

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE
Sporothrix sp. ESTOCADOS NA COLEÇÃO DE CULTURA URM**

RECIFE

2017

CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE
Sporothrix sp. ESTOCADOS NA COLEÇÃO DE CULTURA URM**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Co-Orientador: Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Valeriano, Carlos Alberto Tibúrcio

Identificação polifásica e perfil de sensibilidade de isolados de *Sporothrix* sp. estocados na coleção de cultura URM / Carlos Alberto Tiburcio Valeriano. – Recife: O Autor, 2017.

63 f.: il., fig, tab.

Orientador: Reginaldo Gonçalves Lima Neto

Coorientador: Manoel Marques Evangelista de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Fungos filamentosos 2. Esporotricose I. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de (orient.) II. Oliveira, Manoel Marques Evangelista (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-318

CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE
Sporothrix sp. ESTOCADOS NA COLEÇÃO DE CULTURA URM**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 24/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto/UFPE

Professora Dr^a. Rejane Pereira Neves/UFPE

Professora Dr^a. Carolina Maria da Silva/UFPE

A todos que contribuíram para conclusão dessa etapa, em especial esposa, filho, pai, mãe, irmã e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Ciência em Pernambuco (FACEPE) pela concessão do auxílio à mobilidade discente, permitindo assim minha ida à FIOCRUZ/RJ.

À Coleção de Culturas MICOTECA URM pelo fornecimento das amostras.

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, em especial aos professores do Laboratório de Micologia Médica: Dr^a Oliane Magalhães, Dr^a Rejane Neves, e Dr. Armando Marsden.

Ao Orientador Professor Dr. Reginaldo Gonçalves, pelos ensinamentos, correções, e por sempre estar disposto a ajudar no que fosse preciso.

Ao Co-Orientador Dr. Manoel Oliveira, pela realização dos testes genotípicos e fenotípicos, e pela acolhida durante minha estadia no Rio de Janeiro.

A todo pessoal do Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia da FIOCRUZ/RJ pelo acolhimento, em especial à Vanessa Brito E Stéfani Favoretti, pela grande ajuda na realização dos testes fenotípicos e genotípicos; e aos Doutores Rosely Oliveira e Mauro Muniz por me permitirem realizar essa parte significativa do projeto nessa grande instituição.

À minha família, que sempre esteve presente nos momentos difíceis, em especial minha esposa Bárbara Valeriano, e meu filho Abner Valeriano, meus portos seguros; e meus pais, José Valeriano e Isma Valeriano, e irmã, Iêda Valeriano, por todo apoio e incentivo, sem os quais eu jamais teria chegado até aqui.

A todos os amigos que acompanharam minha caminhada desde a graduação até aqui, ajudando nos momentos de medos e incertezas, e celebrando os momentos de conquistas.

À minha turma de mestrado, em especial a Ertênia Oliveira e Franz de Assis, companheiros de jornada no Laboratório de Micologia Médica.

A todos os amigos do Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, em especial Daniela Buonafina, Cícero Pinheiro, Ana Emília Medeiros, Pamela Ximenes e Michellângelo Nunes, por sempre serem solícitos em tirar qualquer dúvida, e sempre estarem dispostos a ensinar.

“E nossa história não estará
pelo avesso assim, sem final
feliz. Teremos coisas bonitas
para contar. E até lá, vamos
viver. Temos muito ainda por
fazer (...) apenas começamos”.

Renato Russo

RESUMO

Desde 2007, o fungo termodirmórfico *Sporothrix schenckii* (agente da esporotricose) não é mais considerado um táxon único, mas sim um complexo de espécies, denominado Complexo *Sporothrix schenckii*. O presente trabalho teve como objetivo revisar taxonomicamente agentes da esporotricose estocados na Coleção de Culturas URM, como *Sporothrix schenckii*, *S. fungorum* e *Sporotrichum schenckii*, além de obter o perfil de sensibilidade destes aos antifúngicos convencionais e compostos bioativos, Miltefosina e extrato de *Schinus terebinthifolius* (aroeira), bem como verificar o potencial inibitório de compostos de tiofeno (6CN10, LNN-03, LNN-07, LNN-08 e LNN-09), Miltefosina e extrato de *Anadenanthera macrocarpa* (angico vermelho) em relação à produção de melanina dessas cepas. Testes fenotípicos de assimilação de carboidratos (Rafinose e Sacarose), morfologia de conídios, diâmetro da colônia em meio BDA e termotolerância a 37° C foram realizados. A análise genotípica baseou-se no sequenciamento parcial do gene da calmodulina e sequenciamento do gene beta-tubulina. Os testes de sensibilidade antifúngica basearam-se no método de microdiluição em caldo estabelecido pelo documento CLSI M38-A2. Para verificar a atividade dos compostos frente à produção de melanina, inóculos das cepas foram colocados em meio mínimo em ágar (Glicose 15mM, MgSO₄ 10mM, KH₂PO₄ 29,4 mM, Glicina 13mM e Tiamina 3mM) adicionado dos compostos. A análise fenotípica mostrou que dois isolados apresentam características de *Sporothrix schenckii* e 11 de *S. mexicana*, de acordo com a chave de identificação fenotípica proposta. As análises genotípicas identificaram as espécies *Sporothrix schenckii*, *S. chilensis* e *S. mexicana* dentre os isolados. *S. schenckii*, *S. mexicana* e *S. chilensis* apresentaram sensibilidade ao Itraconazol. Apenas um isolado de *S. chilensis* apresentou resistência à Anfotericina B. Miltefosina e o extrato de *S. terebinthifolius* apresentaram atividade frente a todos os isolados, com CIM's de 0,25 a 2 µg/mL para Miltefosina, e CIM's de 1 a 4 µg/mL para o extrato. Foi constatado que todos compostos de tiofeno testados foram capazes de inibir a produção de melanina. As ferramentas moleculares empregadas neste estudo, somadas à análise das características fenotípicas dos isolados estudados, permitiram uma identificação acurada destes, permitindo a requalificação dessas amostras da Coleção, o que representa importância no estudo da micologia no Brasil, especialmente no que diz respeito ao Complexo *Sporothrix schenckii*. Os resultados dos testes de sensibilidade e de inibição da produção de melanina demonstraram ação eficaz dos compostos testados, podendo estes compostos apresentarem-se como opções no tratamento da esporotricose futuramente, após estudos baseados em modelos animais, e que verifiquem a toxicidade destes.

Palavras-chave: Complexo *Sporothrix schenckii*. Requalificação. Micoteca URM.

ABSTRACT

Since 2007, the thermidimorphic fungus *Sporothrix schenckii* (sporotrichosis agent) it's no longer considered a single taxon, but a complex of species denominated *Sporothrix schenckii* Complex. This work, aimed to perform a taxonomic review of sporotrichosis agents strains, stored in the University of Recife Micology Culture Collection, as *Sporothrix schenckii*, *S. fungorum* and *Sporotrichum schenckii*, besides obtain the susceptibility profile of this isolates to conventional antifungals, and bioactive compounds, Miltefosine and a plant extract (*Schinus terebinthifolius*) as well verify the inhibitory potential of tiophen compounds (6CN10, LNN-03, LNN-07, LNN-08 e LNN-09), Miltefosine and a natural extract (*Anadenanthera macrocarpa*) against the melanin production of these strains. Phenotypicall tests of carbohydrates assimilation (Raffinose and Sucrose), conidia morphology, colony diameter in PDA medium and thermotolerancy in 37° C was performed. Genotypic analysis was based in the partial sequencing of the calmodulin gene and sequencing of the beta-tubulin gene. The susceptibility trials was based in the microbroth dilution method established by the CLSI M38-A2 document. To verify the activity of the compounds against the melanin production, strains inoculum was put down in minimal medium in agar (Glicose 15mM, MgSO₄ 10mM, KH₂PO₄ 29,4 mM, Glicin 13mM and Tiamin 3mM) added of compounds. The phenotypic analysis showed that two isolates shows *Sporothrix schenckii* features and 11 *S. Mexicana* features, according the key phenotypic features proposed. Genotypic analysis identify the species *Sporothrix schenckii*, *S. chilensis* and *S. mexicana* among the isolates. *S. schenckii*, *S. mexicana* and *S. chilensis* shows susceptibility to Itraconazole. One *S. chilensis* isolate shows resistance to Amphotericin B. Miltefosine and *S. terebinthifolius* extract shows activity against all the isolates, with MIC's of 0,25 to 2 µg/mL to Miltefosine, and MIC's of 1 to 4 µg/mL to the extract. Was verified that all the tiophene compounds tested was capable to inhibit the melanin production. The molecular tools applied in this work, added to the phenotypic features analysis of the studied isolates, allowed an accurate identification of these, has permitted the requalification of these Collection samples, what represents importance in the mycology study in Brazil, specially regard to the *Sporothrix schenckii* Complex. Results of the susceptibility tests and melanin inhibition showed effective action of the tested compounds, and these compounds may be options in the sporotrichosis treatment in the future, after studies based in murine models, and that verify the toxicity of these.

Keywords: *Sporothrix schenckii* Complex. Requalification. URM Culture Collecttion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- ESTRUTURAS MICROMORFOLÓGICAS DE <i>SPOROTHRIX</i> SP. <i>S. schenckii</i> URM 3686 (A) E URM 4291 (B) EVIDENCIANDO FILAMENTOS MICELIANOS HIALINOS, RAMIFICADOS E DELICADOS (SETA AZUL) COM CONÍDIOS DISPOSTOS LATERALMENTE AO MICÉLIO EM A (SETA PRETA) E CONÍDIOS EM DISPOSIÇÃO FLORAL (SETAS VERMELHAS) EM B. COLORAÇÃO: LACTOFENOL AZUL DE ALGODÃO. MAGNIFICAÇÃO: 400X.....	43
FIGURA 2- DIÂMETRO DE COLÔNIA (A) E TERMOTOLERÂNCIA (B) DO ISOLADO URM 5111.....	46
FIGURA 3- FILOGRAMA <i>NEIGHBOOR-JOININING</i> DO GENE B-TUB OBTIDO DE ISOLADOS DA COLEÇÃO DE CULTURAS URM E CEPAS PADRÃO (<i>Sporothrix schenckii</i> CBS 302.73; <i>S. brasiliensis</i> IPEC 16490 TUB; <i>S.luriei</i> ATCC 18616T; <i>S. albicans</i> CBS 302.73; <i>S. mexicana</i> CBS 120341; <i>S. chilensis</i> SS469 E SS470) DISPONÍVEIS NO GENBANK.....	45
FIGURA 4- INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA DE DOIS ISOLADOS PRODUTORES DE MELANINA. EM A: ISOLADO 432 (<i>Sporothrix brasiliensis</i>) (SETA PRETA) (CONTROLE). A1: ISOLADO 432 (SETA PRETA) NA PRESENÇA DO COMPOSTO LNN-03 (100% DA CIM). A2: ISOLADO 432 (SETA PRETA) NA PRESENÇA DO COMPOSTO LNN-03 (50% DA CIM). EM B: ISOLADO 3686 (<i>S. schenckii</i>) (SETA VERMELHA) (CONTROLE). B1: ISOLADO 3686 (SETA VERMELHA) NA PRESENÇA DO COMPOSTO LNN-08 (100% DA CIM). B2: ISOLADO 3686 (SETA VERMELHA) NA PRESENÇA DO COMPOSTO LNN-08 (50% DA CIM).....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- DADOS DOS ISOLADOS DE AGENTES DA ESPOROTRICOSE DA COLEÇÃO DE CULTURAS URM.19

TABELA 2- CHAVE DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *Sporothrix* SP.20

TABELA 3- CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE *Sporothrix* SP. ESTOCADOS NA COLEÇÃO DE CULTURAS URM, REALIZADA NO INSTITUTO DE PESQUISAS CLÍNICAS EVANDRO CHAGAS, RIO DE JANEIRO, BRASIL, EM JULHO DE 2016.43

TABELA 4- ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MILTEFOSINA, EXTRATO DE *Schinus terebinthifolius*, ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B FRENTE A ISOLADOS DE *Sporothrix* SP. ESTOCADOS NA COLEÇÃO DE CULTURA URM.47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnfoB- Anfotericina B

ATCC- *American Typical Culture Collection*

BDA- Ágar Batata Dextrose

BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool*

CAL- Calmodulina

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CHCA- Ácido α -ciano-4 hidroxicinâmico

CLSI- *Clinical Laboratory Standards Institute*

CMI- *Commonwealth Mycological Institute*

DHB- Ácido 2,5- dihidroxibenzóico

DHN- Dihidroxinaftaleno

DMSO- Dimetilsulfóxido

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HUVEC- *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IL- 1 β - Interleucina 1 β

ITC- Itraconazol

ITS- *Internal Transcribed Spacer*

MALDI-TOF/MS- *Matrix Assisted Laser Desorption ionization- Time of Flight/ Mass Spectrometry*

MIL- Miltefosina

MOPS- 3-[N-morfolino] propano-ácido sulfônico

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

PAS- Ácido Periódico de Schiff

PCR- *Polimerase Chain Reaction*

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SDA- Sabouraud Dextrose Ágar

SDA+YE- Sabouraud Dextrose Ágar suplementado com Extrato de Levedura

TES- N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetano sulfonato

TGF- β - *Transforming Growth Factor*- β

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFPE- Universidade Federal de Pernambuco

URM- *University of Recife Mycology*

WFCC- *World Federation Culture Collection*

YNB- *Yeast Nitrogen Base*

β -tub- β tubulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO	16
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo Geral	18
1.2.2	Objetivos Específicos	18
1.3	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	19
1.3.1	Reativação e viabilidade das amostras	19
1.3.2	Caracterização fenotípica	20
1.3.2.1	Auxonograma	21
1.3.2.2	Morfologia e termotolerância	22
1.3.3	Caracterização genotípica	22
1.3.3.1	Extração do DNA	22
1.3.3.2	Sequenciamento dos genes CAL e β -tub	22
1.3.4	Testes de sensibilidade antifúngica	23
1.3.5	Produção de melanina	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	ESPOROTRICOSE E O COMPLEXO <i>Sporothrix schenckii</i>	25
2.1.1	Histórico	25
2.1.2	Epidemiologia	28
2.1.3	Manifestações clínicas	30
2.1.4	Patogenia	34
2.1.5	Diagnóstico clínico	36
2.1.6	Diagnóstico laboratorial	36
2.1.6.1	Morfologia	36
2.1.6.2	Diagnóstico molecular	38
2.1.7	Tratamento	39
2.1.7.1	Susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i>	40
2.1.7.2	Novas alternativas terapêuticas	41
3	ANÁLISE DE RESULTADOS	43
3.1	VIABILIDADE DOS ISOLADOS	43
3.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	44

3.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	46
3.4	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	47
3.5	PRODUÇÃO DE MELANINA.....	49
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE A – Morfologia de conídios de <i>Sporothrix</i> sp. após 21 dias de crescimento em Ágar Corn Meal.....	65

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos filamentosos termodimórficos pertencentes ao Complexo *Sporothrix schencki* (RODRIGUES; DE HOOG E CAMARGO, 2015). Apresenta ampla distribuição mundial, ocorrendo tanto em seres humanos quanto em animais, causando lesões de disseminação linfática (forma linfocutânea) ou fixas (forma cutânea localizada) em tecidos cutâneos e subcutâneos. Estima-se que a forma linfocutânea da esporotricose apresenta uma incidência de 75% dos casos registrados, sendo considerada a manifestação clínica mais comum da doença. A forma cutânea localizada apresenta cerca de 20% de incidência, e acredita-se que está associada a um quadro de pré-sensibilização do indivíduo ao patógeno (GUTIERREZ-GALHARDO; FREITAS; VALLE, 2015).

