. Reação inflamatória. Análise histológica. Histopatologia.

ABSTRACT

Among the main contaminants of the air of acclimatized environment are fungi bioaerosol, which are widely distributed in the atmosphere. Amongst the species found, many are able to trigger allergic manifestations and diseases in human and animals, such as *Cladosporium cladosporioides*. However, the inflammatory profile of the inflammatory response that these fungi cause, when inhaled by healthy individuals, is not yet totally elucidated. Thus, the aim was to evaluate the action of *Cladosporium cladosporioides* isolated from acclimatized environments on the airways of healthy mice. The air was collected by impaction with Andersen® linear sampler, using petri dishes containing Agar Sabouraud media, for 10 minutes during hours of movement as recommended by the RE N° 9 of ANVISA. The dishes were incubated at 28 °C for the period of five days. After the growth of the colonies, they were cultivated as central colonies and subsequently identified based on macro and microscopic characteristics. After identification, the spores of the studied species were suspended in a saline solution to obtain a concentration of 2×10^5 conidia/mL. Afterwards, 30 µl of this suspension was administered by intranasal pathway in Swiss mice (18–25g, $n = 8$) of both sexes for the periods of 1, 3, 5, 10 and 15 days. The control group consisted of animals who received the vehicle only (0,1% of Tween 80 + NaCl 0,9%). After 24h of the last instillation, the animals were euthanized to obtain a Bronchoalveolar Lavage (BAL). All the procedures to which the animals were submitted were approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Alagoas (UFAL) under the protocol n° 009515/2011-87. Animals that received conidia for 1 day and 3 days did not have modifications on the pulmonary parenchyma. Nonetheless, there was a significant increase on the total leukocytes count after the 5th and the 10th day of stimulus with conidia. The differential leukocytes count on the 3rd day of exposure unveiled that the lymphocytes population of the BAL had an increase of 57% when compared to the control. The monocytes of BAL showed a rise of 46% after the fifth day. Still, the neutrophils only were statistically high after the 10th day of exposure to the conidia. Histological sections of the lung stained with HE demonstrated an intense migration of polymorphonuclear cells to the pleural cavity, and when stained by PAS showed the presence of mucus only on the 5th day of analysis. After the 3rd day, the lung tissue had intense conidia and hyphae. These data show that the inhalation of *C. cladosporioides* conidia in low concentrations, present in acclimatized environments, induces the influx of inflammatory cells to the respiratory tract. Therefore, low concentration of fungi spores can be sufficient to trigger inflammatory reactions in healthy individuals.

Keywords: *Cladosporium cladosporioides*. Acclimatized environments. Inflammatory reactions. Histological analysis. Histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura de conidiação do <i>Cladosporium cladosporioides</i> -----	18
Figura 2 -	Corte histológico de um bronquíolo -----	21
Figura 3 -	Amostrador de ar do tipo Anderson [®] de um estágio -----	24
Figura 4 -	Aspectos macroscópicos dos fungos filamentosos -----	25
Figura 5 -	Aspectos microscópicos dos fungos filamentosos -----	26
Figura 6 -	Câmara de Neubauer -----	27
Figura 7 -	Esquema ilustrativo do desenho experimental para o grupo teste e controle -----	28
Figura 8 -	Leucócitos totais presentes no Lavado Broncoalveolar (LBA) -----	33
Figura 9 -	Efeito dos conídios de <i>Cladosporium cladosporioides</i> no influxo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de camundongos -----	34
Figura 10 -	Efeito dos conídios de <i>Cladosporium cladosporioides</i> no tecido pulmonar de camundongos corados por HE -----	36
Figura 11 -	Efeito dos conídios de <i>Cladosporium cladosporioides</i> na produção de muco e a presença de conídios e hifas no tecido pulmonar de camundongos corados por PAS -----	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
μm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
<i>C.c</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
Cm	Centímetros
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
g	Gramas
GC	Grupo controle
H ₂ CO	Formaldeído
HCL	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina - Eosina
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
I/E	Relação Interno / Externo
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
L/min	Litros por minuto
LAC	Laboratório de Ambientes Climatizados
LACTRIMEL	Agar lactrimel
LBA	Lavado broncoalveolar
m ³	Metro cúbico
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido de nitrogênio
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Ácido periódico de <i>Schiff</i>
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Revoluções por minuto
SED	Síndrome do Edifício Doente
SO ₂	Dióxido de enxofre
TE	Tris / EDTA
TRIS	Hidroximetil amino metano
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFC/M ³	Unidade Formadora de Colônia por metro cúbico de ar
UV	Radiação ultravioleta

Obs. As abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	Ambientes climatizados	14
3.2	Fungos anemófilos e agravos à saúde	16
3.3	Gênero <i>Cladosporium</i>	17
3.4	A Espécie <i>Cladosporium cladosporioides</i> e sua distribuição	18
3.5	<i>C. cladosporioides</i> como patógeno emergente	19
3.6	Vias respiratórias.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Local do estudo.....	23
4.2	Coleta das Amostras.....	23
4.3	Quantificação e identificação de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	25
4.4	Cultivo e preparo do inóculo de <i>C. cladosporioides</i>	27
4.5	Animais.....	28
4.6	Desenho experimental.....	28
4.7	Instilação intranasal.....	29
4.8	Obtenção do Lavado Broncoalveolar	29
4.9	Análise histopatológica	30
4.10	Análise estatística.....	31
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Identificação de <i>C. cladosporioides</i> pelo método convencional.....	32
5.2	Avaliação da resposta inflamatória no lavado broncoalveolar	32
5.3	Análise histopatológica	35
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÕES.....	42
8	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento do uso de condicionadores de ar, os ambientes climatizados artificialmente tornaram-se uma importante área de pesquisa. De acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde (OMS), locais fechados como escolas, cinemas, residências e hospitais podem ter má qualidade do ar. A baixa qualidade ocorre principalmente pela má higienização dos aparelhos de ar condicionado e pela falta de controle periódico sobre as possíveis fontes de contaminação. Pelo fato das taxas de renovação de ar não estarem sendo satisfatório, o ar recirculado no ambiente proporciona a colonização de microrganismos, sendo estes ambientes influenciados por variações da temperatura, umidade relativa e velocidade do ar (SCHIRMER et al., 2011; SOUZA et al., 2013).

Entre os principais grupos de contaminantes do ar de ambientes climatizados estão as partículas microbianas, incluindo fungos, bactérias e vírus. Os fungos isolados com maior frequência nestes ambientes pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Helminthosporium* e *Trichoderma* (AQUINO et al., 2013). Os causadores de manifestações alérgicas no homem pertencem aos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Candida*, *Aureobasidium* e *Curvularia* entre outros, tornando-se elementos especialmente alergizantes, fator este bastante preocupante à clínica médica, dos quais os mesmos encontram-se dispersos abundantemente no meio ambiente (SOUZA et al., 2013)

Os propágulos fúngicos são encontrados em grande concentração nos mais variados locais, especialmente em ambientes úmidos, o que resulta muitas vezes em sensibilização dos indivíduos atópicos. Por essa razão os fungos anemófilos estão considerados entre os mais ubíquos aeroalérgenos, desempenhando um importante papel na etiologia das alergias das vias respiratórias (HASNAIN et al., 2012).

Entre os vários gêneros predominantes em ambientes climatizados destaca-se *Cladosporium* como um dos mais frequentes. Os conídios de *Cladosporium*, são bem adaptados para se espalharem facilmente em longas distâncias (ZOPPAS et

al., 2012; ZUKIECZ-SOBCZAK, 2013). Dentre as mais variadas espécies presentes no gênero, *Cladosporium cladosporioides* apresenta-se com relevância médica podendo afetar gravemente pessoas asmáticas, causar micoses, infecções pulmonares e reações alérgicas. (LORENTE et al., 2012; BENSCH et al., 2010). A contaminação por essas partículas poderá resultar em desconforto, perda de produtividade e absenteísmo, entre outras (FAIRS et al., 2010 HASNAIN et al., 2012).

É válido destacar que, respiramos cerca de 20 mil vezes por dia e o ar climatizado artificialmente pode ser prejudicial à saúde. A redução drástica da captação do ar externo resulta em aumento da concentração de poluentes biológicos no ar interno, fazendo com que a taxa de renovação seja insuficiente. Com isso, altas concentrações de microrganismos nos ductos de ar condicionado favorecem a proliferação desses agentes podem comprometer a qualidade de vida das pessoas, principalmente as que são mais vulneráveis à contaminação, como aquelas que têm problemas respiratórios (ADAMS et al., 2013; MENDES et al., 2013).

Os ambientes hospitalares climatizados merecem destaque, pois a concentração e dispersão desses microrganismos pelo ar constituem importantes fontes de infecção principalmente em áreas de alto risco como UTIs, salas de cirurgias, unidade de transplantados e de pacientes com infecção de alto risco de contágio, caso a qualidade do ar destes ambientes não apresentarem conformidade com os parâmetros estabelecidos pela resolução nº 9 de janeiro de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

Os resultados deste trabalho deverão contribuir de forma relevante para a determinação de normas e valores de referência para a presença de fungos filamentosos por parte dos órgãos de saúde na questão dos parâmetros adotados pela ANVISA no que se refere aos bioaerossóis de ambientes climatizados, sejam eles hospitalares ou não, antecipando medidas mitigadoras que contribuam para diminuição dos índices de infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação de suspensões do fungo *Cladosporium cladosporioides*, isolados de ambientes climatizados de uso público e coletivo e seus efeitos sobre as vias respiratórias de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a resposta inflamatória por infiltração dos leucócitos para o parênquima pulmonar de camundongos submetidos as suspensões de esporos do fungo *C. cladosporioides*.
- b. Avaliar por parâmetros microscópicos a caracterização morfológica das lesões nos pulmões estudados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ambientes climatizados

O funcionamento do sistema de um condicionador de ar baseia-se na mistura do ar que retorna dos ambientes climatizados com o ar externo, posterior filtração e condicionamento térmico, para ser novamente insuflado para os ambientes interiores. Atualmente, as pessoas passam grande parte do tempo em ambientes confinados afastados da iluminação e ventilação natural. Esses ambientes artificialmente climatizados proporcionam temperatura ideal gerando conforto, produtividade e bem estar para os indivíduos (SANTANA, FORTUNA, 2012).

O sistema de ar condicionado são ambientes complexos, destinados a conter inúmeras substâncias potencialmente prejudiciais como partículas alergênicas (pólen de plantas, fungos, pelos de animais, ácaros e algas) e substâncias químicas (CO_2 , CO, SO_2 , NO, NO_2 , H_2CO , HPA, O_3) (BHATIA, 2011; VICHIT-VIDAKAN, VAJANAPOOM, 2011; OMS, 2011).

Bioaerossóis são partículas em suspensão (vírus, bactérias e fungos) ou de origem em organismos vivos (pólen, pelos, partes de insetos) também conhecidos como pó orgânico. Estão presente no ar, em função de sua dispersão a partir de um local de colonização ou crescimento, contribuindo com cerca de 5-34% da poluição do ar interior. Estes contaminantes biológicos podem reproduzir na água acumulada em ductos de ar condicionado, umidificadores, telhas ou carpetes úmidos, entre outros. As condições necessárias ao crescimento de microrganismos em ambientes climatizados podem ser oferecidas pela ventilação inadequada e o conseqüente acúmulo de umidade no interior dos recintos (BHATIA, 2011).

O interesse na exposição à bioaerossóis tem aumentado ao longo das últimas décadas, principalmente porque é reconhecido que a exposição a agentes biológicos, tanto no ambiente ocupacional como no residencial, está associada a uma ampla gama de efeitos adversos para a saúde dos indivíduos, tais como: efeitos tóxicos agudos, alergias e câncer (ROCHA et al., 2010).

A exposição a elevados níveis de esporos fungicos podem resultar em sintomas generalizados como: dificuldades respiratórias, irritação, coceiras nos olhos e nariz que dependendo das condições físicas (ventilação, umidade relativa e temperatura do ar) do ambiente, podem estar contribuindo para o surgimento ou agravamento de alergias respiratórias. (FONSECA-JUNIOR et al., 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Síndrome do Edifício Doente (SED) descreve uma condição médica em que os ocupantes de um determinado edifício sofrem de sintomas de doença ou se sentem mal sem haver motivo aparente para isto. Os sintomas ligados à SED são rinite, congestionamento nasal, garganta seca, lacrimejamento, irritação ou ressecamento ocular, irritação na pele, eritema, sonolência e cefaleia. Suas causas podem ser explicadas por um conjunto de fatores, dentre estes a insuficiência do ar exterior, má distribuição do ar, controle deficiente de temperatura, aerodispersóides (poeira) e bioaerossóis (fungos, bactérias, vírus), contaminantes químicos entre outros (SILVA et al., 2012; BRASIL, 2003).

A Resolução N° 9 publicada pela ANVISA em 2003, juntamente com a Portaria nº 3.523/98 do Ministério da Saúde apresentam medidas básicas e procedimentos de limpeza e manutenção dos sistemas de climatização para assegurar a qualidade do ar de interiores climatizados. Resolução RE N°9/ANVISA 2003 estabeleceu os padrões referenciais para a qualidade do ar de ambientes climatizados de uso público e coletivo. A legislação em vigor estabelece que a contagem total máxima de fungos filamentosos deve ser 750 UFC/m³ de ar e que a relação entre as contagens de microrganismos no ar interno e no ar externo não deve ser superior a 1,5. Este parâmetro estaria relacionado ao fato de que valores muito elevados da relação Interno/Externo (I/E) indicam a presença de fontes poluidoras no interior do prédio, que devem ser pesquisadas.

O fungos de dispersão aérea são capazes de colonizar diferentes substratos e habitat de forma eficiente, sobrevivem a grandes variações de temperatura, pH, baixa taxa de umidade e baixas concentrações de oxigênio, sendo comum em ambientes interiores climatizados (FLORES, ONOFRE 2010; CHAUDHARY, MARR, 2011).

3.2 Fungos anemófilos e agravos à saúde

Os fungos que possuem dispersão aérea são denominados anemófilos, fazem parte do ecossistema aerobiológico e apresentam-se em grandes quantidades, tendo em vista sua grande capacidade de colonizar diferentes substratos e crescer em condições ambientais extremas (ZOPPAS et al., 2012). Estão entre os organismos ecologicamente mais importantes do mundo, com aproximadamente 1,5 milhões de espécies, das quais menos de 100 mil já foram descritas (ORGIAZZI et al., 2012). São organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, uni ou multicelulares que se reproduzem sexuada ou assexuadamente, de natureza ubíqua. Em sua maioria são aeróbios, podendo ser anaeróbios facultativos, apresentando temperatura ideal para seu crescimento de 25 a 30°C. Algumas espécies produzem estruturas de resistência (esporos) e sobrevivem a condições extremas de temperatura (LANG-YONA et al., 2012).

A dispersão dos esporos na natureza é feita por várias vias: animais, homem, inseto, água e, principalmente, pelo ar atmosférico, através dos ventos. A maioria dos esporos são de 2 a 10 µm de tamanho podendo facilmente penetrar as vias aéreas inferiores desempenhando um papel importante nas alergias que, quando inalados, podem ser responsáveis por manifestações respiratórias alérgicas, como a asma, rinite, doenças que afetam os pulmões e alvéolos. Atualmente, mais de 100 gêneros de fungos têm sido documentados como fonte de alergenos (FAIRS et al., 2010; BACKES et al., 2011; HASNAIN, 2012). Várias espécies de fungos anemófilos apresentam grande importância para a qualidade do ar dos ambientes interiores, entre eles encontram-se os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, entre outros, tornando-se elementos especialmente patogênicos, toxigênicos e alergizantes, fato este bastante preocupante à clínica médica, além de serem os mais comumente isolados de ambientes interiores climatizados artificialmente (HUSSUN, CAL et al., 2011)

3.3 Gênero *Cladosporium*

Em um levantamento dos gêneros predominantes em alguns ambientes climatizados verificou-se a superioridade de *Cladosporium* sp. O gênero, criado por Link em 1815, é um dos maiores e mais heterogêneos, compreende mais de 50 espécies de maior concentração na atmosfera. São fungos de crescimento lento a moderado, atingindo a maturidade dentro de 21 dias. Caracteriza-se pela produção de colônias ocasionalmente puntiformes, com superfícies planas, aveludadas e enrugadas, que vão do verde oliva ao marrom escuro e reverso preto. Os conídios de *Cladosporium* sp são pigmentados, ovais de parede lisa (Figura 1), formados a partir de hifas e conidióforos ramificados (ZOPPAS et al., 2012; BENSCH et al., 2012). Em cortes histológicos se apresentam como grandes células redondas, septadas e escuras, com 5 a 12 µm de diâmetro (BENSCH et al., 2012).

As espécies mais isoladas do gênero são *Cladosporium herbarum*, *C. fulvum*, *C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, *C. carrionii* e *C. oxysporum*. Poucas espécies têm sido documentadas como agente de infecção micótica em humanos (*C. carrionii*), sendo responsável por causar infecção de pele, unha e cromomicose assim como infecções pulmonares e sinusite (ZOPPAS et al., 2012; ADAMS et al., 2013; RIBEIRO, 2011). Espécies de *Cladosporium* secretam vários metabólitos secundários tais como a micotoxina cladosporina, a principal micotoxina produzidas por *C. cladosporioides* (OGOREK et al., 2012).

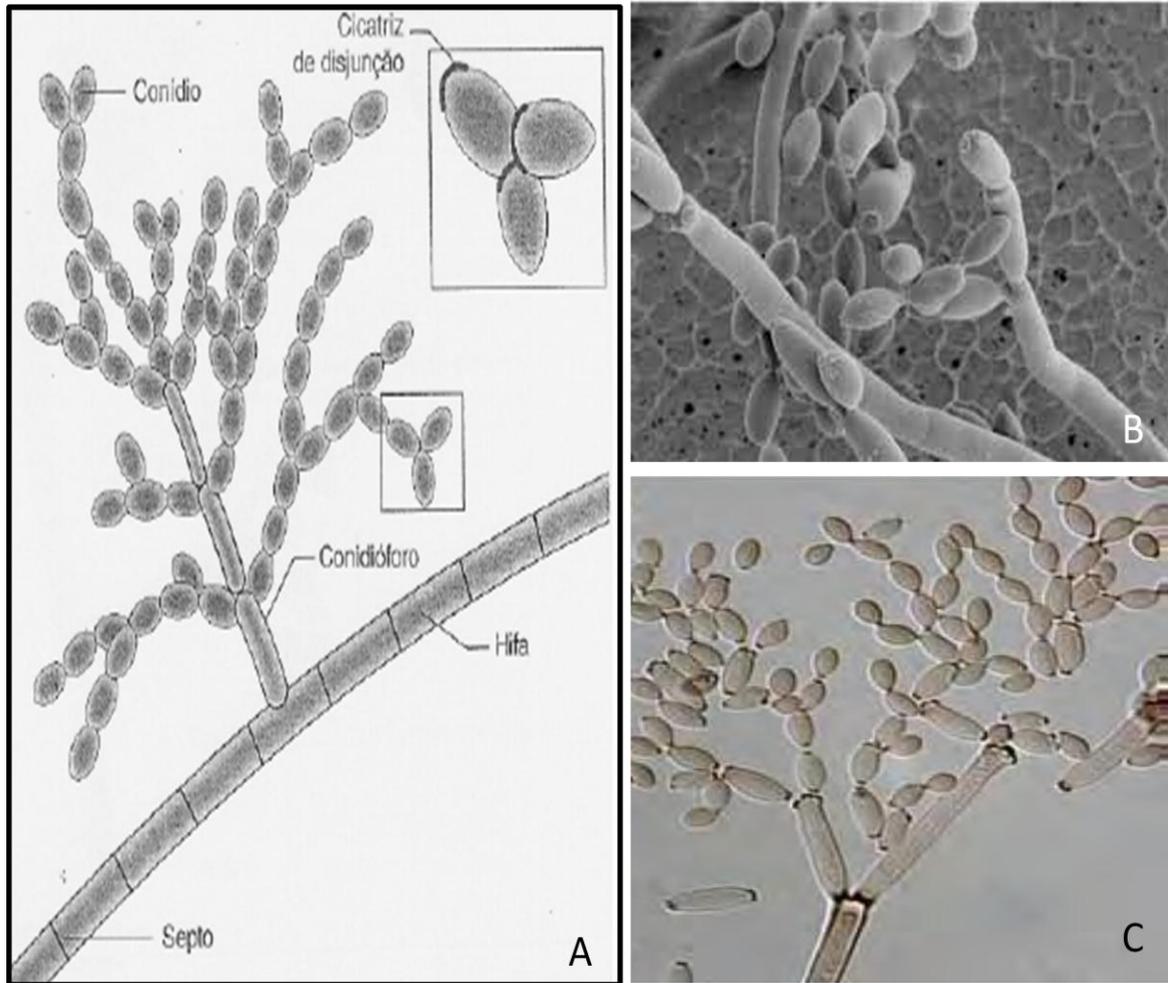


Figura 1 - Estrutura de conidiação do *Cladosporium cladosporioides* com hifas septadas, conidióforos laterais produzindo cadeias longas de conídios ovais de parede lisa e fina (A). (B) Microscopia eletrônica de varredura 5 μm . (C) Microscopia óptica 10 μm .