Ambas as formas citadas têm como forma de contaminação a inoculação do fungo via lesão perfuro-cortante com material contaminado com esporos do fungo, e geralmente acomete profissionais como jardineiros, paisagistas, agricultores e profissionais de saúde em geral, sendo por isso considerada uma doença de caráter laboral. Na maioria dos casos, a lesão perfurante ocorre em extremidades dos membros superiores e inferiores, devido à manipulação de materiais perfurantes contendo esporos do fungo (KAUFFMAN; HAJJEH E CHAPMAN, 2000).

A forma linfocutânea da esporotricose apresenta como característica um quadro clínico denominado linfangite nodular ascendente, onde a partir do ponto de inoculação do patógeno ocorre a formação de lesão primária, geralmente após 2 a 3 semanas após a inoculação e, dependendo da evolução da doença, ocorre ascendência de lesões nodulares, gomosas, ou ulcerativas, via trajeto linfático (GUTIERREZ-GALHARDO; FREITAS; VALLE, 2015; RAMOS-E-SILVA, 2007).

A forma cutânea localizada ou fixa da esporotricose tem essa denominação devido a sua apresentação, a qual se caracteriza por não haver ascendência das lesões a partir do ponto de inoculação do fungo, ficando esta lesão restrita a este ponto, podendo apresentar-se ulcerosa, gomosa, supurativa ou verrucosa (MAHAJAN, 2014).

As formas disseminadas e sistêmicas da doença estão associadas a um quadro imunológico deficiente do indivíduo acometido (SIDRIM E ROCHA, 2004).

Pode ainda ocasionar infecções pulmonares ou sistêmicas, muitas vezes não se encontrando nenhum tipo de lesão perfuro-cortante primária nesses casos, o que

leva a crer que a inoculação do fungo no indivíduo pode se dar via inalatória (esporotricose pulmonar) ou ingestão do fungo (FARIAS et al., 2015).

Atualmente, análises genômicas de isolados clínicos e ambientais de *S. schenckii* evidenciam que este não se constitui em um táxon único, mas se apresenta como um complexo de diferentes espécies, devido não só a variações na sua morfologia, mas pelas características evidenciadas em estudos recentes. Dentre estas espécies encontramos *S. brasiliensis* (endêmica do Brasil), *S. mexicana*, *S. globosa*, *S. albicans*, *S. pallida*, e *S. luriei* (MARIMON et al., 2007; 2008a; OLIVEIRA et al, 2013).

Recentemente, Rodrigues e colaboradores (2016) caracterizaram mais uma espécie deste gênero a qual também apresenta patogenicidade a seres humanos: *Sporothrix chilensis*.

Marimon et al. (2007; 2008a) utilizou como ferramenta molecular o sequenciamento parcial do gene da calmodulina (CAL), o qual tem ampla capacidade discriminatória entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Já o estudo de Rodrigues et al. (2016) utilizou, além do gene CAL, os primers ITS e beta-tubulina (β -tub).

Diversos trabalhos têm demonstrado a ocorrência dessas diferentes espécies nos últimos anos em diversas partes do mundo, e que estas podem apresentar diferenças nos padrões de sensibilidade antifúngica, epidemiologia, e também nos padrões de lesões típicas da esporotricose (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2009; OLIVEIRA, D. C., et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014).

O presente trabalho visou caracterizar amostras do gênero *Sporothrix* estocadas na Coleção de Culturas URM quanto aos aspectos fenotípicos e genotípicos. Além dessas análises, verificar os perfis de sensibilidade dos isolados frente a antifúngicos padrões no tratamento da esporotricose, e testar dois compostos bioativos contra os isolados de *Sporothrix*. Também se objetivou verificar a capacidade de produção de melanina desses isolados na presença de compostos bioativos com potencial antifúngico.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

A Coleção de Culturas URM, fundada em 1954 pelo Profº Drº Chaves Batista, tem desde sua fundação prestado grandes contribuições no que diz respeito ao estudo da diversidade dos fungos, tanto filamentosos quanto leveduras,

apresentando um vasto acervo, o qual tem passado por sucessivas requalificações em parceria com diversos centros de pesquisa, e através de projetos de pesquisa desenvolvidos por alunos de graduação e pós-graduação (MOTA, 2012).

Dispõe atualmente de um acervo de aproximadamente 8000 culturas de fungos, sendo 1.300 leveduras e 6.700 filamentosos (MICOTECA URM). Dentre estas amostras, 14 de agentes da esporotricose, identificadas como *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix fungorum* e *Sporotrichum schenckii*, as quais foram obtidas a partir de pacientes atendidos no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, ou de doações de centros de pesquisa como o Instituto Adolf Lutz em São Paulo, e Instituto Pasteur na França. Algumas destas amostras datam de 1955, tendo sido obtidas apenas de lesões na pele de humanos (MICOTECA URM).

Está registrada atualmente no *Commonwealth Mycological Institute* (CMI) e afiliada a *World Federation for Culture Collections* (WFCC). Desde a sua fundação, um grande número de estudantes tem desenvolvido importantes trabalhos com as amostras disponíveis nesta coleção (MOTTA, 2012).

Coleções de Cultura têm um valor significativo no que diz respeito ao fornecimento de recursos biológicos para uma série de linhas de pesquisa como farmacêutica, taxonômica, biotecnológica e outras (McCLUSKEY 2003; SNELDERS et al. 2008). Hawksworth (2004) aponta que coleções de culturas de fungos são melhor definidas como “coleção de recursos genéticos” do que como “coleções de cultura”. Entretanto, com o avanço das técnicas moleculares e do reposicionamento filogenético de muitos grupos de fungos como *Sporothrix* sp., *Candida* sp., e outros, se faz necessário uma nova avaliação que permita, se necessário, uma requalificação do acervo dessa Coleções.

A abordagem polifásica através do uso de ferramentas moleculares e da análise do perfil proteômico das amostras, tem sido uma tendência no sentido de requalificar essas coleções de cultura (SIMÕES et al., 2009).

Considerando a importância da Coleção de Cultura URM, no que diz respeito ao estudo da micologia no Brasil e no mundo, e que desde os estudos desenvolvidos por Marimon et al. (2007) *Sporothrix schenckii* não é mais considerado apenas um táxon isolado, mas sim um complexo composto por seis espécies (*S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriei* e recentemente *S. chilensis*), o presente trabalho se propôs a requalificar as amostras deste fungo estocadas nessa Coleção, através do uso de ferramentas moleculares

como a técnica de sequenciamento parcial dos genes CAL e β -tub, além das análises fenotípicas descritas nos trabalhos de Marimon et al. (2007).

Devido aos surtos constantes em humanos e animais, envolvendo cepas cada vez mais refratárias aos tratamentos convencionais (BUSTAMANTE E CAMPOS, 2011), foram realizados testes de sensibilidade antifúngica padronizados pelo documento CLSI M38- A2 (o qual estabelece os critérios para a realização desse teste pelo método de microdiluição em caldo para fungos filamentosos), visando traçar o perfil de resistência desses organismos às drogas padrões, utilizadas no tratamento da esporotricose. Além disso, com o intuito de oferecer novas opções terapêuticas no tratamento da doença, foram testados dois compostos que apresentaram potencial antifúngico em estudos anteriores frente a *Sporothrix* sp.: a Miltefosina, e o extrato de *Schinus terebinthifolius* (aroeira). A produção de melanina é considerada um fator de virulência por conferir resistência a célula do patógeno (CARLOS; SGARBI E PLACERES, 2002), o que pode causar maior dificuldade à ação do sistema imunológico do indivíduo afetado contra este patógeno. A partir desta premissa, foi verificado o potencial de inibição da produção de melanina de *Sporothrix* sp., dos compostos testados neste trabalho. Nesta análise, além de Miltefosina e extrato de *Schinus terebinthifolius*, foram testados seis compostos de tiofeno e extrato de *Anadenanthera macrocarpa* (angico vermelho).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Requalificar isolados do complexo *Sporothrix schenckii* estocados na coleção de Cultura URM através de análises fenotípicas e genotípicas, e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de compostos com potencial bioativo e das drogas de escolha no tratamento da esporotricose, frente a estes isolados.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a viabilidade dos isolados de etiologia clínica estocados na Coleção de Culturas URM;
- Realizar identificação polifásica (clássica e genômica) dos isolados do Complexo *Sporothrix schenckii*;

- Requalificar o acervo de culturas do complexo *Sporothrix schenckii* caracterizados na Coleção de Culturas - Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.
- Determinar a concentração inibitória mínima dos isolados de *Sporothrix* sp. frente a Anfotericina B, Itraconazol, extrato de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) e Miltefosina através de testes de sensibilidade antifúngica padronizados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI);
- Verificar a ação inibitória de compostos de tiofeno (6CN10, LNN-03, LNN-07, LNN-08, LNN-09), miltefosina, e extratos hidroalcoólicos de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) e *Anadenanthera macrocarpa* (angico vermelho), em relação à produção de melanina pelos isolados do Complexo;

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.3.1 Reativação e viabilidade das amostras

Os dados de identificação das amostras fornecidas para esse estudo estão descritos na Tabela 1. Para reativação, as culturas conservadas em óleo mineral (BUELL E WESTON, 1947) foram transferidas para Caldo Glicosado e mantidas à 28°C por três dias. Após crescimento observado por turvação, foram transferidas para meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura (SDA+YE) contidos em tubos de ensaio, e posteriormente mantidas à mesma temperatura.

Para verificar a viabilidade dos isolados fornecidos procedeu-se o método de cultura em lâmina (LACAZ et. al, 2002). Foram feitos repiques das colônias crescidas em SDA+YE, para meio Ágar Batata Dextrose (BDA) em tubos de ensaio, os quais foram mantidos à temperatura ambiente durante 8 dias. Foram consideradas viáveis as culturas que se apresentaram típicas de *Sporothrix* sp., tanto macro quanto micromorfologicamente. As estruturas morfológicas dos isolados foram observadas ao microscópio óptico, em aumento de 400x. As lâminas foram preparadas para observação corando-se um fragmento de colônia em lactofenol azul de algodão (azul de Aman).

Tabela 1- Agentes da esporotricose obtidos a partir da Coleção de Culturas URM.

Código de identificação da amostra	Espécie	Substrato de isolamento	Forma clínica	Ano de incorporação ao acervo
URM 301	<i>Sporotrichum schenckii</i>	-	-	1955
URM 434	<i>Sporotrichum schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	1955
URM 435	<i>Sporotrichum schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	1955
URM 592	<i>Sporotrichum schenckii</i>	-	-	1955
URM 1013	<i>Sporotrichum schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	1958
URM 2439	<i>Sporothrix schenckii</i>	-	-	1977
URM 2865	<i>Sporothrix schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	1997
URM 3311	<i>Sporothrix fungorum</i>	Pele	Cutâneo Linfática	1991
URM 3686	<i>Sporothrix schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	1997
URM 4080	<i>Sporothrix schenckii</i>	-	-	1998
URM 4252	<i>Sporothrix schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	2000
URM 4291	<i>Sporothrix schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	2000
URM 4861	<i>Sporothrix schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	2004
URM 5111	<i>Sporothrix schenckii</i>	Pele	Cutâneo Linfática	2005

Fonte: Micoteca URM

1.3.2 Caracterização fenotípica

A fenotipagem foi baseada na chave de identificação proposta por Marimon et al. (2007) (Tabela 2), que considera os padrões de absorção de fontes de

carbono, diâmetro da colônia em BDA a 30°C e a 37°C (termotolerância) após 21 dias de incubação. Toda essa etapa foi realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Micologia do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Tabela 2- Chave de identificação fenotípica de *Sporothrix* sp proposta por Marimon et al. (2007).

Espécie	Presença de conídios sésseis pigmentados	Colônias excedendo 50 mm de diâmetro em BDA a 30° C em 21 dias	Crescimento a 37 °C	Resultado do teste de assimilação	
				Sacarose	Rafinose
<i>S. albicans</i>	Não	Sim	Sim	+	-
<i>S. brasiliensis</i>	Sim	Não	Sim	-	-
<i>S. globosa</i>	Sim	Não	Não	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sim	Sim	Sim	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sim	Não	Sim	+	+

1.3.2.1 Auxonograma

O auxonograma foi realizado em duplicata, utilizando-se placas de microtitulação de 96 poços, cada um contendo 150 µL de meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB), adicionado do substrato testado a uma concentração de 10%, exceto no poço controle negativo, onde foi adicionado 50 µL do meio em 100 µL de água destilada filtrada; e no controle positivo onde foi adicionado 50 µL do meio em 100 µL de glicose. Para validação do teste, uma cepa padrão de *Rhodotorula* sp. foi usada, devido a sua capacidade de absorver todos os açúcares testados: glicose (controle positivo), sacarose e rafinose (GOLUBEV E SCORZETTI, 2010).

Os inóculos foram padronizados em leitor de microplacas ajustado em 530 nm a uma densidade óptica de 0,21 a 0,29 para atingir uma concentração de 2×10^5 - 2×10^6 UFC/mL. Posteriormente uma suspensão de 50 µL foi adicionada a cada micropoço e as placas foram incubadas a 25°C, e lidas no 5º e no 10º dia após o teste (MARIMON et al., 2007).

1.3.2.2 Morfologia e termotolerância

Para verificar o diâmetro da colônia a 30°C, e termotolerância dos isolados a 37°C, fragmentos da colônia foram adicionados em placas de Petri contendo meio BDA, as quais foram incubadas por 21 dias às respectivas temperaturas (MARIMON et al., 2007).

1.3.3 Caracterização genotípica

1.3.3.1 Extração do DNA

O DNA genômico do fungo foi obtido a partir da fase filamentosa. O processo de extração, baseou-se em Woods et al. (1993), onde um fragmento da colônia foi congelado em nitrogênio líquido, ocorrendo posterior lise mecânica com o auxílio de um “pilão”. Após a lise celular, o DNA passou por um processo de lavagem em tampão N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetano sulfonato (TES) e em clorofórmio álcool isoamílico, sofrendo sucessivas centrifugações e vortexizações, e posteriormente suspenso em acetato de sódio 3M e em etanol absoluto, novamente lavado em álcool 70%, e resuspenso em 50 µL de água destilada miliq, sendo então armazenado a 4°C overnight. O DNA extraído foi então quantificado no NanoVue Plus–GE (USA), e diluído para que se obtivesse 25 ng de peso total.

1.3.3.2 Sequenciamento dos genes CAL e β -tub

Para realização do sequenciamento, as seguintes sequências iniciadoras (“primers”) foram utilizadas: senso CL1 (5’GA(GA) T(AT) CAA GGA GGC CTT CTC-3’) e antisenso CL2A (5’-TTT TTG CATCATGAGTTGGAC-3’) para o gene CAL (O’DONELL et al., 2000), e Bt2-F (5’GG[CT]AACCA(AG)AT(ATC)GGTGC(CT)3’) e Bt2-R (5’ACCCTC(AG)GTGT AGTGACCCTTGGC3’) para o β -tub (GLASS E DONALDSON, 1995).