Fonte: Adaptado de BENSCH et al., 2010; FISHER, COOK, 2001.

3.4 A Espécie *Cladosporium cladosporioides* e sua distribuição

A espécie *C. cladosporioides* são encontrados como saprófitas, isolados do ar, solo e de vários substratos. São contaminantes do ar e alimentos, com função biológica importante na decomposição de matéria orgânica. É considerado um fungo endofítico e entomopatogênico de ocorrência natural, também usado amplamente no controle biológico, com importante função na decomposição de matéria orgânica e forte competidor com outros microrganismos (ADAMS et al., 2013; OLIVEIRA, 2011).

As características distintivas que mais auxiliam na identificação da espécie são colônias de textura aveludada ou flocosas, apresentando coloração verde-oliva ao marrom-esverdeado. Hifas ligeiramente ramificadas, presença de cicatrizes proeminentes nos conídios unicelulares, elipsoides ou limoniformes. Os conídios desta espécie estão entre os bioaerossóis mais presentes, encontrados em amostras de ambientes interiores e exteriores (OGOREK et al., 2012; BENSCH et al., 2012).

Está amplamente distribuído no ar em ambientes climatizados, envolvidos em várias infecções pulmonares, cutâneas e problemas relacionados ao sistema respiratório, frequentemente associado a queixas asmáticas que afligem mais de 10% das crianças e adultos no mundo, (LORENTE et al., 2012; MENEZES, 2012; OGOREK et al., 2012). A espécie tem sido observada como responsável primária por quadro de feo-hifomicose superficial (onicomicose, ceratites), cromoblastomicoses e feo-hifomicose profunda (meningite, quadros pulmonares) (DE HOOG et al., 2000; MENEZES, 2012).

3.5 *C. cladosporioides* como patógeno emergente

Os principais fatores que contribuem para a proliferação do fungo são índices elevados de temperatura e umidade do ar. A alta exposição deste microrganismo em ambientes fechados tem sido relacionada a efeitos adversos a saúde como dor de cabeça e alergias, resultando em infecções respiratórias, doença pulmonar e asma (MENEZES, 2012).

O ser humano inala em média 10 m^3 de ar por dia, contendo esporos de 3 a $30 \text{ }\mu\text{m}$ de tamanho. Aproximadamente, esporos de *C. cladosporioides* medem $5 \text{ }\mu\text{m}$, sendo facilmente dispersos no ar e transportados para as vias aéreas e pulmões, onde as reações alérgicas se manifestam. As alergias causadas pelo fungo podem ser graves dependendo da concentração de esporos inalados. Também podem causar infecções oportunistas, relacionado principalmente a pessoas com o sistema imunológico comprometido (OGOREK et al., 2012).

Os esporos presentes no ambiente interior não são suficientes para causar danos à saúde, são necessário mudanças no equilíbrio entre o fungo e o hospedeiro como a imunidade do indivíduo, dimensão dos esporos e exposição contínua (ZOPPAS et al., 2012).

3.6 Vias respiratórias

O ar inspirado é conduzido pelo sistema respiratório por meio de condutos, denominados vias aéreas e se dividem entre o ramo superior (narinas e/ou boca, faringe, laringe e traqueia) e inferior (brônquios, bronquíolos, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos) (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013). As funções do sistema respiratório incluem equilíbrio ácido-base, fonação, defesa, metabolização e, principalmente, a realização de trocas gasosas (AOKI, 2013).

A estrutura das vias aéreas é formada por uma mucosa respiratória superficial e profunda. A superficial é classificada como epitélio cilíndrico ciliado pseudoestratificado, em sua maioria, mas também apresentando células caliciformes e células basais. A profunda (lâmina própria) é formada por tecido conjuntivo frouxo contendo numerosos capilares e glândulas (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013).

A traqueia bifurca-se nos brônquios principais subdividindo-se em ramos. Cada geração desses ramos mais profundos torna-se sucessivamente mais curta e mais estreita. De dentro para fora, as paredes brônquicas consistem de epitélio respiratório, com menos células caliciformes que na traqueia, sobrejacentes a uma lâmina própria que fica sobre faixas cruzadas de músculo liso, abrangendo a muscular da mucosa, sob a qual está uma camada submucosa com menos glândulas seromucosas que na traqueia, e revestindo cartilagem hialina, esta circundada por uma camada adventícia difusa de tecido conectivo fibroso. Com a diminuição dos bronquíolos devido as ramificações, as placas cartilaginosas tornam-se menores e desaparecem, quando então o ramo é designado bronquíolo. A espessura do epitélio bronquiolar muda do proximal para o distal, passando de um epitélio colunar pseudoestratificado (onde a via área é mais larga) ciliado para um

epitélio colunar simples ciliado e então para um epitélio cuboide simples ciliado (onde a via aérea é mais estreita) (MESCHER, 2010) (Figura 2).

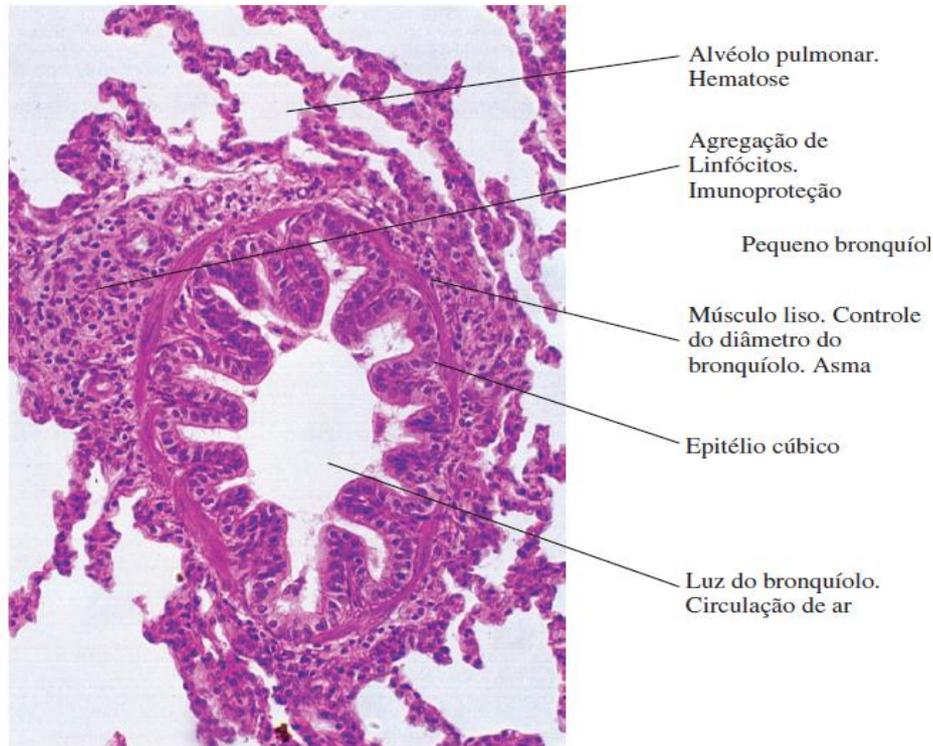


Figura 2 - Corte histológico de um bronquíolo

Corte de um bronquíolo corado com hematoxilina e eosina (H.E)

Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2004

Os ductos alveolares surgem dos bronquíolos respiratórios distais, e sua parede geralmente parece ser constituída por duas fileiras de aberturas nos alvéolos adjacentes, separadas por pilares de músculo liso e elastina, que funcionam como delgados esfíncteres e mantêm a integridade estrutural. Os ductos e alvéolos são revestidos por epitélio escamoso simples, composto de pneumócitos do tipo I, essas células são unidas uma a outra e às células do epitélio alveolar por junções oclusivas, além disso, suas membranas estão fundidas á membrana basal das células endoteliais dos capilares, ocorrendo a troca de gás mais difusa (ROSS; PAWLINA, 2011). Os pneumócitos tipo II secretam surfactante, uma mistura de fosfolipídeos e proteínas que reduz a tensão da superfície e promove estabilidade alveolar com baixos volumes pulmonares (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013).

Alergia respiratória é resultante de uma resposta inflamatória mediada por IgE que resulta em inflamação crônica das vias aéreas. Desta forma, a rinite alérgica é caracterizada por um infiltrado inflamatório nasal multicelular, com predomínio de mastócitos, linfócitos T e eosinófilos. Esta resposta celular ocorre em indivíduos previamente sensibilizados aos aeroalérgenos, e inclui quimiotaxia, recrutamento seletivo e migração transendotelial de células. Com libertação de citocinas (interleucinas 3, 4, 5 e 13) e quimiocinas (eotaxina, RANTES), além da ativação de células estruturais (endoteliais, epiteliais e do interstício da via aérea), que também participam expressando moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1) e produzindo mediadores importantes na inflamação. As principais células envolvidas na resposta inflamatória mediada por IgE são células apresentadoras de antígenos, mastócitos, linfócitosTh2, linfócitos B e eosinófilos (SILVA, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

As coletas foram realizadas em ambientes climatizados de uso público e coletivo nos períodos de maior circulação de pessoas, inclusive ambientes hospitalares e pontos externos em Maceió-Alagoas. Após as coletas as placas foram transportadas ao Laboratório de Ambientes Climatizados - LAC do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS/UFAL, para o crescimento, quantificação, isolamento, purificação e identificação. Os ensaios biológicos com animais foram realizados no Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Química da Universidade Federal de Alagoas.

4.2 Coleta das Amostras

Foi utilizado um amostrador de ar por impactação do tipo Andersen® de um estágio da marca Energética, com impactação em placas de Petri de 90 X 10 mm contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose a 4% e 50 mg.L⁻¹ de cloranfenicol para inibição do crescimento de bactérias. O impactador foi posicionado no centro dos ambientes analisados a 1.5 metros de altura do solo com vazão fixa de 28,0 L/min durante 10 minutos, totalizando 280 litros de ar para cada amostra como preconizado pela RE N° 9 ANVISA / 2003. Após cada coleta as placas foram vedadas com um parafilme, identificadas e conduzidas ao laboratório (Figura 3).