As condições de PCR utilizadas foram iguais as previamente descritas para amplificação dos genes β -tub e CAL (MARIMON et al. 2006; OLIVEIRA et al., 2010), 95°C por 10 minutos, 38 ciclos a 95°C por 1 minuto, 64,5°C por 50s, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos. O sequenciamento foi realizado nas direções 5’ e 3’ em um volume de reação de 10 µl contendo 4 µl de “premix

terminator”, 100 ng de DNA, 3,2 pMoles de “primer”. O mix da PCR constitui de tampão 10x PCR/KCl, 2,0mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,04mM do mix de dNTPs (Invitrogen), 1U de *Taq* Platinum DNA polimerase (Invitrogen), 10 μ M do Primer Cal senso e 10 μ M do Primer Cal antisenso, e dos Primers Bt2-F e Bt2-R.

As sequências foram editadas pelo programa Sequencher 4.9 Genes Code Corporation. O sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento-LABCEN/CCB (UFPE) e na plataforma de sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/FIOCRUZ). Os isolados foram identificados em nível de espécie através da procura por sequências similares (de similaridade) no GenBank com o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

1.3.4 Testes de sensibilidade antifúngica

Os isolados viáveis de *Sporothrix* sp. foram submetidos a testes de sensibilidade com os antiúngicos utilizados atualmente no tratamento de esporotricose, além de novos compostos bioativos. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) seguiu o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) esterilizado em membranas de 0,22mm (Millipore, Darmstadt, Alemanha), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e pH $7,0 \pm 0,1$ tamponado com 3-[N-morfolino] propano-ácido sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B e itraconazol em concentrações variando de 0,015 a $16 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ 0,125 a $64 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. Para as novas substâncias testadas, utilizou-se uma concentração variando de 0,125 a $64 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para miltefosina e para o extrato *Schinus terebinthifolius* de 0,125 a $64 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As moléculas foram diluídas em DMSO. Os isolados de *Sporothrix* foram mantidos em meio BDA e incubados a 35°C durante 7 dias. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (0,85 g/L), e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 80% a 82% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. O volume do inóculo foi posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3 \text{ céls.mL}^{-1}$. Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos e as placas incubadas a 35°C , durante 48h, antes de ler os resultados para determinação

da CIM frente às drogas padrão e aos novos compostos testados. Para leitura, considerou-se o poço onde não se observou nenhum crescimento discernível (inibição de 100%) do inóculo, como sendo o poço onde ocorreu a CIM.

1.3.5 Produção de melanina

Para realização da produção de melanina seguiu-se o protocolo descrito por Almeida-Paes (2012), com adaptações. Verificamos a inibição da produção de melanina dihidroxinaftaleno (DHN) produzidas pelos isolados de *Sporothrix*, por oito compostos que apresentaram bons resultados em testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro*, pelo método de microdiluição em caldo, realizados previamente: Extrato de *Schinus terebinthifolius* (aroeira); Extrato de *Anadenanthera macrocarpa* (angico vermelho); Miltefosina, composto fosfolpídico e cinco compostos sintéticos derivados do anel aromático do tiofeno caracterizados pelas siglas 6CN10, LNN 03, LNN 07, LNN 08 e LNN 09.

Cada isolado foi padronizado em leitor espectrofotométrico de microplacas, a uma densidade óptica entre 0,21 e 0,29, num comprimento de onda de 530 nm. A partir deste inóculo inicial foram feitas diluições seriadas de 1:2, adicionando-se 100 µL deste em 100 µL de água destilada, e assim sucessivamente até se obter quatro concentrações do inóculo a serem adicionadas na placa, em concentrações decrescentes. Adicionou-se à placa um volume de 10 µL da suspensão de cada inóculo, cada placa contendo três inóculos. O meio utilizado para esse teste foi o meio mínimo em ágar (Glicose 15mM, MgSO₄ 10mM, KH₂PO₄ 29,4 mM, Glicina 13mM e Tiamina 3mM), com pH 5,5 e incubados a 4°C por 3 dias. Um controle positivo foi feito com os isolados inoculados em meio mínimo sem adição dos compostos a serem testados, para detectar a máxima produção de melanina de cada isolado.

Para a verificar ação dos compostos frente a produção de melanina, a concentração inibitória mínima total e sua fração de 50%, obtida nos testes de susceptibilidade antifúngica, foram adicionados ao meio mínimo em placa de Petri, conforme segue: Extratos de *S. terebinthifolius* e *A. macrocarpa* a 4µg/mL e 2 µg/mL; Miltefosina a 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL; Compostos de tiofeno a 8 µg/mL e 4 µg/mL. Após a inoculação nas placas, os isolados foram incubados a 30°C por 7 dias para posterior realização da leitura. Para leitura, verificou-se a inibição de 80 a 100%

da produção de melanina na colônia, apenas em relação aos isolados produtores desse pigmento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPOROTRICOSE E O COMPLEXO *Sporothrix schenckii*

2.1.1 Histórico

Em 1896, Benjamin Robinson Schenck, estudante de medicina da Johns Hopkins Medical School, observou um paciente de 36 anos de idade que apresentava lesão na mão e braço direito e ulcerações no local, as quais ascenderam pelo seu braço após algum tempo. O agente etiológico da doença foi então isolado por Erwin Smith a partir de secreções drenadas dessas lesões, crescendo em meio de cultura, e sistematizado no gênero *Sporotrichum*. Inicialmente, Schenck sistematizou o agente (um fungo) no gênero *Sporotricha* (SCHENCK, 1898). Anteriormente, Linck em 1809, e Lutz em 1889, relataram casos que possivelmente seriam de esporotricose, porém não ocorreu o isolamento do fungo por estes pesquisadores para estes casos (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Em 1900, Hektoen e Perkins isolaram um agente semelhante ao do caso estudado por Schenck, a partir de lesões de um paciente que sofreu um acidente com um martelo, acertando seu dedo (HEKTOEN e PERKINS, 1900). Esse paciente desenvolveu uma ulceração no local do trauma, a qual se apresentava uma depressão central e eritematosa, liberando uma secreção purulenta, e refratária ao tratamento. O agente isolado foi incluído por estes cientistas no gênero *Sporothrix* e, em homenagem a Schenck, a espécie recebe o nome de *Sporothrix schenckii*. O primeiro caso reportado de esporotricose em animal foi descrito no Brasil em 1907, por Lutz e Splendore, onde ratos apresentavam sintomas da doença (LUTZ e SPLENDORE, 1907).

Sporothrix spp. são fungos filamentosos termodimórficos, que vivem como sapróbios na forma filamentosa à temperatura ambiente (25 °C), e como patógenos na fase leveduriforme à 37°C *in vitro* ou em tecidos vivos, tanto em seres humanos quanto em animais (LACAZ et al., 2002; SIDRIM E ROCHA, 2004). Embora nenhum estado teleomórfico seja conhecido para *Sporothrix* sp., diversos estudos

moleculares sugerem que este esteja relacionado filogeneticamente com fungos do gênero *Ophiostoma*, fungos ascomicetos, patógenos de plantas e simbiote de besouros do gênero *Scolytinae* (PAINE et al., 1997; ROMÓN et al., 2007), estando *Sporothrix* mais especificamente relacionado à espécie *Ophiostoma stenoceras* (de MEYER et al., 2008).

A relação entre *Sporothrix schenckii* e *Ophiostoma stenoceras* foi sugerida pela primeira vez em estudos realizados por Mariat et al. (1971; 1975) onde foram consideradas as características morfológicas (esporos pigmentados e triangulares), fisiológicas (crescimento a 35°C) e patogênicas (doença semelhante à esporotricose em hamsters e camundongos) de *Ceratocystis stenoceras* (atualmente *O. stenoceras*), sendo estas consideradas indistinguíveis das características de *Sporothrix schenckii*.

A proximidade filogenética entre *S. schenckii* e *O. stenoceras* foi estabelecida a partir do sequenciamento do gene da região da subunidade 18S do RNA ribossomal desses dois organismos (BERBEE E TAYLOR, 1992). O trabalho mostrou que essa região é idêntica em ambos, apresentando diferença em apenas três sítios. Esta foi a primeira vez que um fungo assexuado (*S. schenckii*) foi posicionado filogeneticamente num gênero sexuado (*Ophiostoma*), a partir de análises moleculares.

Os resultados desse estudo foram confirmados posteriormente, dessa vez a partir do sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do operon do RNA ribossomal de diferentes isolados de diferentes espécies de *Ophiostoma*, e de isolados ambientais e clínicos de *Sporothrix* sp., confirmando a proximidade filogenética de *Sporothrix* spp. com *O. stenoceras* (de BEER et al., 2003). Desde então, o sequenciamento da região ITS tem sido utilizado como importante ferramenta no estabelecimento da relação entre *Sporothrix* sp. e *Ophiostoma stenoceras*, como demonstrado em estudo realizado por Zhou et al. (2013).

de Beer et al. (2003) sugerem em seu estudo que *Sporothrix schenckii* pode não ser constituído de apenas uma espécie, sendo esse último dado confirmado em estudos moleculares realizados por Marimon e colaboradores (2006; 2007; 2008a), após analisados isolados de Coleções de Cultura de diversas instituições ao redor do mundo, formalmente identificados como *Sporothrix schenckii*, ou como espécies sinonímias.

No estudo realizado em 2006 foram analisadas 60 amostras, sendo 29 destas de Coleções de Cultura brasileiras, das quais 18 eram relacionadas a um surto de esporotricose transmitida por gatos (SCHUBACH et al., 2005). Foram feitas análises de três diferentes *loci* codificadores das proteínas quitina sintetase, beta-tubulina e calmodulina, das quais o sequenciamento do gene CAL demonstrou melhores resultados em termos de identificação, sendo possível a amplificação de 776 pares de base desse gene. Ao final desse estudo, se constatou a presença de 29 diferentes genótipos, sendo mostrados na árvore formada 14 nós, representando 6 espécies filogenéticas putativas.

Em 2007, Marimon e colaboradores analisaram 127 isolados identificados como *Sporothrix schenckii*, *S. schenckii* var. *luriei*, e espécies consideradas sinonímias de *S. schenckii* (*S. albicans*, *Sporotrichum tropicale* e *Dolichoascus schenckii*). Foram correlacionados os resultados das análises morfológicas e fisiológicas de *S. schenckii*, aos resultados das análises moleculares baseados no sequenciamento do gene CAL, diferentemente do que foi feito no estudo de 2006, onde três genes foram sequenciados. Ao final do estudo foi possível a diferenciação de três novas espécies causadoras da esporotricose denominadas *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*.

Além da identificação destas novas espécies, foi constatado que o gene CAL se apresenta como um bom marcador para o reconhecimento de espécies de *Sporothrix*, e que *S. albicans*, *S. inflata* e *S. schenckii* var. *luriei* são espécies diferentes de *S. schenckii* (MARIMON et al., 2007). Neste trabalho foi proposta uma chave de identificação de espécies do Complexo *Sporothrix* baseada nas características morfofisiológicas destas espécies.

Em 2008, Marimon e colaboradores utilizaram os mesmos primers utilizados no estudo de 2006 (quitina sintetase, beta-tubulina e calmodulina), além de realizarem testes fenotípicos de assimilação e crescimento em temperaturas variadas. Ao final do estudo, mostrou-se uma clara separação genética de *Sporothrix* var. *luriei* das outras espécies que compõem o complexo *Sporothrix schenckii*. Essa separação se mostra bastante acentuada no que diz respeito às características fenotípicas dessa espécie, como por exemplo, a ausência de conídio séssil e pigmentado, característicos das demais espécies do complexo, e a presença de conídios longos.

Em 2012, Oliveira e colaboradores desenvolveram um protocolo para identificação de novas espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, baseado na PCR

do primer T3B, o qual foi comparado com o sequenciamento do gene CAL. Ao final da análise de 35 isolados de *Sporothrix* por essa metodologia, a qual foi repetida três vezes em dois diferentes laboratórios sob as mesmas condições, encontrou-se uma boa reprodutibilidade, onde foram identificadas as espécies *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. schenckii* e *S. globosa*, sendo todas as PCR's do primer T3B concordantes com o sequenciamento parcial do gene CAL.

Desde a caracterização de *Sporothrix schenckii* como um complexo de espécies, demonstrada nos estudos de Marimon e colaboradores, diversos estudos epidemiológicos da esporotricose têm relatado a presença dessas novas espécies ao redor do globo.

2.1.2 Epidemiologia

A esporotricose é considerada uma micose de ampla distribuição mundial, com casos registrados desde 1898 em diversos países como, EUA, França, Rússia, México, Portugal, Japão, Índia, Peru e outros países da Europa e América do Sul, inclusive o Brasil (SIDRIM E ROCHA, 2004).

Segundo Chakrabarti et. al. (2014), devido a mudanças emergentes em sua epidemiologia, distribuição, evolução taxonômica e múltiplos surtos, a esporotricose tem emergido como a maior infecção fúngica nas últimas duas décadas.

Esses múltiplos surtos vêm sendo relatados ao longo dos tempos, porém não apresentando grandes proporções, limitando-se a casos isolados e pequenos surtos em grupos específicos como: famílias, trabalhadores rurais, laboratoristas, profissionais de saúde (OLIVEIRA et. al., 2011), expostos a fontes de infecção como matéria orgânica em decomposição, solo, materiais perfuro-cortantes contaminados e animais infectados (HAJJEH et. al., 1997; KOVARIK E NEYRA, 2007; OLIVEIRA et. al., 2013a), caracterizando-se como uma doença associada a atividades laborais e as condições sociais e ambientais da região (QUEIROZ-TELLES, 2011).

Apesar da baixa incidência da esporotricose na Europa (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010), muitos casos desta doença vêm sendo registrado em animais e em humanos nos últimos anos naquele continente (CHAKRABARTI et. al., 2014). Baseados nesses dados, Romeo, Scordino e Criseo (2011) realizaram uma análise de 26 amostras de *Sporothrix* sp., das quais duas amostras clínicas foram originalmente isoladas na Itália (CRISEO E ROMEO, 2010),

e as demais amostras, ambientais e clínicas, eram de diferentes países de origem, inclusive do Brasil, das quais todos os sete isolados identificados pelo sequenciamento do gene CAL pertenciam à espécie *Sporothrix brasiliensis*, corroborando para a comprovação da endemidade desta espécie no país. Das demais amostras analisadas por essa metodologia, em todas foram identificadas novas espécies do complexo *Sporothrix*, mostrando a grande distribuição e diversidade que apresenta este complexo de espécies no mundo. Na Europa, a Itália é o país com maior número de casos da doença registrados (CAFARCHIA, 2007; CRISEO, ZUNGRI E ROMEO 2008), porém ocorrem casos registrados em outros países como França (MAGAND et al., 2009) e Portugal (DIAS et al., 2011) onde o agente causador da esporotricose foi identificado como sendo da espécie *Sporothrix mexicana*. Neste último caso o paciente apresentava lesões ulcerosas nos pés após viagem à Malásia.

Nas Américas do Norte e do Sul, a esporotricose apresentou um número significativo de casos nas últimas décadas, sendo a micose subcutânea mais comum nesses continentes, mostrando-se uma doença hiperendêmica no Sul dos montes Andinos (NEYRA et. al., 2005).