Figura 3 - Amostrador de ar do tipo Anderson® de um estágio

(A) Amostrador de ar no ambiente analisado. (B) Placa de Petri com meio Ágar Sabouraud Dextrose. (C) Placas de cultura acopladas ao impactador. (D) Após impactação por 10 min. (E) Placas vedadas por parafilme, identificadas por local e transportadas para a LAC-ICBS para incubação por 5 dias.

4.3 Quantificação e identificação de *Cladosporium cladosporioides*

As placas coletadas foram incubadas a 28°C em estufa, por um período de cinco dias para o desenvolvimento dos fungos filamentosos. Após crescimento as colônias, estas foram quantificadas como unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³) (Figura 4A). Passado o período de incubação, foi observada visualmente, a ocorrência de colônias fúngicas de interesse para o presente estudo e providenciada a repicagem da colônia, baseado nas características do gênero. Posteriormente, o isolado foi purificado através de cultura central em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Figura 4B). O fungo isolado foi identificado com base nas características macro e microscópicas da colônia como cor, superfície e textura do verso e reverso, através de chaves de identificação segundo De Hoog et al. (2000). Os critérios de escolha da espécie foram baseados em sua ampla distribuição em ambientes climatizados e na ausência de estudos sobre a patogenicidade em modelos biológicos com camundongos.



Figura 4 - Aspectos macroscópicos dos fungos filamentosos

(A) Crescimento de Fungos filamentosos após 5 dias de incubação. Seta representa o gênero *Cladosporium* sp isolado. (B) Isolamento e Característica macroscópica (Verso). (C) Reverso de *C. cladosporioides*.

Para as observações das características microscópicas, foi realizada a técnica de microcultivo descrita de Ridell (1950). Este procedimento consistiu na inoculação do fungo sobre um pequeno bloco de meio Ágar Lactrimel sobre uma lâmina de vidro no interior de uma placa Petri de 100x10 mm esterilizada (Figura 5A). Após inoculação do isolado o bloco de meio foi coberto por uma lamínula de 22x22 mm. O papel filtro no interior da placa foi umedecido com 1 mL de água destilada esterilizada e a placa incubada em estufa, a 28°C por 7 dias. Após a incubação, a lamínula foi retirada e colocada sobre uma lâmina contendo corante Lactofenol Azul de Algodão. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio óptico em aumento de 40X e 100X para a visualização das características estruturais e reprodutivas do fungo (Figura 5B). A espécie fúngica foi identificada através de suas características morfológicas seguindo os critérios adotados nas chaves de identificação De Hoog et al., (2000). As amostras identificadas foram preservadas em água destilada pelo segundo método Castellani (1939).

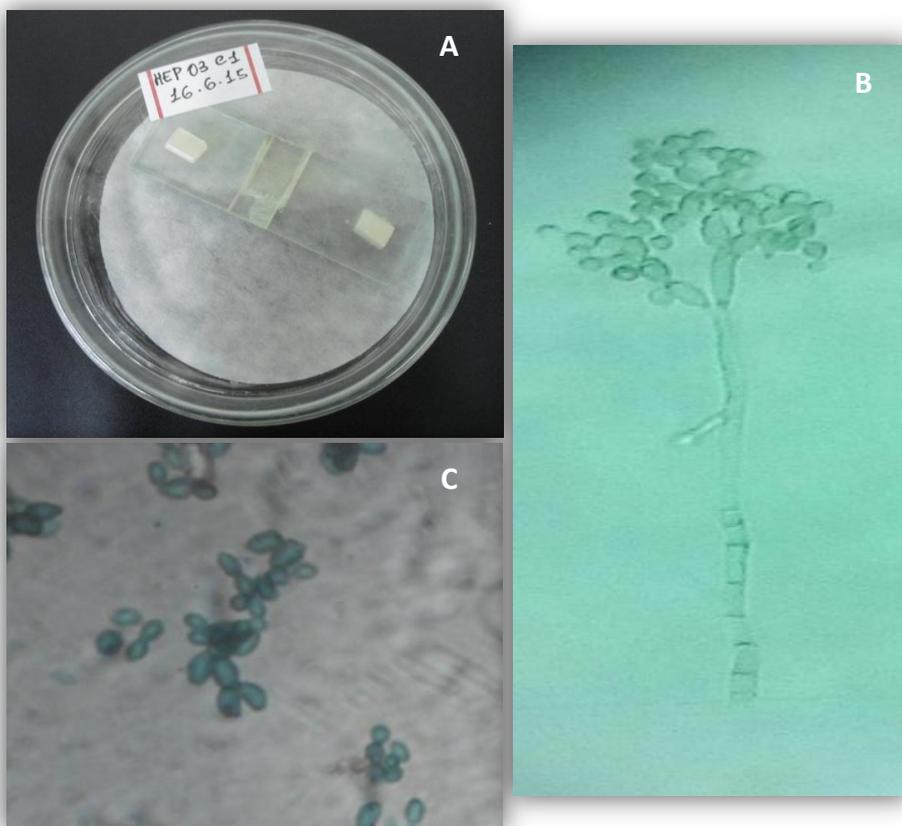


Figura 5 - Aspectos microscópicos dos fungos filamentosos
(A) Microcultivo de Ridell. (B) Característica microscópica de *Cladosporium cladosporioides* (100X). (C) Conídios.

4.4 Cultivo e preparo do inóculo de *C. cladosporioides*

Esporos de *C. cladosporioides* foram semeados em meio Ágar Sabouraud Dextrose a 4% por 10-15 dias em temperatura de 28°C. Posteriormente foram coletados assepticamente e transferidos em solução salina (NaCl 0.9% acrescido de 0.1% de Tween 80). A suspensão de conídios foi transferida para tubos de ensaio esterilizados, agitados em Vortex, e a turbidez ajustada para 0,5 da escala McFarland correspondendo a aproximadamente 10^6 conídios/mL. A concentração final foi obtida pela leitura dos conídios em câmara de Neubauer (Figura 6), ajustando-se para 2×10^5 segundo Hogaboam et al. (2000). A contagem do n° de conídios/mL foi dada pela fórmula: $\text{conídios/mL} = n \times 25 \times 10^4$, onde:

n = número médio de conídios contados por campo

25 = número de quadrantes na câmara

10^4 = fator da câmara

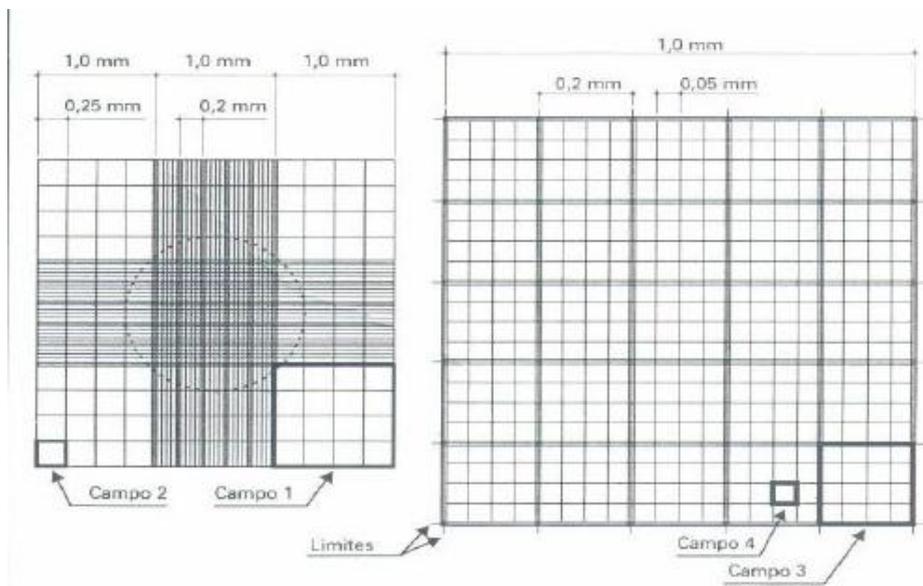


Figura 6 - Câmara de Neubauer

Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem

Fonte: Adaptado de Oliveira, 2011

4.5 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) de ambos os sexos, pesando entre 18-30g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BioCen-UFAL) com três meses de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperaturas controladas, em torno de 24°C, em ciclo claro/escuro de 12h com livre acesso a ração tipo *pellets* (Presence - Purina®) e água. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alagoas (Licença nº 009515/2011-87).

4.6 Desenho experimental

Foram incluídos no estudo 80 camundongos os quais foram distribuídos em cinco grupos experimentais como: **Grupo 1** - Controle (GC), composto de 8 animais expostos à solução salina, e *C. cladosporioides* (Cc), composto de 8 animais submetidos à instilação intranasal de esporos de *C. cladosporioides*, avaliados 24 horas após a instilação (1 dia); **Grupo 2** - Controle (GC), composto de 8 animais expostos à solução salina, e *C. cladosporioides* (Cc), composto de 8 animais submetidos à instilação intranasal de esporos de *C. cladosporioides*, avaliados 72 horas após a instilação (3 dias); **Grupos 3, 4 e 5** foram compostos pelos mesmos números de animais, avaliados respectivamente 24 horas após o 5º, 10º e 15º dias da instilação (Figura 7).

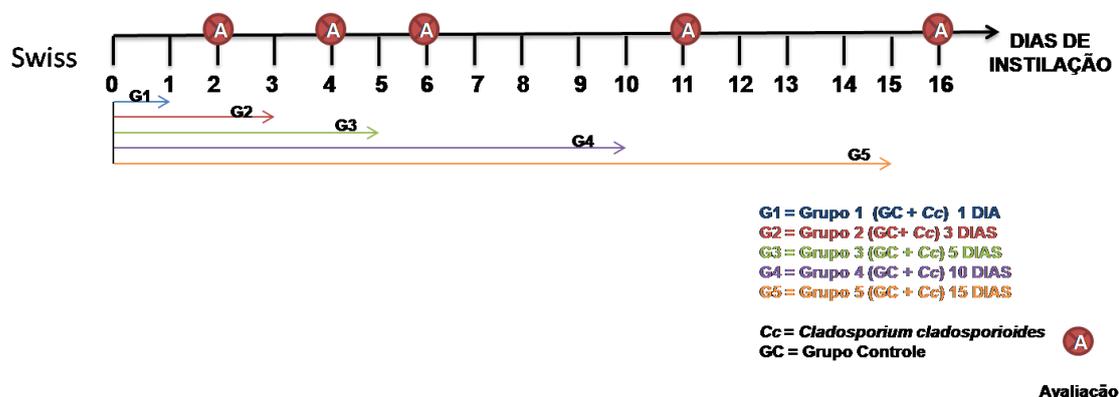


Figura 7 – Esquema ilustrativo do desenho experimental para o grupo teste e controle.

4.7 Instilação intranasal

As instilações foram realizadas uma vez por dia para cada animal, e avaliados 24 horas após a última instilação. Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (5 mg/kg Anasedan®) e cetamina (35 mg/kg Dopalen®) para a administração intranasal de 30µl de *C. cladosporioides* contendo 2×10^5 conídios/mL. O grupo controle foi instilado com o mesmo volume de solução salina (NaCl, 0,9% e 0,1% de Tween 80).

Após a última instilação os animais de cada grupo foram mantidos na posição vertical durante dois minutos para permitir a instilação completa da dose e posterior recuperação anestésica. Em seguida, foram recolocados nas gaiolas e mantidos em observação até o momento da avaliação. Os testes foram realizados em animais imunocompetentes e durante o período experimental, os animais não apresentaram alterações patológicas visíveis ou de comportamento.

4.8 Obtenção do Lavado Broncoalveolar

Os animais foram eutanasiados 24 horas após a última instilação de cada grupo e foi realizado o lavado broncoalveolar (LBA) através da exposição da traqueia e inserção de uma cânula de polietileno conectada a uma seringa de 1 mL. O pulmão foi lavado com PBS/EDTA 10mM e o líquido recolhido foi centrifugado a 1500rpm por 10 minutos a 5°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi aliquotado e armazenado em freezer de ultrabaixa temperatura -80°C. As células concentradas no tubo foram ressuspensas em PBS e diluídas na solução de Turk (1:5) para a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer por microscopia óptica (x20) (BX4, OLYMPUS). Uma amostra de 100 µl dessas células foi utilizada para o preparo de citoesfregaços, as lâminas foram posteriormente coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa para a contagem diferencial das células baseado nos critérios normais de morfologia, classificando como eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos com o auxílio de um microscópio óptico com ampliação de x100 (BX41, OLYMPUS).

4.9 Análise histopatológica

Para a análise morfológica, os pulmões dos animais de todos os grupos após 24 horas da última instilação foram perfundidos via ventrículo direito com solução salina contendo EDTA 10mM e fixados com solução de BUAN por 24h. Os pulmões foram desidratados por concentrações crescentes de etanol, clarificados por xilol e incluídos em parafina. Em seguida, o material parafinado foi levado ao micrótomo e realizado cortes de 5µm. Os cortes em seguida foram desparafinados por xilol, reidratados por concentrações decrescentes de etanol e submetidos a colorações para avaliação estrutural (Hematoxilina-Eosina), produção de muco e presença de conídios e hifas (Ácido Periódico de Schiff - PAS). O processamento histológico e as colorações foram realizados na Plataforma de Histologia do Setor de Histologia e Embriologia da UFAL.

Fotomicrografias de 10 campos aleatórios por lâmina foram realizadas usando câmera digital (DP25, OLYMPUS) adaptada ao microscópio (20x) (BX41 OLYMPUS) para analisar as alterações histológicas presentes de inflamação peribrônquica. As análises foram descritas de forma semi-quantitativa seguindo os critérios: 0 – normal; 1 – poucas células; 2 – um anel de células inflamatórias com profundidade de 1 célula; 3 – um anel de células inflamatórias com profundidade de 2-4 células; 4 – um anel de células inflamatórias com profundidade maior que 4 células, caracterizando a inflamação em: Perialveolar, peribrônquica/bronquíolo, nos septos ou subpleural como descrito por Myou et al. (2003).

Para avaliar os níveis de produção de muco no pulmão e a presença de conídios e hifas, fotomicrografias de 10 campos aleatórios por lâmina foram realizadas usando câmera digital (DP25, OLYMPUS) adaptada ao microscópio (40x) (BX41 OLYMPUS). Realizou a determinação da produção de muco através do reconhecimento da cor relativa às estruturas de interesse (muco) e a presença de conídios e hifas foram descritas de forma semi-quantitativa seguindo os critérios: 0 – Negativo, 1 – Discreto, 2 – Moderado e 3 – Intenso.

A análise quantitativa das imagens foi realizada através do programa ImageJ® 1.47 (*National Institutes of Health* (NIH) - EUA).

4.10 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Comparação estatística entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) e do teste *t* de Student. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de $p < 0,05$ usando o programa *GraphPad Prism*[®] 5.0 (Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de *C. cladosporioides* pelo método convencional

Colônias de *Cladosporium* após um período de incubação de 10 dias em meio Agar Sabouraud a 25°C apresentaram margens em tons de verde-oliva até marrom-esverdeado em textura aveludada (Figura 4B e C). As características microscópicas mais distintivas dessa espécie são células conidiogênicas de coloração verde-oliva-marrom, conidióforo terminal, ramificado, liso, sem nódulos decorrentes de hifas ascendentes. Cicatriz proeminente nos conídios cilíndricos e elipsoides, podendo apresentar até 2 septos. Características baseadas pela chave de identificação de Hoog et al. (2000) (Figura 5B e C).

5.2 Avaliação da resposta inflamatória no lavado broncoalveolar

A instilação intranasal com conídios de *C. cladosporioides* em camundongos aumentou o número de leucócitos totais no Lavado Bronco alveolar (LBA) após o 1°, 3°, 5° e 10° dias, quando comparado com o grupo controle. A administração dos conídios no 1° e 3° dia após a instilação não resultou em diferença significativa no total de leucócitos recrutados para a cavidade pleural quando comparado com o grupo controle. Ocorreu um maior recrutamento de leucócitos, estatisticamente significativo, no 5° dia (de $1,16 \pm 0,37$ para $1,68 \pm 0,39 \times 10^6$ células/cavidade) e 10° dia (de $1,85 \pm 0,40$ para $3,08 \pm 0,57 \times 10^6$ células/cavidade) após instilação (Figura 8).

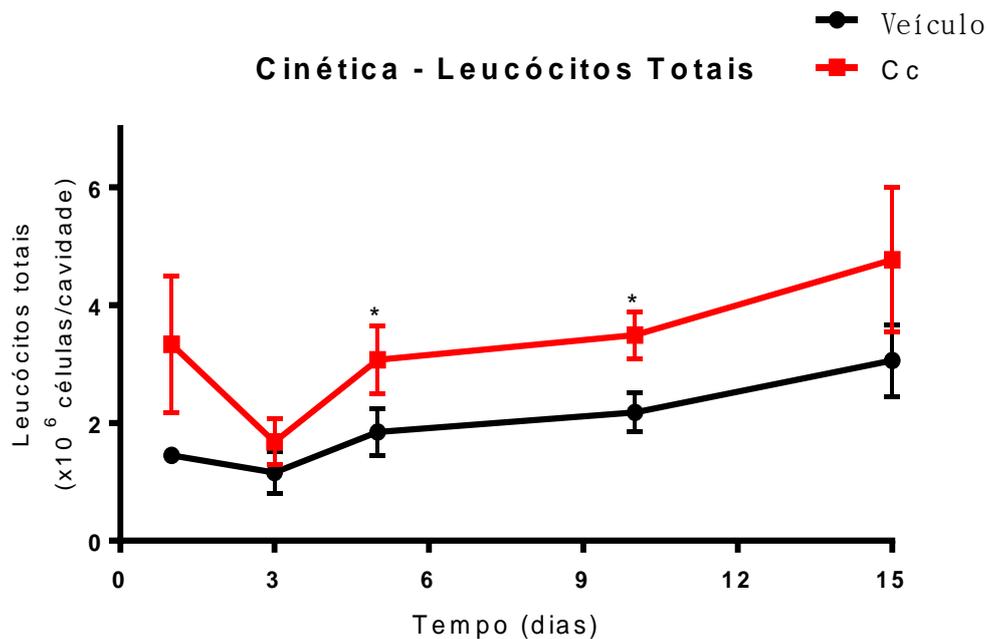


Figura 8 – Leucócitos totais presentes no lavado broncoalveolar (LBA)

Após 24h, 3, 5, 10 e 15 dias de instilação, contagem total de leucócitos presente no Lavado Bronco Alveolar de camundongos com 2×10^5 conídios de *Cladosporium cladosporioides*. Dados apresentados por média \pm E.P.D. de 6 animais. * $p < 0,05$ comparados com o grupo controle. Analisados por POST-HOC de TUCKEY-RAMER.

Como apresentado na Figura 9, a instilação intranasal da suspensão fúngica por 10 dias consecutivos, induziu aumento significativo (***) do número de neutrófilos no LBA (de $0,57 \pm 0,11$ para $2,90 \pm 1,18 \times 10^6$ células/cavidade), quando comparados com seus respectivos controles. Após 3 dias de instilação, observou-se um aumento significativo de linfócitos (de $0,11 \pm 0,03$ para $0,26 \pm 0,06 \times 10^6$ células/cavidade) e monócitos a partir do 5º dia (de $0,42 \pm 0,09$ para $1,07 \pm 0,21 \times 10^6$ células/cavidade), quando comparado com animais do grupo controle. Os eosinófilos presente nos pulmões dos animais submetidos aos conídios *C. cladosporioides* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