Em estudo realizado na Venezuela por Camacho et. al. (2015), observou-se que entre 30 isolados clínicos de *Sporothrix* spp., coletados de casos de esporotricose que datavam de 1973 a 2013, dez foram identificados como pertencente à espécie *S. globosa*, o que corresponde ao maior número de casos causados por essa espécie nas Américas.

Em 1988, nos EUA, foi registrado um surto de esporotricose em pessoas que foram expostas a um tipo de musgo contaminado com *Sporothrix* sp., sendo contabilizado um total de 84 casos distribuídos entre 15 estados (DIXON et. al., 1991). Esse foi o maior surto de esporotricose registrado no país.

Os primeiros casos no Brasil datam do início do século 20 e desde então, vem acometendo homens, gatos, e cães em menor escala (CRUZ, 2013). Desde 1990 números significativos de casos da doença foram registrados, especialmente no Rio de Janeiro (BARROS, ALMEIDA-PAES, SCHUBACH, 2011).

Na região Sudeste do Brasil, em decorrência da existência de gatos como reservatórios de *Sporothrix* spp. que eventualmente venham a inocular o fungo nos indivíduos através de arranhaduras ou mordeduras, casos de esporotricose têm sido frequentes, sendo esta a principal via de infecção da esporotricose no Brasil, com

casos registrados não só no Estado do Rio de Janeiro, onde ocorre o maior número de casos (BARROS et. al., 2004), mas também no Rio Grande do Sul (MADRID et. al., 2011; NOBRE et. al., 2001), e São Paulo (MARQUES et. al., 1993) . Este dado difere das características de surtos ocorridos em outros países, nos quais as fontes de infecção consistem, na maioria dos casos, em plantas contendo o fungo (OLIVEIRA et. al., 2011). Em 2010, Oliveira e colaboradores descreveram um caso de esporotricose no estado do Rio de Janeiro, em uma mulher 77 anos de idade, causada por *Sporothrix globosa*, sendo constatado o agente etiológico da doença após análise molecular baseada no sequenciamento do gene CAL (OLIVEIRA et al., 2010).

Os agentes da esporotricose não têm predileção por idade ou gênero, contudo, sua incidência pode variar, quanto a estes critérios, de região para região (LOPES-BEZERRA, 2006). Pode-se verificar a ocorrência deste dado quando se compara dois estudos epidemiológicos realizados no Peru (PAPPAS et al. 1999) e no Japão (FUKUSHIRO, 1984). No primeiro, foram estudados 238 casos de esporotricose registrados na região montanhosa central e sul do Peru. Nesse estudo se constatou que a maior incidência de esporotricose se dava em indivíduos do sexo masculino. No estudo realizado no Japão, a maior incidência da doença ocorreu em pacientes do sexo feminino. Ambos os estudos concordaram quanto a região do corpo mais frequentemente afetada, face, e quanto a faixa etária mais atingida, crianças e idosos.

Diferentemente de outras micoses invasivas como a criptococose e a coccidioidomicose, a esporotricose apresenta baixos índices de mortalidade, o que ocorre algumas vezes em pacientes que apresentam a forma extracutânea da doença (PAPPAS et al., 1999), sua manifestação clínica menos frequente.

2.1.3 Manifestações clínicas

A esporotricose é uma micose subcutânea que pode afetar tanto imunocompetentes quanto imunocomprometidos, podendo apresentar manifestações clínicas diferentes entre os indivíduos acometidos. Em imunocomprometidos, apresenta-se como micose oportunista podendo apresentar diversas manifestações clínicas como cutânea disseminada, fungemia e visceral disseminada (KAUFFMAN, 2007).

De forma geral, a esporotricose apresenta basicamente quatro formas clínicas bastantes características: linfocutânea ou cutânea linfática, disseminada, cutânea-localizada ou fixa e extracutânea ou visceral (SIDRIM E ROCHA, 2004). Porém, Lopes-Bezerra; Schubach e Costa (2006) trazem uma classificação mais detalhada dessas manifestações clínicas da esporotricose, considerando não apenas a disposição das lesões causadas, mas também o local da lesão. Segundo esta classificação, as manifestações da esporotricose são: Cutânea, subdividida em linfocutânea, fixa e disseminada ou múltipla; Mucosa, subdividida em ocular, nasal e outras; Extracutânea, subdividida em pulmonar, osteoarticular, meningeal e generalizada; residual, deixando sequelas; e Formas especiais, que apresentam regressão e hipersensibilidade.

A forma linfocutânea da doença é a mais comum, constituindo-se em cerca de 70 a 80% dos casos de esporotricose em humanos (CHAPMAN, 2003), porém é rara nos Estados Unidos (LYON, et al. 2002). A maioria dos indivíduos afetados são imunocompetentes ligados a atividade de agricultura, paisagismo, jardinagem, caça, mineração e outras atividades ao ar livre, estando ligada também a transmissão zoonótica via arranhões de gatos, cães em menor escala, e de tatus infectados com o agente da doença (QUEIROZ-TELLES, 2011). Caracteriza-se pela ascensão de lesões gomosas subcutâneas, seguindo trajeto linfático a partir do ponto de inoculação do fungo na pele, via lesão perfurante (o qual se apresenta como um nódulo), quadro denominado linfangite nodular ascendente.

A forma cutânea localizada ou fixa da esporotricose é menos frequente que a forma linfocutânea da doença, porém não é incomum sua ocorrência. Por isso, deve-se levar em consideração o histórico do paciente que apresente lesão característica, como viagem e ocupação. Estes dados são extremamente relevantes, pois podem ajudar no diagnóstico diferencial desta forma clínica da esporotricose, visto que, a lesão ulcerativa que se apresenta nessa manifestação clínica (nódulo ou placa de aparência granulomatosa ou verrucosa) se mostra semelhante a lesões ulcerativas de outras doenças, tais como leishmaniose, e outras infecções fúngicas (MAHLBERG, et al., 2009). Apresenta-se como a segunda manifestação clínica mais frequente da doença, abrangendo aproximadamente 20% dos casos, e acredita-se estar associada a uma sensibilização inicial do indivíduo ao fungo em áreas endêmicas (ZANCOPE-OLIVEIRA, 2015).

A forma extracutânea e a cutânea disseminada estão geralmente associadas a algum tipo de imunossupressão do indivíduo, sendo consideradas um sinal clínico de pacientes que apresentam taxas muito baixas de linfócitos CD₄, como os HIV-positivos (CHANG, et al., 2013), como nos casos relatados por Gutierrez-Galhardo et al. (2008), em que dois pacientes HIV-positivos apresentaram esporotricose disseminada como resposta a um quadro que se manifesta após tratamento antiretroviral altamente ativo chamado síndrome da reconstituição inflamatória imune.

Além dessa condição, o diabetes, alcoolismo, uso de esteróides, neoplasias, por serem fatores que afetam a ação do sistema imune, também contribuem para manifestação destas formas clínicas da esporotricose nestes indivíduos (ROMERO-CABELLO et al., 2011). Em ambas as condições, a disseminação da doença se dá via hematogênica (ESTEVES, et al., 2014).

Na forma cutânea disseminada (ou multifocal) ocorre formação de lesões subcutâneas que, posteriormente, podem formar ulcerações fagedênicas, lesões acneiformes, placas enrijecidas ou crostas, no estágio final da AIDS (RAMOS-E-SILVA et al., 2007). Além do acometimento cutâneo, a forma disseminada da esporotricose pode levar a quadros como febre, dor, mal-estar e perda de peso (ROMERO-CABELLO et al., 2011), ocorrendo em alguns casos envolvimento visceral, afetando estruturas mucosas como olhos e boca (ROMERO-CABELLO et al., 2011; SILVA-VERGARA et al., 2012); meninges e pulmão, podendo levar o indivíduo a óbito (RAMOS-E-SILVA et al., 2007); e ossos e articulações (principalmente joelhos), e em casos raros, osteomielite (LEDERER; SULIVAN E CRUM-CIANFLONE, 2016).

Silva-Vergara e colaboradores (2012) relatam a ocorrência de endocardite causada por *Sporothrix brasiliensis*, em um indivíduo de 32 anos, HIV-positivo. A presença do fungo foi constatada após cultura do fragmento da válvula mitral, a qual havia apresentado processo granulomatoso e supurativo após exame histopatológico. A caracterização do agente etiológico se deu a partir de estudos fenotípicos e sequenciamento do gene CAL

Apesar de se manifestar com maior frequência em indivíduos imunossuprimidos, esse quadro clínico da esporotricose pode acometer, de forma extremamente rara, indivíduos imunocompetentes, como em caso relatado por Yap (2011), em que uma paciente de 70 anos apresentava lesões nodulares na face e

nos membros a cerca de seis meses, além de sintomas característicos de outras infecções causadoras de lesões nodulares como a tuberculose, exceto presença de tosse crônica, não tendo histórico de contato com pacientes com tuberculose. A partir da cultura de material coletado das lesões na pele, foi constatada a presença de *Sporothrix schenckii*.

A forma extracutânea da esporotricose é uma manifestação oportunista, assim como a forma disseminada da doença, que pode acometer órgãos importantes como pulmões, ossos e articulações; olhos, meninges e outras estruturas do sistema nervoso central, apresentando difícil diagnóstico devido à ausência ou escassez de lesões na pele do indivíduo afetado (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; RAMOS-E-SILVA et al., 2007).

A forma osteoarticular é a mais frequente da esporotricose extracutânea, podendo ocorrer artrite inflamatória, levando à destruição da articulação devido ao atraso no diagnóstico (BARROS et al., 2011; MAHAJAN et al., 2014), e osteoporose de ossos adjacentes, afetando geralmente tíbia, ossículos do carpo, radio, ulna, crânio e ossos da face, raramente apresentando lesões cutâneas (LOPEZ-ROMERO et al., 2011; MAHAJAN, 2014; ROSELY-ZANCOPE et al., 2011). As articulações geralmente acometidas são: pulsos, cotovelos, joelhos e cintura pélvica (GEWEHR et al., 2013; MAHAJAN et al., 2014; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011), podendo levar a quadros de tenosinovite com ou sem síndrome do túnel carpal, associada à inoculação profunda (RAMOS-E-SILVA, 2007), osteomielite e bursite (BARROS et al., 2011; MAHAJAN et al., 2014).

O acometimento pulmonar da esporotricose extracutânea é raro, e ocorre pela inalação de conídios de *Sporothrix* sp. (MAHAJAN, 2011), não sendo causada pela disseminação do fungo via hematogênica (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011). Seu quadro clínico apresenta bastante semelhança com a tuberculose (BASHIR et al., 2012) devido à ocorrência de tosse crônica, febre baixa, perda de peso, cavitação pulmonar uni ou bilateral e linfadenopatia hilar.

A manifestação ocular da esporotricose ocorre por infecção exógena, ou por disseminação do fungo pela via hematogênica, podendo se apresentar inicialmente como uma conjuntivite (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011), e pode afetar anexos do globo ocular como pálpebras, sombrancelhas, conjuntiva e glândulas lacrimais (SOTO, 2015), quadro conhecido como dacriocistite, inflamação que ocorre predominantemente em mulheres adultas e crianças (FREITAS et al., 2013).

A forma mucosa da doença afeta estruturas como boca, faringe, laringe e nariz, causando lesões exantemáticas, supuração e ulceração dessas estruturas, podendo ser causada por infecção direta ou por disseminação pela via hematogênica. A forma ocular da esporotricose é considerada por Lopes-Bezerra, Schubach e Costa (2006) como um subtipo da forma mucosa, porém Ramos-e-Silva (2007) e Zancoppe-Oliveira et al. (2011) consideram a forma ocular e a forma mucosa da esporotricose como dois subtipos distintos da esporotricose extracutânea.

O acometimento do sistema nervoso pode ocasionar desde meningite a alterações do estado mental do indivíduo afetado, porém é um quadro extremamente raro da manifestação extracutânea (MAHAJAN, 2014).

Freitas et al. (2014), relatam quatro casos de pacientes HIV-positivo que apresentavam comorbidade com esporotricose, onde um deles foi diagnosticado com meningite devido à infecção fúngica. Após submetidos à punção lombar, três deles tinham em seu fluído cérebro espinhal o agente da esporotricose, o qual foi identificado posteriormente utilizando o marcador molecular T3B, como *Sporothrix brasiliensis*. Esta espécie é considerada bastante agressiva em pacientes imunossuprimidos, devido a fatores de virulência que permitem a sua penetração no tecido do hospedeiro.

2.1.4 Patogenia

A fase patogênica de *Sporothrix* sp. é a fase leveduriforme do fungo, porém sua fase infecciosa ocorre em sua forma filamentosa (LACAZ et al., 2002; SIDRIM E ROCHA, 2004).

Figueiredo et al. (2004) afirma que, para disseminar e infectar diferentes órgãos, microrganismos devem ser capazes de vencer a linha celular endotelial vascular, aderindo às células endoteliais, e migrando através do endotélio, penetrando na matriz subendotelial.

Lima et al. (1999) afirmam que as principais barreiras a serem vencidas são o endotélio e as membranas basais do hospedeiro. Nesse mesmo estudo se constatou que ambas as morfologias de *Sporothrix* sp. são capazes de aderir a proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina e colágeno tipo II, e das membranas basais, a laminina.

Figueiredo et al. (2004) utilizando culturas *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC'S) verificaram que, a interação entre células leveduriformes de *Sporothrix* sp. são mediadas por citocinas, que por sua vez, modulam a expressão de moléculas de adesão da superfície celular do endotélio (BALKWILL E MANTOVANI, 2001; LETTERIO E ROBERTS, 1998). A partir dos resultados desse estudo, os autores concluíram que os receptores celulares modulados pelas citocinas interleucina 1- β (IL1- β) e *transforming growth factor*- β (TGF- β), podem contribuir na interação entre células leveduriformes de *Sporothrix* sp. e o endotélio. O mesmo estudo sugere que a interação de *Sporothrix* sp. e células endoteliais tem colaboração dos cátions Ca^{++} e Mg^{++} , e que células leveduriformes do patógeno podem ser encontradas no interior de células endoteliais, após um período de uma hora.

Em estudo realizado por Figueiredo et al. (2007), foi investigado se a interação demonstrada em estudo anterior, entre leveduras de *Sporothrix* sp. e células do endotélio, apresentaria alguma influência no que diz respeito à disseminação do fungo no hospedeiro. Ao final do estudo, os autores constataram que, a citocina TGF- β 1 promove um aumento na migração do fungo através das camadas endoteliais, e que esta inibe a internalização do fungo. Esta migração, segundo os autores, se daria por uma via paracelular, visto que maior parte das moléculas constituintes da superfície endotelial que são reconhecidas por *Sporothrix* sp. não é modulada por essa citocina, que promove uma exposição da matriz subendotelial, permitindo a adesão do fungo às camadas endoteliais. Os autores desse estudo ainda sugerem que, a capacidade de migração do fungo transpondo a barreira endotelial, deve-se ao fato de citoadesinas expressadas na parede celular deste se ligarem às proteínas produzidas na matriz extracelular, fibronectina e laminina (LIMA et al., 1999).

Diversos estudos têm demonstrado que, alguns fatores de virulência e patogenicidade do agente etiológico da esporotricose se encontram em proteínas e lipídios que compõem a parede celular do fungo, exercendo este último componente um papel importante na patogênese da micose, inibindo o processo fagocítico de macrófagos (CARLOS et al., 2002; SGARBI, 1997).

2.1.5 Diagnóstico Clínico

Na esporotricose a observação das características clínicas é necessária, sejam elas relacionadas a qualquer das manifestações da doença (linfocutânea, cutânea fixa, cutânea disseminada ou extracutânea).

A manifestação das diferentes formas clínicas da esporotricose estão relacionadas principalmente às condições imunológicas do indivíduo, bem como à sensibilização deste ao agente etiológico em áreas endêmicas, como no caso da forma cutânea fixa (ZANCOPÉ, 2015).

Portanto, é importante que o profissional de saúde obtenha o histórico clínico do indivíduo que apresente lesões típicas da esporotricose, bem como seu perfil socio-econômico, o que poderá facilitar o diagnóstico da doença.

A observação dessas medidas também é interessante no que diz respeito aos diagnósticos diferenciais da esporotricose, como é o caso da leishmaniose, paracoccidioidomicose, cromoblastomicose, blastomicose, tuberculose, sífilis primária, tularemia e micobacterioses (RAMOS-E-SILVA, 2007).

Diversas ferramentas têm sido empregadas no diagnóstico da esporotricose, sendo elas manuais ou automatizadas, todas elas fornecendo dados importantes no que diz respeito não só ao tratamento em si, mas também ao fornecimento de dados epidemiológicos da doença.

2.1.6 Diagnóstico Laboratorial

2.1.6.1 Morfologia

A forma mais confiável para o diagnóstico definitivo da esporotricose, considerada o padrão ouro, é a observação das estruturas macro e micromorfológicas de *Sporothrix* spp., o que é possível mediante isolamento do fungo em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) ou Batata Dextrose Ágar (BDA) a 25°C, num período de incubação de 3 a 5 dias (SIDRIM E ROCHA 2004; RAMOS-E-SILVA et al., 2007).

O isolamento do agente pode ser feito a partir de fluídos corporais como punção ganglionar no caso da forma linfocutânea, da forma disseminada, ou da forma localizada; e pus, escarro, líquido sinovial, no caso da forma visceral, dependendo do órgão afetado; ou ainda a partir de fragmento de biópsia.

Inicialmente, a colônia filamentosa apresenta-se hialina, desenvolvendo com o tempo rugas e dobras, podendo ocorrer produção de melanina, o que torna a cor inicialmente creme da cultura em uma cor marrom escura (MAHAJAN, 2014; LACAZ et al., 2002).

Para observação das estruturas micromorfológicas de *Sporothrix* sp., é realizada técnica de cultura em lâmina, onde um fragmento da colônia é colocado sobre a lâmina de vidro, sendo corado preferencialmente em lactofenol azul de algodão. Ao aumento de 400x no microscópio óptico, é possível observar as estruturas micromorfológicas típicas de *Sporothrix* sp.: filamentos micelianos hialinos, septados, bastante ramificados e medindo cerca 1,5 a 2 μ m de espessura, podendo apresentar ao longo destes conídios simpodiais demáceos ou hialinos, terminais, em formato arredondado (ovalado), fusiforme ou piriforme, em disposição floral lembrando uma “margarida”, ou ligados diretamente aos filamentos micelianos lateralmente, podendo medir de 2 a 6 μ m (SIDRIM E ROCHA, 2004). Para obtenção da fase leveduriforme de *Sporothrix* sp., se faz necessária a incubação do fungo a uma temperatura de 35 a 37°C em meio enriquecido, tais como: Infusão de Cérebro e Coração (BHI), Ágar Chocolate ou Ágar Sangue, por um período de 5 a 7 dias, sendo por vezes necessário, dependendo do isolado, realizar diversos subcultivos e aumentar o período de incubação para que a termoconversão ocorra (BARROS, PAES E SCHUBACH, 2011).

A observação do material coletado de paciente com suspeita de esporotricose ao exame direto, Sidrim e Rocha (2004) afirmam que, é difícil encontrar o parasito, visto que a fase leveduriforme de *Sporothrix* sp. apresenta formas variáveis.

Este procedimento se dá a partir da clarificação do material coletado, pelo hidróxido de potássio a 10%, porém não apresenta a confiabilidade diagnóstica presente no cultivo do fungo em meio de cultura e posterior observação de suas estruturas macro e micromorfológicas, devido à escassez, de células leveduriformes presentes na amostra (MAHAJAN, 2014).

Exames histopatológicos também são ferramentas importantes na obtenção do diagnóstico da esporotricose, a partir da coloração de esfregaços pelas técnicas de Gram, Giemsa, Ácido Periódico de Schiff (PAS), Hematoxilina e Eosina, Tricômico de Gomori ou Metenamina Prata (CRUZ, 2013). A partir de preparações coradas pelo PAS podem ser evidenciadas células globosas atípicas, devido a uma cápsula que reage positivamente ao ácido, lembrando células de *Cryptococcus*

neoformans (BARROS, PAES E SCHUBACH, 2011). Nesta preparação, uma estrutura radiada formada de material eosinofílico cercado a célula fúngica, denominada corpo asteroide, pode ser encontrada. Esta estrutura raramente encontrada nesse exame, é formada devido à deposição de proteínas, e é responsável pela reação antígeno e anticorpo (RAMOS-E-SILVA, 2007), e na esporotricose se encontra fora da célula, o que caracteriza a doença, pois corpos asteroides em outras infecções se apresentam no interior de células gigantes (SIDRIM E ROCHA, 2004). O exame histopatológico não é específico pois mimetiza outras inflamações granulomatosas, como a que ocorre na esporotricose (MAHAJAN, 2014).

2.1.6.2 Diagnóstico Molecular

O isolamento do fungo em meio de cultura é considerado o método “padrão ouro” para o diagnóstico da esporotricose. Entretanto, esse método pode apresentar problemas em alguns casos, devido ao tempo de crescimento ser relativamente lento, e também devido a possibilidade de contaminação da cultura, o que pode levar a uma confusão ao se emitir o diagnóstico (STEVENS, 2002).

Reiss (2002) afirma que testes não-cultura são necessários para realizar um diagnóstico oportuno de infecções fúngicas invasivas e para selecionar terapia apropriada, o que se torna difícil se usado apenas a cultura para fechar o diagnóstico, devido à baixa especificidade da técnica no que diz respeito à identificação de espécies do complexo.

Assim, a ferramenta molecular se torna importante no diagnóstico rápido da esporotricose e também em casos de não isolamento em cultura devido à baixa carga fúngica ou devido a infecções secundárias (BARROS, PAES E SCHUBACH, 2011).

Além disso, estudos recentes têm sugerido que a sensibilidade antifúngica e a virulência, bem como os mecanismos de lesão, diferem entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (OLIVEIRA, 2014).

Métodos diagnósticos da esporotricose, baseados na biologia molecular, são escassos até agora (BARROS, PAES E SCHUBACH, 2011; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2015).

Um dos estudos pioneiros no desenvolvimento do diagnóstico molecular de infecções fúngicas foi realizado em 1995 por Sandhu e colaboradores, no qual foram desenvolvidas 21 sondas de ácido nucleico específicas, as quais tinham como alvo a maior subunidade de genes rRNA de diversos fungos patógenos.

Hu et al. (2003) desenvolveram um protocolo de uma *Nested* PCR para detecção de *Sporothrix schenckii* usando a sequência do gene 18S do rRNA como alvo. Os resultados mostraram que a PCR pôde detectar o total de DNA de uma Unidade Formadora de Colônia (UFC) de *S. schenckii* em amostras de tecidos. O estudo demonstrou altas sensibilidade e especificidade, comprovando a eficácia desse método no diagnóstico da esporotricose.

Usando como marcador a região ITS do rRNA, Zhou et al. (2012) identificaram 124 isolados (68 clínicos e 54 ambientais) identificados morfológicamente como *Sporothrix* e *Ophiostoma*. Ao final do estudo, os autores concluíram que ITS é suficiente para distinção de espécies de *Sporothrix* clinicamente relevantes.

Após os estudos de Marimon et. al. (2006, 2007, 2008), a partir dos quais novas espécies patogênicas do gênero *Sporothrix* foram estabelecidas, diversos estudos objetivando a identificação molecular do agente da esporotricose se basearam no sequenciamento do gene CAL (CAMACHO, 2015; DIAS, 2011; OLIVEIRA, 2010, 2013b, 2014, 2015).

Rodrigues, de Hoog e Camargo (2015) desenvolveram um painel de novos marcadores, baseado na sequência do gene CAL, que permite a identificação de espécies do Complexo, e de seu teleomorfo, *Ophiostoma*. Nesse estudo foi desenvolvido um modelo animal de esporotricose disseminada com o objetivo de otimizar a PCR para detecção de espécimens clínicos de *Sporothrix* onde, a partir dos tecidos desses animais, foram detectados DNA de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*.

2.1.7 Tratamento

Apesar de sua grande distribuição global e de suas diferentes manifestações clínicas, a esporotricose não apresenta grande complexidade em seu tratamento, porém este pode apresentar um período prolongado, o que o torna dispendioso (MAHAJAN et al., 2014). Itraconazol é considerada a droga de escolha no tratamento da esporotricose, especialmente em sua forma linfocutânea

(KAUFFMAN; HAJJEH E CHAPMAN, 2000), porém o iodeto de potássio continua sendo amplamente utilizado no tratamento desta manifestação clínica, devido sua alta eficiência, baixo custo, fácil administração e poucos efeitos colaterais (BONIFAZ E VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, 2013). Na forma extracutânea da doença o itraconazol também pode ser utilizado, porém anfotericina B apresenta maior efetividade no tratamento dessa manifestação clínica da micose (KAUFFMAN; HAJJEH E CHAPMAN, 2000). Outras drogas também utilizadas no tratamento da esporotricose são o fluconazol e a terbinafina, porém em casos de menor complexidade da doença (MAHAJAN et al., 2014).

2.1.7.1 Susceptibilidade antifúngica *in vitro*

Com o objetivo de se obter uma maior especificidade no tratamento de doenças causadas por micro-organismos como bactérias e fungos, os testes de sensibilidade *in vitro* se constituem em uma ferramenta eficaz. Os protocolos publicados pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) são os guias mais utilizados na realização de testes de sensibilidade de microrganismos pelo método de microdiluição em caldo, sendo o EUCAST EDef 9.3 e o CLSI M38-A2 utilizados especificamente para realização desse teste com *Sporothrix* sp em sua fase filamentosa (EUCAST Edef 9.3, 2015; CLSI M38-A2, 2008).

Através dessa metodologia, verifica-se a menor concentração da molécula capaz de inibir o crescimento do fungo. Esta concentração é conhecida como Concentração Inibitória Mínima (CIM) da molécula avaliada. O estabelecimento de *Sporothrix* sp. como um complexo de espécies sugere que, dentre as diferentes espécies deste complexo existem diferentes padrões de sensibilidade frente aos antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose. Essa hipótese pôde ser confirmada em trabalho realizado por Marimon et al. (2008a), onde foi verificado o perfil de susceptibilidade antifúngica de diferentes espécies do Complexo *S. schenckii*, sendo testados 12 antifúngicos frente a diferentes cepas de cinco espécies do complexo. Nesse teste, apenas as CIMs obtidas para fluconazol e micafungina foram iguais (128 e 256 µg/mL, respectivamente). As demais CIMs obtidas para cada droga frente às diferentes espécies do complexo, apresentaram variação, sendo *S. mexicana* a espécie que apresentou maior resistência aos

fármacos testados, exceto à terbinafina, antifúngico que apresentou o menor CIM no teste.

Outro trabalho com o mesmo viés foi desenvolvido por Oliveira, D., et al. (2011), onde foram testadas cepas de *S. schenckii*, *S. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. luriei*, frente a oito antifúngicos entre compostos azólicos, equinocandinas e anfotericina B. Foi constatada resistência dos isolados de *S. luriei* e *S. albicans* aos compostos azólicos e à caspofungina, porém estes isolados foram sensíveis à anfotericina B e à terbinafina. *S. schenckii*, isolados apenas de humanos, foram resistentes a fluconazol e caspofungina. *S. brasiliensis* também foi resistente ao fluconazol, e caspofungina. Esses estudos demonstram mais uma vez a importância da identificação das espécies formadoras do complexo *Sporothrix schenckii*, pois esta pode indicar o melhor direcionamento terapêutico da doença, visto que as diferentes espécies podem apresentar padrões de sensibilidade distintos. Também ficou evidenciada a eficácia da Terbinafina frente às diferentes espécies do complexo, bem como a da anfotericina B, porém esta apresenta maior toxicidade em relação à Terbinafina.

Apesar de se apresentar como uma ferramenta usada para se verificar qual a terapêutica adequada a ser adotada, utilizando-se o documento CLSI M38-A2 como referência, não se tem nenhum conhecimento da correlação entre os resultados dos testes *in vitro* e o efeito clínico do fármaco aplicado no tratamento (BUSTAMANTE E CAMPOS, 2010).

Estudos da ação de diferentes compostos que apresentam potencial antifúngico têm sido desenvolvidos, tendo obtido resultados interessantes frente a isolados de *Sporothrix* sp., o que pode fornecer mais opções no tratamento da esporotricose no futuro (BRILHANTE, 2014b; COUTO, 2015; WALLER, 2016a; 2016b).

2.1.7.2 Novas alternativas terapêuticas

Apesar de antifúngicos padrões como itraconazol, anfotericina B e terbinafina continuarem sendo utilizados no tratamento da doença, apresentando sucesso terapêutico, o tratamento antifúngico a partir do uso desses fármacos apresenta-se dispendioso, e resistência a essas drogas tem sido observada (BUSTAMANTE E

CAMPOS, 2010), o que demanda o estudo de novas alternativas no tratamento da esporotricose.

Trabalhos de grande relevância, no que concerne a busca de novos compostos para este fim, têm sido publicados nos últimos anos, apresentando resultados significativos.

Em 2014, Brilhante e colaboradores testaram um composto fosfolipídico conhecido por Miltefosina, utilizado na quimioterapia anti-protozoária da leishmaniose, frente a isolados de *Sporothrix* sp. e *Histoplasma capsulatum*. Os resultados mostraram que a variação da CIM para Miltefosina frente aos isolados de *Sporothrix* foi de 0,25-2 µg/mL, mais especificamente de 0,5-0.125 µg/mL para *S. brasiliensis*, de 0,5-1 µg/mL para *S. schenckii*, de 0,5-2 µg/mL para *S. mexicana* e 1-2 µg/mL para *S. globosa*. Os resultados deste estudo demonstram que a Miltefosina apresenta uma ação antifúngica relevante, pois apresentou eficácia contra diferentes espécies do complexo, apresentando pouca variação nas CIMs de uma espécie para outra.

O mesmo grupo de estudo avaliou a ação de derivados terpênicos contra isolados de *Sporothrix* sp. Nesse trabalho, foram testados os compostos terpinen-4-ol e farnesol, apresentando este último uma CIM variando de 0,003 a 0,222 µg/mL, sendo considerado o composto mais ativo neste teste (BRILHANTE, 2014b).