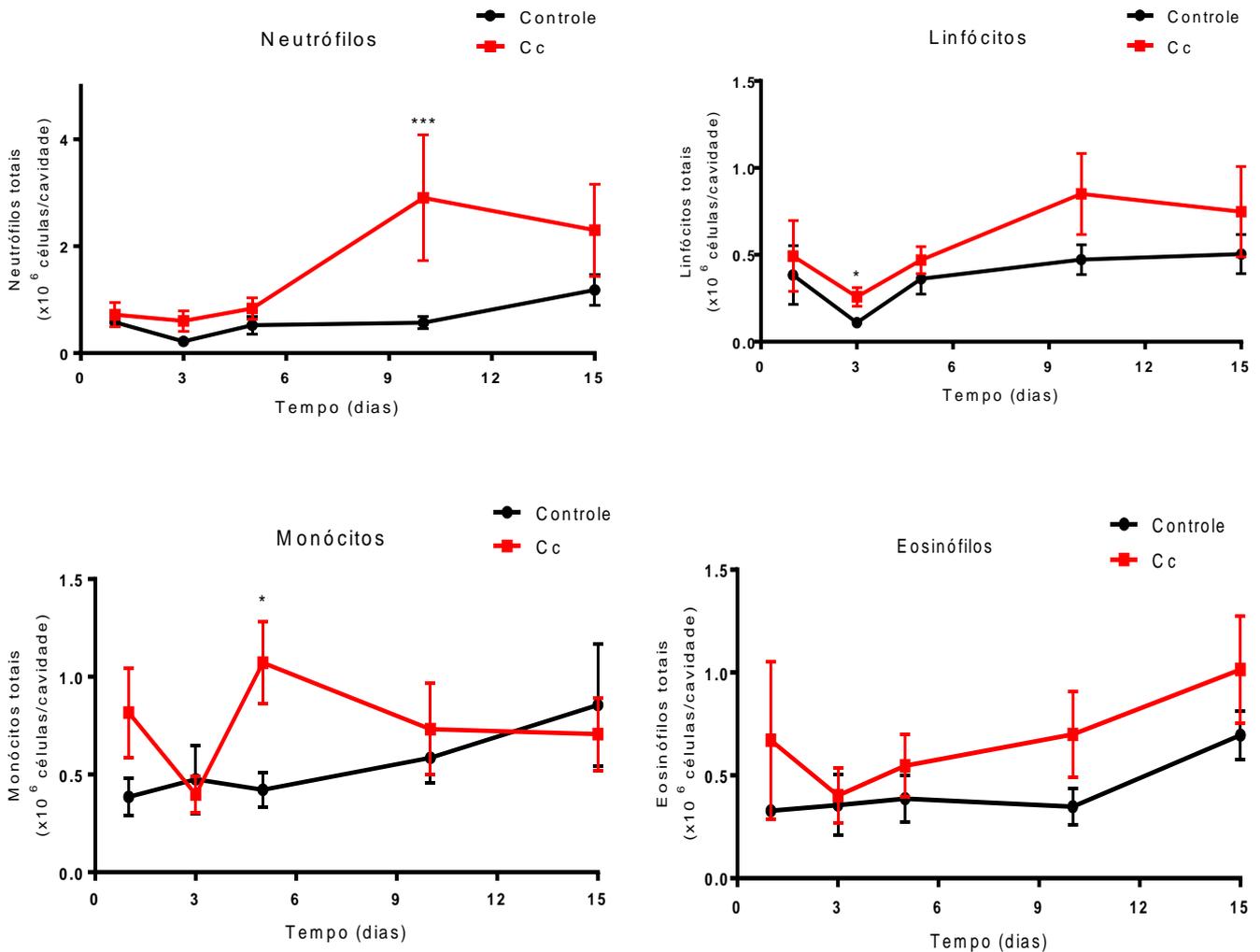


Figura 9 – Efeito dos conídios de *Cladosporium cladosporioides* no influxo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de camundongos

Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos e Eosinófilos no Lavado broncoalveolar de camundongos instilados com 2×10^5 conídios de *Cladosporium cladosporioides* (Cc) após 24h, 3, 5, 10 e 15 dias de tratamento. Dados apresentados por média \pm EPD de 6 animais. *p < 0,05, ***p < 0,001 comparados com o grupo controle e analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Student.

5.3 Análise histopatológica

Foram realizados cortes histológicos corados com HE e PAS. Os cortes do pulmão de animais submetidos à instilação com solução salina apresentaram preservação da estrutura tecidual dos brônquios, alvéolos e septos alveolares de tamanho normal sem a presença de sinais de agressão inflamatória na região peribrônquica.

Após 24 horas, 3° e 5° dia de instilação com conídios de *C. cladosporioides*, os pulmões dos animais apresentaram mudanças morfológicas como: presença de infiltrado celulares inflamatórios em áreas perivasculares e peribrônquicas, alteração morfológica dos alvéolos, septos alveolares, do epitélio de revestimento dos brônquios quando comparados com os pulmões dos animais do grupo controle. Após o 10° e 15° dia o pulmão dos animais apresentaram um aumento de células do infiltrado inflamatório, no diâmetro de septo alveolar, caracterizando a presença de infiltração pulmonar (Figura 10).

Para avaliar a presença de conídios, hifas e a produção de muco por hiperplasia das células caliciformes (mucopolissacarídeos no tecido - rosa magenta), foram utilizadas a coloração por PAS. O grupo avaliado após o 1° e 3° dia de instilação não apresentou produção de muco na região dos bronquíolos nem presença de conídios e hifas. Após o 5° e 10° dia apresentou um aumento nas células produtoras de muco e intensa presença de conídios na região do parênquima pulmonar. No 15° dia de instilação com conídios de *C. cladosporioides*, não foram observados produção de muco nas regiões perivasculares e peribrônquicas do tecido pulmonar. Entretanto, conídios e hifas mostraram se intensos na região pulmonar (Figura 11).

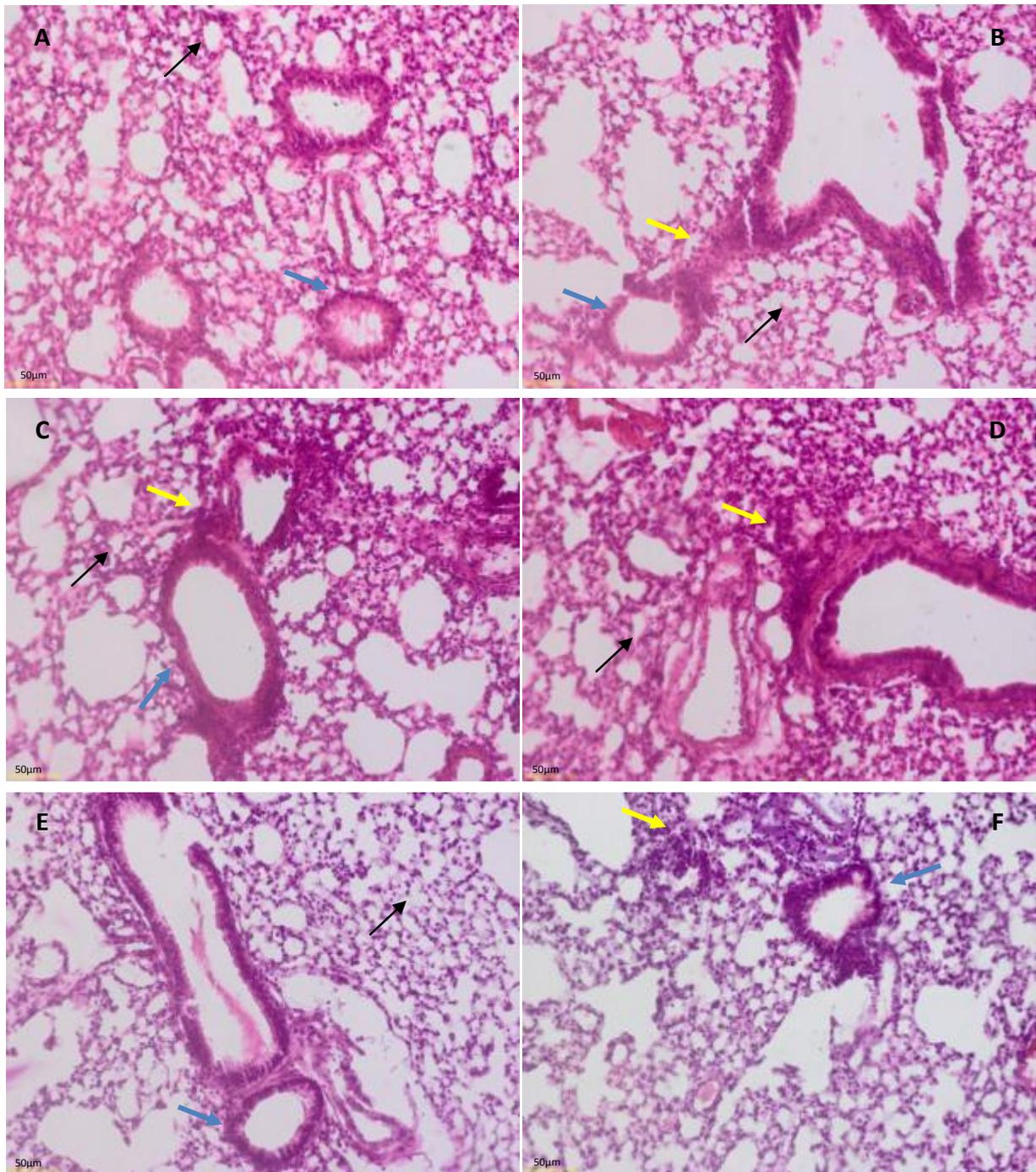


Figura 10 – Efeito dos conídios de *Cladosporium cladosporioides* no tecido pulmonar de camundongos corados por H.E

Aspectos morfológicos das lesões em estudo corados com HE. (A) grupo controle com brônquios alveolares e ductos alveolares preservados (200x); (B, C e D) grupo teste após 1°, 3° e 5° dia respectivamente, com presença de infiltrado inflamatório polimorfonucleares e preservação da estrutura dos septos alveolares (200x); (E e F) grupo após o 10° e 15° dia caracterizado por septos alveolares espessos e com infiltrado inflamatório intenso (200x). A seta preta, azul e amarela indica respectivamente, os alvéolos, brônquios alveolares e infiltrados inflamatório.

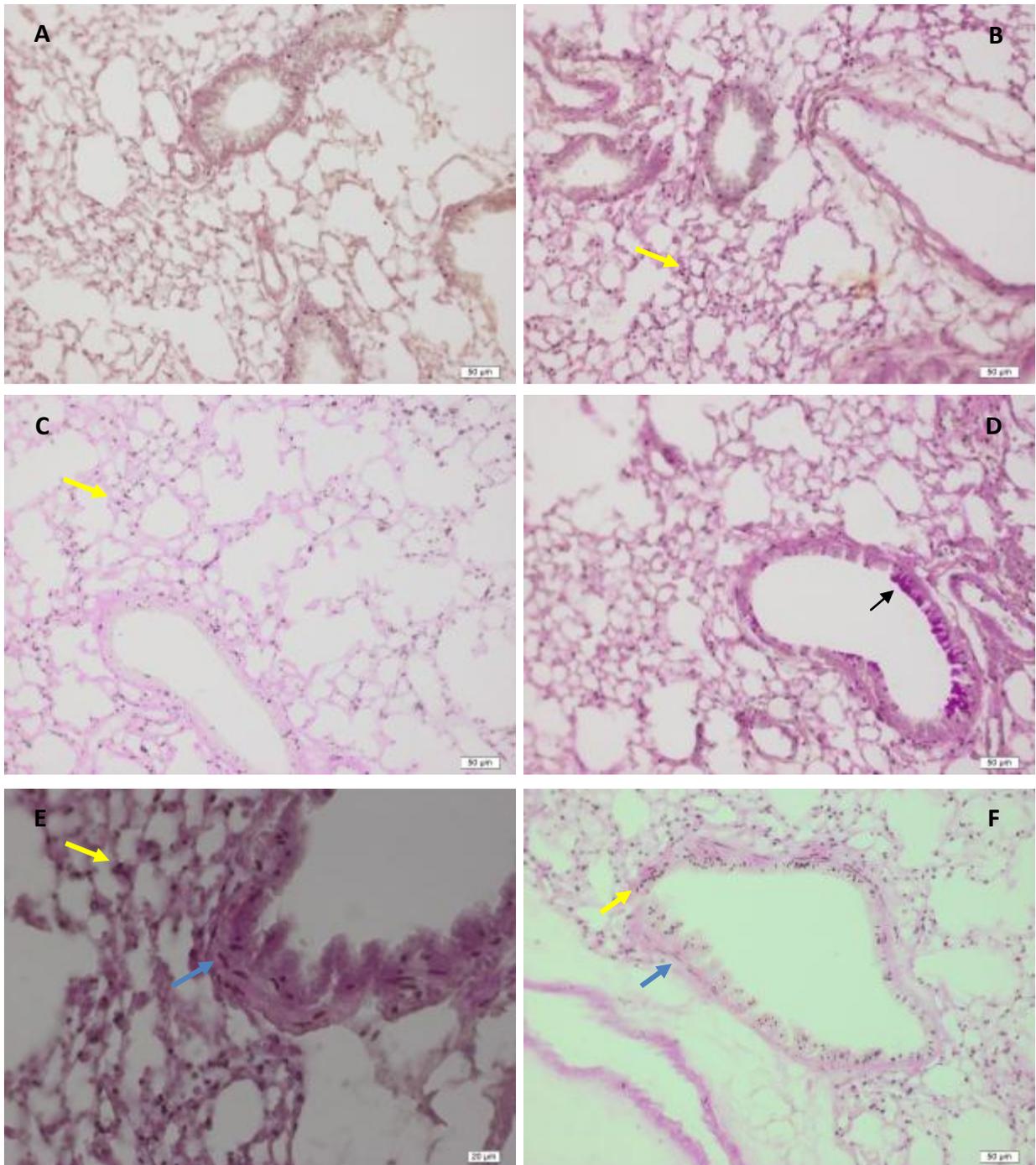


Figura 11 – Efeito dos conídios de *Cladosporium cladosporioides* na produção de muco e a presença de conídio e hifas no tecido pulmonar de camundongos corados por PAS
Aspectos morfológicos das lesões em estudos corados por PAS. (A) grupo controle; (B, C, D, E e F) grupos após 1°, 3°, 5°, 10° (x400) e 15° dia respectivamente. Seta preta indica o muco produzido no epitélio bronquiolar corado de rosa magenta. A seta amarela evidencia intensa aglomeração de conídios e seta azul mostra hifas.

6 DISCUSSÃO

Foi apresentada neste estudo a indução de alterações em estruturas celulares, resposta inflamatória e influxo de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar quando realizada a instilação intranasal de 30 µL de *Cladosporium cladosporioides* na concentração de 2×10^5 conídios/mL em camundongos. Após o 1º, 3º e 5º dias de instilação, ocorreu preservação da estrutura pulmonar sem extravasamento pleural em células inflamatórias.

Considerando as altas concentrações de esporos presentes em ambientes climatizados, a exposição a esse microrganismo pode causar infecções, reações alérgicas e irritantes, resultando em uma sensibilização respiratória (asma ou alveolite) e efeito toxicológico no pulmão, dentre outras (LORENTE et al., 2012; ZOPPAS et al., 2012; SANTA-RITA, 2010). Este fato demonstra uma grande lacuna na RE nº 9 por não apresentar a concentração máxima permitida para esporos de fungos patogênicos das vias respiráveis. A literatura mundial carece de estudos sobre ensaios biológicos de laboratório envolvendo a concentração mínima necessária para desencadear patologias.

Estudando a dispersão fúngica em ambientes hospitalares climatizados em literatura específica, observa-se que eventos de desinfecção, ventilação e trânsito de pessoas são fatores determinantes para a presença de fungos anemófilos, verificando também grande frequência de *Cladosporium* sp (OGOREK et al., 2012). No entanto, torna-se relevante lembrar que devido à própria natureza das atividades realizadas nestes locais, onde podemos encontrar indivíduos com a saúde alterada, debilitados ou imunodeprimidos, a identificação das espécies mostra-se importante uma vez que por meio desta, é confirmada a patogenicidade da mesma (LORENTE et al., 2012; AQUINO et al., 2013).

A relação entre a concentração de esporos de fungos presentes em ambientes fechados, relacionados aos sintomas respiratórios em seres humanos, tem sido registrada constantemente, ocasionalmente 3.000 esporos/m³ de *Cladosporium* sp têm sido relatada como causadoras de transtornos respiratórios (LONGO et al., 2014). Os resultados obtidos demonstram a presença de grandes concentrações de *Cladosporium* sp nos ambientes estudados, sendo o relatado

proveniente de fontes dispersoras internas (ventilação, umidade e temperatura). Visto que uma das funções dos condicionadores de ar é controlar as fontes dispersoras, partículas biológicas provenientes do ar exterior pode-se verificar uma deficiência neste quesito nos ambientes estudados, representando um risco para a saúde dos seus ocupantes. Diante disto é de extrema importância medidas de controle, que só poderá ser atingida através de um programa de manutenção e controle adequado (OGOREK *et al.*, 2012; ZOPPAS *et al.*, 2012).

Possivelmente a concentração do inóculo estimula e evidencia o papel fundamental de ambos os tipos celulares. Os resultados demonstram que a uma baixa concentração de esporos, indivíduos ocupantes de ambientes climatizados podem estar expostos a riscos de doenças respiratórias causadas por fungos presentes nestes ambientes. Diante disto, medidas preventivas devem ser tomadas a fim de prevenir o crescimento desses microrganismos e o desenvolvimento de doenças ocupacionais causadas pelos mesmos, e estas medidas devem ser tomadas observando os múltiplos fatores que possam estar envolvidos na permanência e persistência destes patógenos no ambiente interior como descreve Cooley *et al.*, (2011).

Durante as primeiras horas do processo inflamatório, ocorre o extravasamento pleural rico em células inflamatórias, contendo inicialmente neutrófilos, eosinófilos, seguida por fagócitos mononucleares e linfócitos. Agra (2014) em sua pesquisa revela que, a cavidade pleural recebe as células residentes (mesotélio, macrófagos, mastócitos, entre outras), secretam diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo aqueles responsáveis pelo recrutamento de células polimorfonucleares. Estes resultados estão em acordo com o trabalho realizado por Cooley *et al.*, (2011) onde utilizando conídios de *Penicillium chrysogenum* relataram que a inalação em longo prazo, induz resposta inflamatória rica em eosinófilos, e intensa presença de conídios na região periférica das vias aéreas.

Estudo feito por Hogaboam *et al.*, (2000), foi demonstrado que a administração intratraqueal com conídios de *Aspergillus fumigatus* após 30 dias, induziu resposta inflamatória e alterações no número de células produtoras de muco das vias aéreas. Flemming *et al.*, (2004) revelaram diferenças significativas na vascularização, resposta inflamatória e citotóxica no pulmão de camundongos

expostos intratraquelmente com 50µL (2×10^6 conídios/mL) de *C. cladosporioides* e *Stachybotrys chartarum* após 3 dias de avaliação. Estes dados claramente indicam que esporos de *C. cladosporioides* em associação com esporos de *S. chartarum* apresentam ação inflamatória nas vias aéreas em modelo de doença inflamatória pulmonar.

Com relação aos leucócitos totais foi observada uma inflamação moderada no 5º dia de avaliação. A partir do 10º e 15º dia, foram observadas intensa inflamação com consequente dano tecidual, sendo a resposta inflamatória composta por afluxo transitório de células polimorfonucleares. A literatura mostra que, a cinética de recrutamento leucocitário pode variar de acordo com o sistema imune de cada indivíduo (SILVA, 2012). A partir do 10º dia, a resposta celular foi composta intensamente por populações de neutrófilos, que são resultados do dano tecidual e pela presença de elementos fúngicos, uma vez que na ausência dessa população celular os fungos rapidamente invadem o pulmão. No entanto, deve-se considerar que a simples presença do fungo induz a migração de neutrófilos para o sítio da infecção e a exacerbação dessa resposta inflamatória, visa prevenir a invasão fúngica. Porém, segundo Balloy et al., (2005) sua exacerbação pode levar à morte.

A contagem diferencial mostrou um aumento significativo de monócitos (células precursoras de macrófagos) a partir de 5º dia após instilação, e de neutrófilos a partir de 10º dia, evidenciando assim o papel fundamental de ambos os tipos celulares na contenção e destruição das estruturas do patógeno (conídios e hifas). O aumento tardio do número de monócitos, quando comparados aos neutrófilos, pode ser explicado pela presença de macrófagos alveolares residentes no pulmão. A partir do momento que o processo infeccioso exigiu um maior recrutamento de células monocíticas (5º dia após instilação) para o tecido acometido, a medula óssea aumentou a produção destas células, fato verificado pela contagem diferencial neste período. Possivelmente a grande quantidade de neutrófilos no LBA é devida à alta concentração do inóculo utilizado neste trabalho. A literatura mostra que a instilação do inóculo menos concentrado ($\leq 10^5$ conídios por camundongo) de *Aspergillus fumigatus* resultou em níveis de recrutamento de neutrófilos para o LBA muito baixos, pois macrófagos alveolares residentes, por si só, foram capazes de conter a infecção (PHILIPPE et al., 2003).

As repercussões clínicas à exposição a fungos são variadas, sendo as mais relevantes, em patologia alérgica, as que se traduzem por quadros de rinite, asma brônquica, alveolite alérgica extrínseca, pneumonite e câncer. (ZUKIEWICZ-SOBZAK, 2013; LOUREIRO, 2001). Em geral, a prevalência de doenças alérgicas respiratórias como asma brônquica e rinite alérgica causadas por fungos, indicam 25% a 30% em indivíduos atópicos, e até 6% na população em geral, ressaltando que esporos de *Cladosporium* são os mais comuns e induzem a fatores que levam a reações alérgicas (HASNAIN, AKHTER, WAQAR 2012; KNUTSEN et al., 2012). É importante citar que o desenvolvimento de grande parte das doenças mencionadas, depende de fatores diversos, tais como o nível de exposição, o tempo de exposição e a imunidade dos indivíduos expostos (RIBEIRO, 2011).