Borba-Santos et al. (2016) verificaram, a ação de três compostos análogos à miltefosina: TCAN26, TC19, e TC70. Os autores concluíram que TCAN26 foi o composto com atividade antifúngica mais acentuada contra *Sporothrix* sp., apresentando uma ação mais eficaz que a Miltefosina. Nesse estudo foi verificado que este composto provoca alterações nos envoltórios celulares do patógeno, e que as concentrações necessárias para eliminar as células deste são menores que as que provocam citotoxicidade em mamíferos, sendo assim esse composto mais seletivo que a Miltefosina.

A ação de compostos extraídos de diferentes espécies de plantas, contra *Sporothrix* sp, tem sido demonstrado, como em trabalho desenvolvido por Johan et al. (2007), onde extratos naturais de sete espécies de plantas medicinais foram testados contra *Sporothrix*, diversas espécies de *Candida*, e isolados de *Cryptococcus neoformans*. Dos oito extratos testados, apenas os de folha e caule de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) apresentou ação efetiva contra *S. schenckii*. Tendo

sido testados a uma concentração inicial de 100 µg/mL, apresentou uma variação de CIM de 15- 30 µg/mL (folha) e de 15-60 µg/mL (caule), frente aos isolados testados.

Os trabalhos de Waller et al. (2015; 2016a; 2016b), demonstraram a ação de diversos óleos naturais extraídos de diferentes espécies de plantas, os quais apresentaram resultados significativos frente a cepas de *S. brasiliensis*.

Couto et al. (2015) demonstraram a ação do óleo essencial de *Origanum vulgare*, planta da família Lamiaceae (WALLER et al., 2015), frente a cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, demonstrando o potencial antifúngico de compostos deste óleo, especialmente do composto γ -Terpineno.

Para comprovar a eficácia destes compostos, mais testes devem ser realizados, especialmente em relação a novas espécies do complexo, não só *in vitro*, mas também em modelos animais.

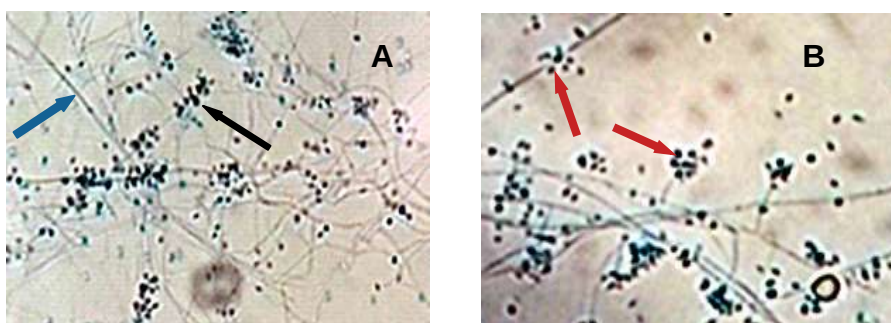
3 ANÁLISE DE RESULTADOS

3.1 VIABILIDADE DOS ISOLADOS

Dos 14 isolados analisados, apenas um, o isolado URM 3311, não apresentou características típicas de *Sporothrix* sp., não sendo considerado viável, portanto não utilizado nas análises realizadas.

Todos os demais isolados cultivados em BDA apresentaram características macromorfológicas (cultura apresentando coloração clara com as bordas tornando-se castanho escura a negra com envelhecimento, além de diversas reentrâncias e topografia cotonosa) e micromorfológicas (conídios globosos ou piriformes, de localização terminal, em disposição floral) típicas de *Sporothrix* sp (figuras 2 A e B).

Figura 1- Estruturas micromorfológicas de *Sporothrix schenckii* URM 3686 (A) e URM 4291 (B) evidenciando filamentos micelianos hialinos, ramificados e delicados (seta azul) com conídios dispostos lateralmente ao micélio em A (seta preta) e conídios em disposição floral (setas vermelhas) em B. Coloração: Lactofenol azul de algodão. Magnificação: 400x.



3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Os resultados das análises fenotípicas estão descritos na Tabela 3, a qual destaca os perfis de assimilação de carboidratos dos isolados viáveis, bem como o diâmetro da colônia a 30° C (figura 3A), e termotolerância (figura 3B). Após a leitura dos testes de absorção de fontes de carbono, observou-se que todos os isolados testados foram capazes de absorver os carboidratos sacarose e rafinose. A análise da termotolerância mostrou que todos isolados apresentaram essa característica, sendo o menor diâmetro da colônia observado (em BDA e incubada a 37°C), o de 3 mm. O diâmetro da colônia a 30°C mostrou-se maior que 50 mm em 9 isolados e menor que 50 mm em 3. Os padrões fenotípicos obtidos dos isolados analisados indicam que estes são da espécie *Sporothrix schenckii* e *S. mexicana*, conforme chave de identificação fenotípica proposta por Marimon et al. (2007). Entretanto, algumas discrepâncias entre as análises fenotípicas e genotípicas foram observadas. Conforme mostrado na tabela 3, os isolados URM 435, URM 4291, URM 4861 apresentam características fenotípicas de *Sporothrix mexicana*, porém identificados genotipicamente como *S. schenckii*. Este resultado está em desacordo com Marimon et al. (2007), onde os autores afirmam que as espécies do Complexo podem ser identificadas apenas pelas características fenotípicas.

Da mesma forma, os isolados URM 434, URM 435, URM 2439 e URM 2865, identificados fenotipicamente como *Sporothrix mexicana*, foram identificados genotipicamente como *S. chilensis*.

Os resultados apresentados nessa análise demonstram que o tempo de estocagem das amostras não influenciou mudanças na fisiologia destas, embora Criseo et al. (2008) descreva um caso de isolado de *Sporothrix schenckii* que, após diversos repiques, perdeu a habilidade de converter à forma filamentosa, mesmo em temperatura ambiente.

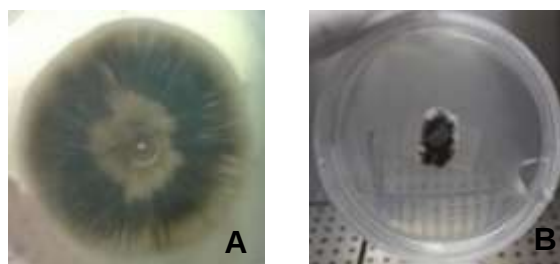
Tabela 3- Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de *Sporothrix* sp. estocados na Coleção de Culturas URM, realizada no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, Rio de Janeiro, Brasil, em Julho de 2016.

Isolado	Diâmetro da colônia a 30 °C	Morfologia dos Conídios	Crescimento a 37° C	Assimilação de carboidratos			Identificação fenotípica	Identificação genotípica
				*GLI	†SAC	•RAF		
**URM 301	62 mm	Hialino / Alongado/ Ovalado	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>Sporothrix mexicana</i>
URM 434	72 mm	Hialino/Alongado/ Ovalado	SIM	+	+	+	<i>S. schenckii</i>	<i>S. chilensis</i>
URM 435	68,5 mm	Hialino/ Alongado/ Ovalado/ Globoso	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. chilensis</i>
URM 592	31 mm	Hialino/Alongado/ Globoso/Ovalado	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>
URM 1013	46 mm	Hialino/ Demáceo Alongado/ Ovalado/ Globoso	SIM	+	+	+	<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>
URM 2439	71, 5 mm	Hialino / Alongado/ Ovalado	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. chilensis</i>
URM 2865	70 mm	Hialino/ Alongado/ Ovalado	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. chilensis</i>
URM 3686	50, 5 mm	Hialino/ Demáceo/ Alongado/ Ovalado/ Triangular	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>
URM 4080	56 mm	Hialino / Alongado/ Ovalado	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>
URM 4252	49 mm	Hialino/ Demáceo/ Alongado/ Ovalado Globoso/ Triangular	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>
URM 4291	55 mm	Hialino/ Demáceo/ Alongado/ Triangular	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>
URM 4861	58 mm	Hialino/ Demáceo/ Alongado/ Ovalado/ Triangular	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>
URM 5111	51 mm	Hialino/ Demáceo/ Alongado/ Ovalado/ Triangular	SIM	+	+	+	<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>

*GLI- Glicose/ †SAC- Sacarose/ •RAF- Rafinose

**URM- Coleção de Culturas URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Figura 2- Diâmetro da colônia (A) e termotolerância (B) do isolado URM 5111



Fonte: Rabello (2016)

Portanto, podemos inferir que, apesar de se fazer necessária com vias a se obter as características fisiológicas de uma determinada cepa, a caracterização fenotípica por si só não se apresenta totalmente confiável para obtenção de uma identificação acurada dos isolados, apesar de ocorrer correspondência com a identificação molecular em alguns casos.

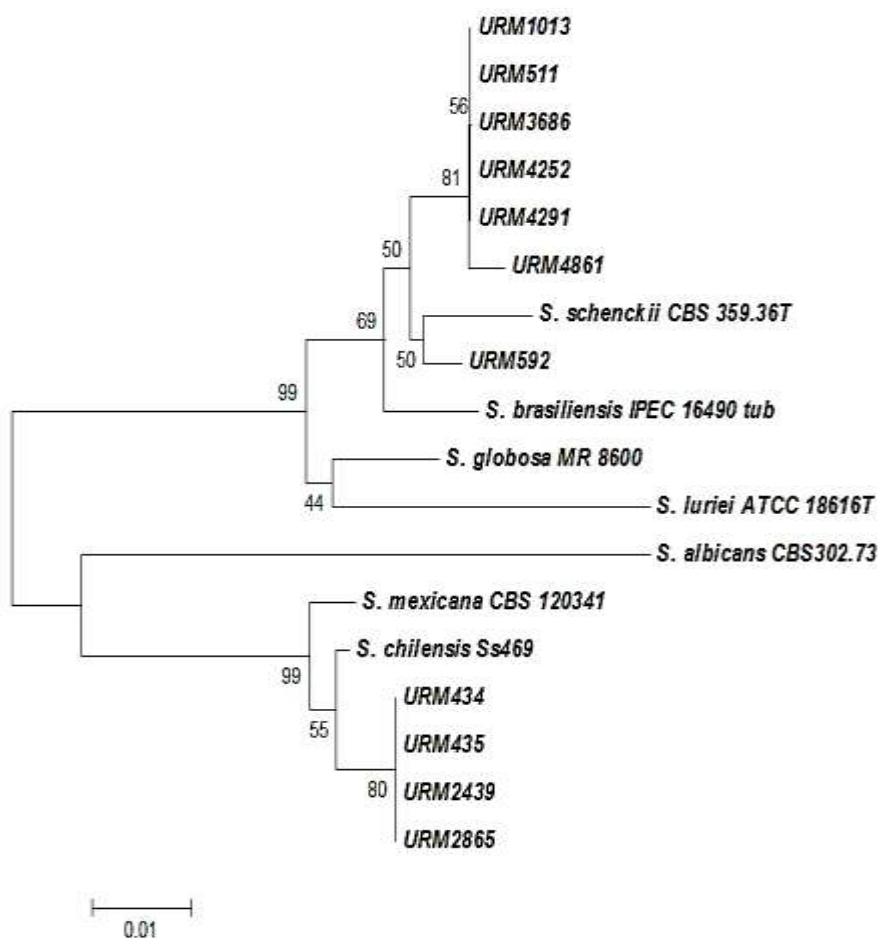
3.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

A análise no BLAST comparando as sequências do gene β -tub e do gene CAL na base de dados do GenBank NCBI com as sequências de DNA obtidas dos isolados da Coleção identificaram esses isolados como *Sporothrix schenckii*, *S. mexicana* e *S. chilensis* com 99%-100% de correspondência entre estas sequências, o que demonstra a capacidade descritiva desses genes em relação às espécies do Complexo *Sporothrix schenckii*, assim como descrito nos trabalhos de Marimon et al. (2007; 2008a) e Rodrigues et al. (2016). A análise filogenética das sequências do gene β -tub obtidas da Coleção de Cultura mostrou similaridade dos isolados URM 434, URM 435, URM 2439, URM 2865 com *S. chilensis*, e dos isolados URM 592, URM 4252, URM 4291, URM 3686, URM 1013, URM 5111, URM 4861 com *S. schenckii*, e mostrou altos valores *bootstrap* para esse gene (figura 4). Tendo em vista que todas as cepas caracterizadas como *S. chilensis* foram originariamente isoladas no Brasil, pode-se afirmar que desde a descrição dessa espécie, este é o primeiro registro dessa espécie no país, o que vem a qualificar ainda mais o acervo da Coleção de Culturas URM.

Esse dado demonstra a importante distribuição global que o Complexo apresenta, se considerarmos que *S. chilensis* foi caracterizada a partir de amostras

clínicas e ambientais originárias do Chile (RODRIGUES et al., 2016), também demonstrando que essa espécie não apresenta endemicidade.

Figura 3- Filograma *Neighbour-joining* do gene β -tub obtido de isolados da Coleção de Culturas URM e cepas padrão (*Sporothrix schenckii* CBS 302.73; *S. brasiliensis* IPEC 16490 tub; *S. luriei* ATCC 18616T; *S. albicans* CBS 302.73; *S. mexicana* CBS 120341; *S. chilensis* Ss469 e Ss470) disponíveis no GenBank.



3.4 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Os resultados dos testes de sensibilidade antifúngica encontram-se descritos na Tabela 4, e mostram-se significativos no que diz respeito aos novos compostos testados: Miltefosina e extrato de *Schinus terebinthifolius*. As cepas padrão apresentaram um perfil de resistência não divergente do apresentado pelos isolados da Coleção de Culturas, não apenas para aos antifúngicos padrão como também para os compostos bioativos testados. Esse resultado contribui ainda mais para

demonstração da eficácia destes compostos, visto que o padrão de resistência apresentado pelas cepas padrão são condizentes com o que apresenta o *guideline* CLSI M27-A3, em relação ao itraconazol e à anfotericina B (CLSI M27-A3, 2008).

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) obtidas mostraram que as amostras testadas apresentam sensibilidade ao Itraconazol (CIM entre 0,125- 0,5 µg/mL) e à anfotericina B, exceto o isolado URM 2439 (*Sporothrix chilensis*), o qual apresentou CIM de 4 µg/mL. Segundo o *guideline*, a variação nas CIM para fungos filamentosos não-dermatófitos está agrupado entre 0,5 e 2 µg/mL para anfotericina B, sendo, portanto, o isolado URM 2439 considerado resistente para esse fármaco. Os demais isolados caracterizados como *S. chilensis* apresentaram-se sensíveis à anfotericina B. Esse trabalho é o primeiro a tratar do perfil de resistência de *S. chilensis*, o que se apresenta como um dado importante apesar de poucos isolados desta nova espécie terem sido usados nesse teste.

Em Marimon et al. (2008b) *S. mexicana* apresentou resistência a itraconazol (32 µg/mL) e anfotericina B (*range* 16-32 µg/mL), contudo nosso isolado identificado como *S. mexicana* apresentou sensibilidade a esses fármacos. A literatura não estabelece *breakpoints* para os compostos bioativos avaliados frente ao Complexo *Sporothrix schenckii*, portanto não é possível afirmar que esta espécie apresente resistência conhecida a estes compostos. As discrepâncias observadas entre o presente trabalho e o trabalho de Marimon et al. (2008b) podem estar relacionadas então, a características fisiológicas intrínsecas às cepas estudadas.

Para itraconazol, o *guideline* determina que CIM's maiores que 8 µg/mL indicam resistência do isolado. Comparando-se as CIM obtidas para Miltefosina frente os isolados (0,25- 0,5 µg/mL) com as CIM's estabelecidas para itraconazol e anfotericina B, observamos uma atividade significativa desse composto contra *Sporothrix* sp., resultado concordante com o estudo de Brilhante et al. (2014), onde as CIM's obtidas para miltefosina variaram de 0,5 a 4 µg/mL. Desta forma, o presente trabalho corrobora para que o composto, depois de análises realizadas em modelos animais, possa vir a se tornar uma opção viável no tratamento da esporotricose. Com relação ao extrato de *Schinus terebinthifolius*, pode-se considerar que as CIM obtidas (1-4 µg/mL) demonstra que esse composto apresenta uma ação satisfatória na inibição do crescimento do fungo, resultado que concorda com estudo realizado por Johann et al. (2007), onde o extrato apresentou atividade contra isolados de *Sporothrix schenckii*.

Tabela 4 - Atividade antifúngica de Miltefosina, extrato de *Schinus terebinthifolius*, Itraconazol e Anfotericina B frente a isolados de *Sporothrix* sp. estocados na coleção de cultura URM.

ISOLADO	ESPÉCIE	Compostos e valores de CIM [¶] em µg.mL ⁻¹			
		ANFO. B *	ITC**	MIL***	EXTRATO DE <i>Schinus terebinthifolius</i>
URM [£] 301	<i>Sporothrix mexicana</i>	1	0,5	0,5	4
URM 434	<i>S. chilensis</i>	2	0,5	0,5	4
URM 435	<i>S. chilensis</i>	1	0,25	0,5	4
URM 592	<i>S. schenckii</i>	1	0,125	0,25	2
URM 1013	<i>S. schenckii</i>	1	0,5	0,5	4
URM 2439	<i>S. chilensis</i>	4	0,5	0,5	4
URM 2865	<i>S. chilensis</i>	1	0,5	0,5	4
URM 3686	<i>S. schenckii</i>	2	0,5	2	2
URM 4080	<i>S. schenckii</i>	0,125	0,125	0,5	1
URM 4252	<i>S. schenckii</i>	1	0,5	2	4
URM 4291	<i>S. schenckii</i>	0,5	0,125	1	2
URM 4861	<i>S. schenckii</i>	0,5	0,125	2	1
URM 5111	<i>S. schenckii</i>	2	0,5	1	1
ATCC [¥] 90028	<i>Candida albicans</i>	0,25	C [€]	0,5	4
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	0,125	2	C

[¶]CIM- Concentração Inibitória Mínima

*ANFO B.- Anfotericina B

** ITC- Itraconazol

*** MIL- Miltefosina

[£]URM- Coleção de Cultura URM/UFPE/Brasil

[¥]ATCC- American Typical Culture Collection

[€]C- Crescimento na maior concentração testada

3.5 PRODUÇÃO DE MELANINA

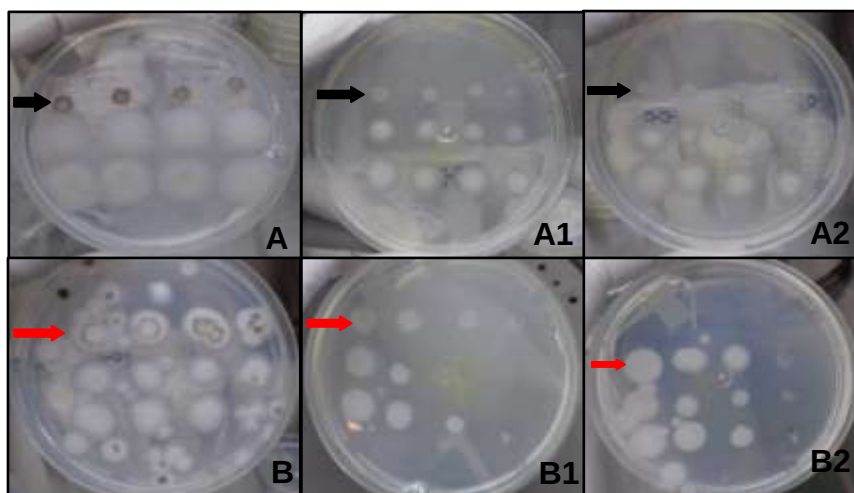
Com relação a verificação da produção de melanina, a partir da observação do controle positivo, observou-se que apenas três isolados apresentavam colônia escura, evidenciando a produção de melanina DHN, produzida naturalmente pelo fungo. As demais culturas apresentaram-se albinas, sendo feita a análise da ação antifúngica dos compostos apenas a partir das colônias escuras, verificando a ação destes contra a produção da proteína.

Foi verificado que, dos compostos testados apenas os tiofenos 6CN10, LNN 03, LNN 07, LNN 08 e LNN 09 foram capazes de inibir a produção de melanina nas colônias de *Sporothrix*. Nenhum dos extratos naturais testados apresentou ação inibitória da melanina, bem como a Miltefosina, que também não apresentou ação frente à essa proteína.

A Miltefosina atua em nível de membrana plasmática interferindo na produção de fosfolipídios, importante composto desta estrutura celular (DORLO et al., 2012), não havendo nenhum trabalho tendo sido realizado com o objetivo de verificar a ação deste composto na inibição da produção de melanina, até então. Portanto, pode-se inferir que devido ao seu mecanismo de ação, a Miltefosina não apresenta nenhuma atividade contra este fator.

Apesar da análise quanto a ação dos composto ter sido feito apenas em relação aos isolados que apresentaram produção de melanina, é importante ressaltar que os compostos LNN não só inibiram a produção de melanina nesses isolados como também inibiram o crescimento da colônia destes e de isolados não produtores de melanina, demonstrando não só sua capacidade inibitória em relação à produção da melanina, mas também sua capacidade antifúngica propriamente dita. Cunha et al. (2006) verificaram a ação de triciclazol frente à produção da melanina DHN produzida por *Fonsecaea pedrosoi*, e constaram que este composto inibe os mecanismos de produção dessa proteína, aumentando a susceptibilidade deste fungo aos macrófagos. Diferente do trabalho realizado por Cunha et al. (2005), nosso trabalho não analisou os mecanismos de inibição do processo de síntese da melanina DHN em *Sporothrix* sp., porém apenas pela observação, pode-se constatar uma clara inibição na produção de melanina dos isolados que apresentaram essa característica (figuras 4 A, A1, A2, B, B1 e B2).

Figura 4- Inibição da produção de melanina de dois isolados produtores de melanina. Em A: isolado 432 (*Sporothrix brasiliensis*) (seta preta) (controle). A1: isolado 432 (seta preta) na presença do composto LNN-03 (100% da CIM). A2: isolado 432 (seta preta) na presença do composto LNN-03 (50% da CIM). Em B: isolado 3686 (*S. schenckii*) (seta vermelha) (controle). B1: isolado 3686 (seta vermelha) na presença do composto LNN-08 (100% da CIM). B2: isolado 3686 (seta vermelha) na presença do composto LNN-08 (50% da CIM).



Fonte: O autor (2016)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A requalificação de isolados de acervos de Coleção de Cultura a partir do uso de ferramentas moleculares, apresenta grande relevância no estudo da micologia, visto que diversos estudantes da área têm desenvolvido suas pesquisas a partir desses isolados de coleções.

Dito isto, podemos concluir que estudos posteriores que venham a utilizar esses isolados de *Sporothrix* sp. da Coleção de Culturas URM, revisados taxonomicamente, apresentarão maior confiabilidade e relevância.

Pode-se também afirmar que os compostos testados contra os isolados apresentaram ação nos testes de sensibilidade antifúngica, e que a verificação da produção de melanina frente aos compostos testados nesta análise apresentou dados relevantes, visto que os compostos de Tiofeno apresentaram significativo potencial anti-*Sporothrix* com visível inibição da produção desta proteína.

Estes compostos, a partir de estudos de citotoxicidade, podem vir a se tornarem opções viáveis no tratamento da esporotricose, visto que esta doença apresenta maior incidência entre a população de menor condição econômica, e estes compostos derivados de extratos naturais apresentam baixo custo, o que dá a este trabalho relevância não só no campo científico, mas também no social.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PAES, Rodrigo; FRASES, Susana; ARAÚJO, Glauber de Sousa; OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; GERFEN, Gary; NOSANCHUCK, Joshua; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, Rosely Maria. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix schenckii* complex in the presence of L-Tyrosine. **Applied and Environmental Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 24, p. 8623-8630, dez. 2012.
- BALKWILL, Fran; MANTOVANI, Alberto. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, Londres, v. 357, n. 9255, p. 539-545, fev. 2001.
- BARROS, Mônica Bastos de Lima; PAES, Rodrigo de Almeida; SCHUBACH, Armando Oliveira. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Rio de Janeiro, v.24, n.04, p. 633-654, out. 2011.
- BARROS, Mônica Bastos de Lima; SCHUBACH, Armando Oliveira; VALLE, Antônio Carlos Francesconi do; GALHARDO, Maria Clara Gutierrez; CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; SCHUBACH, Tânia Maria Pacheco; REIS, Rosani Santos; WANKE, Bodo; MARZOCHI, Keyla Belizia Feldman; CONCEIÇÃO, Maria José. Cat-Transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 529-535, jan. 2004.
- BASHIR, Gulnaz; WANI, Tahmeena; KANTH, Alta; SHAKEEL, Saman; SYED, Arshi. Sporotrichosis in Kashmir Valley- a report of two cases. **JK-Practitioner**, v. 17, n. 04, p. 35-37, out.-dez. 2012.
- BERBEE, Mary; TAYLOR, John. 18S ribossomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. **Experimental Mycology**, EUA, v. 16, n. 01, p. 87-91, dez. 1991.
- BONIFAZ, Alexandro; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Denise. Diagnosis and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: what are the options? **Current Fungal Infections Report**, Cidade do México, v. 07, n. 03, p. 252-259, set. 2013.
- BORBA-SANTOS, Luana Pereira; ISHIDA, Kelly; CALOGEROPOULOU, Theodora; SOUZA, Wanderley; ROZENTAL, Sonia. Adamantylidene-substituted alkylphosphocholine TCAN26 is more active against *Sporothrix schenckii* than miltefosine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 08, p. 523-527, ago. 2016.
- BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira; MALAQUIAS, Ângela Donato Maia; CAETANO, Érica Pacheco; CASTELO-BRANCO, Débora de Souza Collares Maia; LIMA, Rita Amanda Chaves; MARQUES, Francisca Jakeline de Farias; SILVA, Natalya Fachine; ALENCAR, Lucas Pereira; MONTEIRO, André Jalles; CAMARGO, Zoilo Pires; BANDEIRA, Tereza de Jesus Pinheiro Gomes; RODRIGUES, Anderson Messias; CORDEIRO Rossana de Aguiar; MOREIRA José Luciano Bezerra; SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. *In vitro* inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Medical Micology**, Fortaleza, v. 54, n. 06, p.1-6, mar. 2014a.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira; SILVA, Natalya Fechine; MARQUES, Francisca Jakeline de Farias; CASTELO-BRANCO, Débora de Souza Collares; LIMA, Rita Amanda Chaves; MALAQUIAS, Ângela Donato Maia; CAETANO, Érica Pacheco; BARBOSA, Giovana Riello; CAMARGO, Zoilo Pires; RODRIGUES, Anderson Messias; MONTEIRO, André Jalles; BANDEIRA, Tereza de Jesus Pinheiro Gomes; CORDEIRO Rossana de Aguiar; SIDRIM, José Júlio Costa; MOREIRA José Luciano Bezerra; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. *In vitro* inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, Fortaleza, v. 53, n. 02, p. 93-98, out. 2014b.

BUELL, Caroline; WESTON, William. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous culture. **American Journal of Botany**, Nebraska, v. 34, n. 10, p. 555-561, dez. 1947.

BUSTAMANTE, Beatriz; CAMPOS, Pablo. Sporotrichosis treatment: overview and update. **Current Infection Reports**, Lima, v. 05, n. 01, p. 42-48, mar. 2011.

CAFARCHIA, Claudia; SASANELLI, Mariateresa; LIA, Riccardo; CAPRARIS, Donato; GUILLOT, Jacques; OTRANTO, Domenico. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: case report. **Mycopathologia**, Bari, v. 163, n. 2, p. 75-79, fev. 2007.

CAMACHO, Emma; LEÓN- NAVARRO, Isabel; RODRÍGUEZ-BRITO, Sabrina; MENDOZA, Mireya; NIÑO- VEGA, Gustavo A. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **BMC Infectious Diseases**, Caracas, v. 15, p. 01-10, fev. 2015.

CARLOS, Iracilda Zepone; SGARBI, Diana Bridon da Graça; SANTOS, Graciela Cristina dos; PLACERES, Marisa Campos Polesi. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophages phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- α . **Scandinavian Journal of Immunology**, Araraquara, v. 57, n. 03, p. 214-220, ago. 2002.

CHANG, Shurong; HERSH, Andrew; NAUGHTON, Greg; MULLINS, Kevin; FUNG, Maxwell; SHARON, Victoria. Disseminated cutaneous sporotrichosis. **Dermatology Online Journal**, Sacramento, v. 19, n. 11, p. 8, nov. 2013.

CHAPMAN, Stanley; PAPPAS, Peter; KAUFFMAN, Carol; SMITH, Mark; DIETZE, Daniel; TIRABOSCHI-FOSS, Norma; RESTREPO, Oscar; BUSTAMANTE, Beatriz; OPPER, Carol; EMADY-AZAR, Shahram; BAKSHI, Bhavik Rajesh. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day⁻¹) in the treatment of cutaneous and lymphocutaneous sporotrichosis. **Mycoses**, Jackson, v. 47, n. 01-02, p. 62-68, ago. 2003.

CHAKRABARTI, Arunaloke; BONIFAZ, Alexandro; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; MOCHIZUKI, Takashi; LI, Shanshan. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, Chandigarh, v. 53, n. (1), p. 3-14, dez. 2014.

CLSI M27-A3. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard- 3ed.* Wayne, 2008. 44p.

CLSI M38-A2. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard- 2ed.* Wayne, 2008. 35p.

COUTO, Camila; RAPOSO, Nádia; ROZENTAL, Sônia; BORBA-SANTOS, Luana; BEZERRA, Leila; ALMEIDA, Priscila; BRANDÃO, Marcos. Chemical composition and antifungal properties of essential oil of *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Juiz de Fora, v. 14, n. 17, p. 1207-1212, jul. 2015.

CRISEO, Giuseppe; ZUNGRI, Domenico; ROMEO, Orazio. Stable yeast-like form of *Sporothrix schenckii*: lack of dimorphic stage. **Journal of Clinical Microbiology**, Messina, v. 48, n. 11, p. 3870-3871, nov. 2008.

CRISEO, Giuseppe; ROMEO, Orazio. Ribosomal DNA sequencing and phylogenetic analysis of environmental *Sporothrix schenckii* strains: comparison with clinical isolates. **Mycopathologia**, Messina, v. 169, n. 5, p. 351-158, maio 2010.

CRUZ, Luiz Celso Hygino. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, Rio de Janeiro, v.20, p. 08-28, jan. 2013.

CUNHA, Marcel; FRANZEN, Anderson; ALVIANO, Daniela; ZANARDI, Erica; ALVIANO, Celuta; SOUZA, Wanderley; ROZENTAL, Sonia. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increase susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. **Microscopy Research and Technique**, Rio de Janeiro, v. 69, n.9, p. 729-737, set. 2006.