Tendo em vista o grande poder alergênico de *Cladosporium cladosporioides* e considerando o fato dos resultados apresentados serem referentes a um ambiente climatizado, torna-se preocupante a permanência contínua de indivíduos nesse local. Em conjunto, os dados apresentados revelam que esta espécie provoca reação inflamatória, principalmente nas vias aéreas. E que medidas preventivas devem ser tomadas para amenizar os fatores que contribuem para o desenvolvimento dos fungos nesses ambientes.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- ⇒ Ao serem instilados com suspensões de conídios de *C. cladosporioides*, houve indução e aparecimento de infiltrado inflamatório predominantemente em células polimorfonucleares, mostrando espessamento da parede brônquica e dos alvéolos;
- ⇒ Foi observada moderada presença de muco apenas no 5º dia de avaliação e intensa presença de conídios e hifas nas proximidades dos brônquios e alvéolos pulmonares após o 5º, 10º e 15º dia;
- ⇒ Uma pequena concentração de esporos fúngicos pode ser suficiente para desencadear doenças respiratórias e processos inflamatórios em indivíduos saudáveis.

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, R.L. et al. The diversity and distribution of fungi on residential surfaces. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, P. 1-9, 2013.

AQUINO, V. H. R. et al. Identificação de fungos anemófilos em ambientes hospitalar. **VIII Congresso de ciências e tecnologia da Amazônia**, P. 72-76, 2013.

AGRA, L. C. Efeito anti-inflamatório do triterpeno uvaol em modelos de inflamação alérgica em camundongos. Dissertação (Mestre em ciências da Saúde) – **Universidade Federal de Alagoas**, 2014.

ANTONY, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. **European Respiratory Journal**, v. 21, p. 539-544, 2003.

AOKI, F. G. Modelos matemáticos aplicados na avaliação da mecânica respiratória em camundongos com desafios de agonista da musculatura lisa. 2013. Dissertação (Mestre em Ciências) – **Escola politécnica da Universidade Federal de São Paulo**, São Paulo. 2013.

BACKES, L. R. H. et al. Isolamento de fungos anemófilos em biblioteca e prevalência de alergias respiratórias. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 13, p. 19-25, 2011.

BALLOY, V. et al. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid. Treatment and chemotherapy in experimental invasive aspergillosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 1, p. 495-503, 2005.

BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1-401, 2012.

BENSCH, K. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1-94, 2010.

BRASIL. Agência nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº. 109, de 11 de dezembro de 2003. Proposta de Resolução que dispõe sobre indicadores da qualidade do ar ambiental interior em serviços de saúde. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 01/02/2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº. 09, de 16 de janeiro de 2003. Orientação Técnica revisada contende Padrões da Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 35-37, 20 de janeiro de 2003c.

BRASIL. Portaria nº. 3.523 de 28 de agosto de 1998. Regulamento Técnico contendo medidas básicas referentes aos procedimentos de verificação visual do estado de limpeza, remoção sujidades por métodos físicos e manutenção dos estados de integridade e eficiência de todos os componentes dos sistemas de climatização, para garantir a Qualidade do Ar de Interiores e prevenção de riscos a saúde de seus ocupantes de ambientes climatizados. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 40-42, 31 de agosto de 1998.

BHATIA, L. Impact of bioaerosol on indoor air quality - a growing concern. **Advances in bioresearch**. v. 2, p. 120-3, 2011.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. The American **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 42, p. 225-6, 1939.

COOLEY, J. D. et al. An animal model for allergic penicilliosis induced by the intranasal instillation of viable *Penicillium chrysogenum* conidia. **Thorax** **2000**, v. 55, p. 498-496, 2011.

CHAUDHARY, N.; MARR, J. A. Impact of *Aspergillus fumigatus* in allergic airway disease. **Clinical and Translational Allergy**. v. 1, p. 1-7, 2011. doi:10.1186/2045-7022-1-4.

DE HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**, 2 edn. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Vigilli, Utrecht/Reus, 2000. p. 1126.

FAIRS, A. et al. Guidelines on ambient intramural airborne fungal spores. **J. Investing Allergol Clin Immunol**, v. 20, n. 6, P. 490-498, 2010.

FISHER, F.; COOK, N.B. **Micologia Fundamentos e Diagnóstico**. 1 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 337 p.

FLORES, L.H.; ONOFRE, S.B. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em unidade de saúde da cidade de Francisco Beltrão – PR. **Revista de Saúde e Biologia**. v. 5, p. 22-6, 2010.

FLEMMING, J.; HUDSON, B.; RAND, T. G. Comparison of inflammatory and cytotoxic lung responses in mice after intratracheal exposure to spores of two different *Stachybotrys chartarum* strains. **Toxicological sciences**, v. 78, p. 267-275. 2004

FONSECA-JUNIOR, U.M. et al. Risco à saúde relacionado a ambiente climatizado por não utilizar filtro em Fan coil. 2010. Dissertação (Mestre Engenharia de Segurança do Trabalho) – **Universidade Federal do Mato Grosso**, 2010.

HOGABOAM, C. M. et al. Chronic airway hyperreactivity, goblet cell hyperplasia, and peribronchial fibrosis during allergic airway disease induced by *Aspergillus fumigatus*. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 2, p. 723-732, 2000.

HASNAIN, S. M.; AKHTER, T.; WAQAR, A. M. Airborne and allergenic fungal spores of the Karachi environment and their correlation with meteorological factors. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, P. 1006-1013, 2012.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2004.

KNUTSEN, A. P. et al. Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. **J. Allergy clinic immunology**, v. 129, n. 2, p. 280-291, 2012.

LANG-YONA, N. et al. Annual distribution of allergenic fungal spores in atmospheric particulate matter in the eastern mediterranean; a comparative study between ergosterol and quantitative PCR analysis. **Atmospheric Chemistry and Physics**. v. 12, p. 2681–90, 2012.

LONGO, S. E. F. et al. Spores of lichen-forming fungi in the myco-aerosol and their relationships with climate factors. **Science of the Total Environment**, v. 466-467, p. 26-33, 2014.

LECHNER, A.J.; MATUSCHAK, G. M.; BRINK, D. S. *Pulmões: uma Abordagem Integrada à Doença*. 1. ed. Porto Alegre: Mcgraw Hill, 2013.

LOUREIRO, C. Patologia alérgica a fungos, Fungos e alergia respiratória. **Revista Port. Imunoalergologia**, v.9, n 2, p. 125-128, 2001.

LORENTE, C. et al. *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 produces the 1,8-Dihydroxynaphthalene-Melanin-Like Compound and Carries a Putative *pks* Gene. **Mycopathologia**, v. 174, p. 397-408, 2012.

MENEZES, C. P. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *melissa officinalis* L. (erva-cidreira) sobre *Cladosporium carrionii*. 2012. Dissertação (Mestre em produtos naturais e sintéticos bioativos) – Centro de ciências da saúde, **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa/PB. 2012.

MESCHER, A. L. Junqueira's **Basic Histology**, 12. ed. Estados Unidos: McGraw-Hill, 2010.

MENDES, et al. Da medicina do trabalho á saúde do trabalhador. **Revista Saúde Pública**. São Paulo, V. 25, n. 5, p. 341-349. 2013.

MYOU, S. et al. Blockade of Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Immune-sensitized Mice by Dominant-Negative Phosphoinositide 3-Kinase–TAT. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1573–1582, 2003.

OGOREK, R. et al. Fungi in the mountain trails of the snieznik massif. **Mikologia Lekarska**, v. 19, n. 2, p. 57-62, 2012.

OLIVEIRA, T. O. Identificação molecular e produção de pectinases por isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Dissertação (Mestre em ciências do alimento) – **Universidade Federal de Lavras/MG**, 2011.

ORGIAZZI, A. et al. Unravelling Soil Fungal Communities from Different Mediterranean Land-Use Backgrounds. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-9, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0034847.

PHILIPPE, B. et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. ., p. 3034-3042, 2003.

RIBEIRO, M. V. A síndrome dos arquivos doentes: os riscos de contaminação por fungos no trabalho em arquivo. Monografia (Bacharel em Arquivologia) – Centro de ciências biológicas e sociais aplicadas, **Universidade Estadual da Paraíba**, João Pessoa/PB, 2011.

RIDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v.42, n.2. 265-270. 1950.

ROCHA, M. F. G. et al. Isolation of pathogenic yeasts in the air from hospital environments in the city of Fortaleza, northeast Brasil. **Braz. J. Infect Dis.**, v. 14, n. 1, p. 30-34, 2010.

ROSS, M. H; PAWLINA, W. **Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins-Wolters Kluwer business, 2011.

SANTANA, W. O.; FORTUNA, J. L. Microbiota de aparelhos de ar condicionado das áreas críticas de hospitais públicos e particulares e sua relação com as infecções hospitalares. **Revista Biociências**, v. 18, n. 1, p. 56-64, 2012.

SANTA-RITA, K. P. P. Avaliação dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos do ar na unidade de terapia intensiva neonatal e no centro cirúrgico do hospital universitário Prof. Dr. Alberto Antunes – HUPAA Maceió-AL. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, **Universidade Federal de Alagoas**, 2010.

SILVA, R. L. H. Evolução da aspergilose pulmonar invasiva produzida em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti GR-1Ly-6G e infectados com amostras de *Aspergillus fumigatus* que apresentaram distintos padrões de produção de elastase. 2012. Dissertação (Mestre em Ciências) – Departamento de Patologia e Medicina Legal, **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP**. 2012.

SOUZA, A. E. F. et al. Levantamento parcial de fungos anemófilos em ambientes do hospital municipal Dr. Hercilio Rodrigues, Areia-PB. **Revista de Biologia e Farmácia Campina Grande/PB**, v. 9, n. 1, p. 65-70, 2013.

SCHIRMER, W. N. et al. Qualidade do ar interno em ambientes hospitalares. **Revista de Tecnologia**, Fortaleza, v. 30, n. 1, p38-52, 2011.

VICHIT-VADAKAN, N.; VAJANAPOOM, N. Health impact from air pollution in Thailand: current and future challenges. **Environmental Health Perspectives**. v. 119, 197–8, 2011.

ZOPPAS, B. C. A. et al. Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 34, n. 2, P. 55-58, 2012.

ZUKIECZ-SOBCZAK, W. A. The role off ungi in allergic disseases. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. xxx, n. 1, p. 42-45, 2013.