DE BEER, Wilhelm; HARRINGTON, Thomas; VISMER, Hester; WINGFIELD, Brenda; WINGFIELD, Michael. Phylogeny of *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, África do sul, v. 95, n. 03, p. 434-441, set. 2002.

DE MEYER, Elsie; DE BEER, Wilhelm; SUMMERBELL, Richard; MOHARRAM, A. M.; DE HOOG, Gerrit Sybren; VISMER, Hester; WINGFIELD, Michael. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix* complex. **Mycologia**, África do Sul, v. 100, n. 04, p. 647-661, abr. 2008.

DIAS, Nicolina Marques; OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; PORTELA, Manuel Azevedo; SANTOS, Cledir; ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria; LIMA, Nelson. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*. **Emerging Infectious Diseases**, Braga, v. 17, n. 10, p. 1975-1976, out. 2011.

DIXON, Dennis M.; SALKIN, Ira F.; DUNCAN, Rory A.; HURD, Nancy J.; HAINES, John H.; KEMNA, Maggi E.; COLES, Bruce F. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Nova Iorque, v. 29, n. 06, p. 1106-1113, jun. 1991.

DORLO, Thomas; BALASEGARAM, Monica; BEIJNEN, Jos; VRIES, Peter. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of

leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Amsterdam, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, jul. 2012.

ESTEVEES, Paola Machado Gomes; TROPE, Beatriz Moritz; BARBALHO, Marcela Gramigna Barbalho; TYOMI, Akiti; RAMOS-E-SILVA, Marcia. Disseminated cutaneous sporotrichosis in an immunosuppressed patient. **Journal of AIDS and Clinical Research**, Rio de Janeiro, v. 05, n. 10, p. 01-03, set. 2014.

EUCAST E. DEF 9.3. *Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds*. Copenhagen, 2015. 23p.

FARIAS, Marconi Rodrigues; ASSUNÇÃO, Dévaki Liege; DUARTE, Greicy; VANDRESEN, Grazielle; WERNER, Juliana; TASQUETI, Ubirajara. Canine boné sporotrichosis: a case report. **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v. 36, n. 3, p. 1145-1450, maio 2015.

FIGUEIREDO, Camila Castro; LIMA, Osana Cunha de; CARVALHO, Laís de; LOPES-BEZERRA, Leila Maria; MORANDI, Verônica. The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial pathogenesis**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 04, p. 177-188, abr. 2004.

FIGUEIREDO, Camila Castro; DECCACHE, Paula; LOPES-BEZERRA, Leila Maria; MORANDI, Verônica. TGF- β 1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. **Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 153, n. 09, p. 2910- 2921, set. 2007.

FUKUSHIRO, R. Epidemiology and ecology of sporotrichosis in Japan. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. abt. Originale. a, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie**, Uchinada, v. 257, n. 2, p. 228-233, jul. 1984.

FREITAS, Dayvison Francis Saraiva; LIMA, Iluska Augusta Rocha; CURI, Carolina Lemos; JORDÃO, Livia; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, Rosely Maria; VALLE, Antonio Carlos Francesconi; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; CURI, Andre Luiz Land. Acute dacryocystitis: another clinical manifestation of sporotrichosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 02, p. 01-03, jul. 2013.

FREITAS, Dayvison Francis Saraiva; VALLE, Antonio Carlos Francesconi; SILVA, Margarete Bernardo Tavares; CAMPOS, Dayse Pereira; LYRA, Marcelo Rosandiski; SOUZA, Rogerio Valls; VELOSO, Valdiléa Gonçalves; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, Rosely Maria; BASTOS, Francisco Inácio; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara. Sporotrichosis: An emergin neglected opportunistic infection HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 8, p. 1-8, ago 2014.

GEWEHR, Paulo; JUNG, Bruno; AQUINO, Valerio; MANFRO, Roberto; SPULDARO, Fábio; ROSA, Regis; GOLDANI, Luciano. Sporotrichosis in renal transplant patients.

Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, Porto Alegre, v. 24, n. 02, p. 47-49, jan. 2013.

GLASS, Louise; DONALDSON, Gary. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Vancouver, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, abr. 1995.

GOLUBEV, Wladslav; SCORZETTI, Gloria. *Rhodotorula rosulata* sp nov., *Rhodotorula silvestris* sp. nov. and *Rhodotorula straminea* sp. nov., novel myo-inositol-assimilating yeast species in the microbotryomycetes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Miami, v. 60, n. 0, 2501-2506, out. 2010.

GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; VALLE, Antônio Carlos Francesconi do; FRAGA, Beatriz Lima Barros; SCHUBACH, Armando Oliveira; HOAGLAND, Brenda Regina de Siqueira; MONTEIRO, Paulo César Fialho; BARROS, Mônica Bastos de Lima. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune recostitution inflammatory syndrome. **Mycoses**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 01, p. 78-80, nov. 2008.

GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; FREITAS, Dayvison Francis Saraiva; VALLE, Antônio Carlos Francesconi. Diagnosis of sporotrichosis: current status and perspectives. In: CARLOS, Iracilda Zeppone. **Sporotrichosis: new development and future prospects**. 1ª Edição. São Paulo: Springer International Publishing, 2015. p. 73-82. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-11912-0_5> Acesso em: 05 dez. 2016.

GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, Rosely; VALLE, Antônio Carlos Francesconi do; ALMEIDA-PAES, Rodrigo; TAVARES, Patricia Morais e Silva; MONZON, Araceli; MELLADO, Emilia; RODRIGUEZ-TUDELA, Juan; CUENCA-ESTRELLA, Manuel. Molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 2, p. 141-151, jul. 2009.

HAIJEH, Rana; McDONNELL, Sharon; REEF, Susan; LICITIRA, Carmelo; HANKINS, Michael; TOTH, Bill; PADHYE, Arvind; KAUFMAN, Leo; PASARELL, Lester; COOPER, Chester; HUTWAGNER, Lori; HOPKINS, Richard; McNEIL, Michael. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. **The Journal of Infectious Diseases**, Atlanta, v. 176, n. 02, p. 499-504, mar. 1997.

HAWKSWORTH, David. Fungal diversity and its implications for genetic resources collections. **Studies in Mycology**, Madri, v. 50, p. 9-18, 2004.

HEKTOEN, Ludvig; C. F. PERKINS. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 05, p. 77-91, out. 1900.

HU, Sindy; CHUNG, Wen-Hung; HUNG, Shuen-lu; HO, Hsin-Chun; WANG, Zen-Whe; CHEN, Chien-Hsun; LU, Shu-Chuan; KUO, Tseng-Tong; HONG, Hong-Shang. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 04, p. 1414-1418, abr. 2003.

JOHANN, Susana; PIZZOLATTI, Moacir; DONNICI, Cláudio; RESENDE, Maria Aparecida. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, Belo Horizonte, v. 38, n. 04, dez. 2007.

KAUFFMAN, Carol; BUSTAMANTE, Beatriz; CHAPMAN, Stanley; PAPPAS, Peter. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis: 2007 upgrade by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Disease** Michigan, v. 45, n. 10, p. 1255-1265, nov 2007.

KAUFFMAN, Carol; HAJJEH, Rana; CHAPMAN, Stanley. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**, Michigan, v. 30, n. 04, p. 684-687, abr. 2000.

KOVARIK, Carrie L.; NEYRA, Edgar; BUSTAMANTE, Beatriz. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. **Medical Mycology**, Peru, v. 46, n. 1, p. 53-56, jul. 2007.

LACAZ, Carlos da Silva; PORTO, Edward; MARTINS, José Eduardo Costa; HEINS-VACCARI, Elisabeth Maria; MELO, Natalina Takahashi de. **Tratado de micologia médica**. 9. Ed., São Paulo: Sarvier, 2002. p. 1104.

KAUR, Ravinder; WADHWA, Anupriya; AGARWAL, Satish Kuma. *Rhodotorula mucilaginosa*: an unusual case of oral ulcers in AIDS patients. **AIDS**, Nova Deli, v. 21, n. 8, p. 1068-1069, maio 2007.

LEDERER, Henry; SULLIVAN, Eva; CRUM-CIANFLONE, Nancy. Sporotrichosis as an usual case of osteomyelitis: a case report and review of the literature. **Medical Mycology Case Reports**, San Diego, v. 11, abr. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211753916300264>> Acesso em: 12 abr. 2016.

LETTERIO, John; ROBERTS, Anita. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annual Reviews**, Bethesda, v. 16, n. 00, p. 137-161, abr. 1998.

LIMA, Thais Bergamin; PINTO, Michelle Flaviane Soares; RIBEIRO, Suzana Meira; LIMA, Loiane Alves; VIANA, Juliana Cançado; JÚNIOR, Nelson Gomes; CÂNDIDO, Elizabete de Souza; DIAS, Simoni Campos; FRANCO, Octávio Luiz. Bacterial resistance mechanisms: what proteomics can elucidate. **The FASEB Journal**, Águas Claras, v. 27, n.04, 1291-1303, jan. 2013.

LIMA, Osana Cunha de; FIGUEIREDO, Camila Castro; MORANDI, Verônica; LOPES-BEZERRA, Leila Maria. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 05, p. 651-657, maio 1999.

LOPES-BEZERRA, Leila; SCHUBACH, Armando; COSTA, Rosane. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 02, p. 293-308, out. 2006.

LUTZ, Adolpho; SPLENDORE, Alfonso. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses.

Revista Médica de São Paulo. Jornal Prático de Medicina, Cirurgia e Higiene, São Paulo, v. 10, n. 21, p. 443-450, nov. 1907.

LYON, Marshall; ZURITA, Susana; CASQUERO, José; HOLGADO, Walter; GUEVARA, Jorge; BRANDT, Mary; DOUGLAS, Stewart; SHUTT, Kathleen; WARNOCK, David; HAJJEH, Rana. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, Abancay, v. 36, n. 01, p. 34-39, set. 2002.

MADRID, Isabel Martins; MATTEI, Antonella Souza; FERNANDES, Cristina Geverh; NOBRE, Márcia de Oliveira; MEIRELES, Mário Carlos Araújo. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, Rio Grande do Sul, v. 173, n. 4, p. 265-273, abr. 2012.

MAGAND, F.; PERROT, J. L.; CAMBAZARD, F.; RABERIN, M. H.; LABELLE, B. S. Autochthonous sporotrichosis in France. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, Santa Étienne, v. 136, n. 3, p. 273-275, mar. 2009.

MAHAJAN, Vikram. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, Tanda, v. 2014, n. 00, p. 1-13, dez. 2014.

MAHLBERG, Matthew; PATEL, Rishi; ROSENMAN, Karla; CHEUNG, Wang; WANG, Nadia; SANCHEZ, Miguel. Fixed cutaneous sporotrichosis. **Dermatology Online Journal**, Nova Iorque, v. 15, n. 08, p. 05, 2009. Disponível em <[www.http://escholarship.org/uc/item/30m45342](http://escholarship.org/uc/item/30m45342)> Acesso em: 08 abr. 2016.

MANCINI, Nicasio; CAROLIS, Elena; VELLA, Antonietta; CLEMENTI, Nicola; VACCARO, Luisa; RUGGERI, Alberto; POSTERARO, Brunella; BURIONI, Roberto; CLEMENTI, Massimo; SANGUINETTI, Maurizio. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix- assisted laser desorption- time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. **Journal of clinical microbiology**, Roma, v. 51, n. 07, p. 2453- 2457, jul. 2013.

MARIAT, François. Adaptation de *ceratocystis* a la vie parasitaire chez l'animal — etude de l'aquisition d'un pouvoir pathogene comparable a celui de *Sporothrix schenckii*. **Sabouraudia**, Paris, v. 9, n. 03, p. 191-205, 1971.

MARIAT, François. Observations sur l'ecologie de *sporothrix schenckii* et de *ceratocystis stenoceras* en corse et en alsace, provinces francaises indemnes de sporotrichose. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Paris, v. 13, n. 02, p. 217-225, 1975.

MARIMON, Rita; GENÉ, Josepa; CANO, Josep; GUARRO, Josep. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Mycopathologia**, Reus, v. 46, n. 06, p. 621-625, 2008a.

MARIMON, Rita; SERENA, Carolina; GENÉ, Josepa; CANO, Josep; GUARRO, Josep. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Reus, v. 52, n.02, p. 732-734, fev. 2008b.

MARIMON, Rita; GENÉ, Josepa; CANO, Josep; SUTTON, Deanna; KAWASAKI, Masako; GUARRO, Josep. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, Reus, v. 45, n. 10, p. 3198-3206, out. 2007.

MARIMON, Rita; GENÉ, Josepa; CANO, Josep; TRILLES, Luciana; LAZÉRA, Márcia dos Santos; GUARRO, Josep. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Reus, v. 44, n. 09, p. 351-356, set. 2006.

McCLUSKEY, Kevin. The fungal genetics stock center: From molds to molecules. **Advances in Applied Microbiology**, Kansas City, v. 52, n. 00, 245-262, 2003.

Micoteca URM, Catálogo online. Disponível em:
<<https://www.ufpe.br/micoteca/nova/fazerBusca.php>>. Acesso em 10 de maio 2015.

MOTTA, Cristina. *Caracterização do acervo da Micoteca URM visando a disponibilização de culturas como fonte de recursos biotecnológicos*. Recife, 2012. 71p.

NOBRE, Márcia de Oliveira; CASTRO, Angela Pötter de; CAETANO, Dilma; SOUZA, Lorena Leonardo; MEIRELES, Mario Carlos Araujo; FERREIRO, Laerte. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Rio Grande do Sul, v. 18, p. 137- 140, jul. 2001.

NEYRA, Edgar; PIERRE-ALAIN, Fonteyne; SWINNE, Danielle; FAUCHE, Frederic; BUSTAMANTE, Beatriz; NOLARD, Nicole. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, Lima, v. 43, n. 03, p. 1348-1352, mar. 2005.

O'DONELL, Kerry; NIRENBERG, Helgard; AOKI, Takayuki; CIGELNIK, Elizabeth. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Peoria, v. 41, n. 1, p. 61-78, fev. 2000.

OLIVEIRA, Daniele; LOPES, Paulo Markus; SPADER, Tatiana; MAHL, Camila; TRONCO-ALVES, Giordano; LARA, Valeria; SANTURIO, Janio; ALVES, Sydney Hartz. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Santa Maria, v. 49, n. 08, p. 3047-3049, ago. 2011.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; ALMEIDA-PAES, Rodrigo; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 01, p. 2-6, nov. 2013b.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; ALMEIDA-PAES, Rodrigo; MUNIZ, Mauro de Medeiros; BARROS, Monica Bastos de Lima; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil.

Mycopathologia, Rio de Janeiro, v. 172, n. 4, p. 257- 267, jun. 2011.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; ALMEIDA-PAES, Rodrigo; MUNIZ, Mauro de Medeiros; BARROS, Monica Bastos de Lima; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathologia**, Rio de Janeiro, v. 169, n. 5, p. 359-363, maio 2010.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; MAIFREDE, Simone Bravim; RIBEIRO, Mariceli Araújo; ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.108, n. 7, p. 936-938, nov. 2013a.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; SANTOS, Cledir; SAMPAIO, Paula; ROMEO, Ozorio; PAIS, Célia; LIMA, Nelson; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, Rosely Maria. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 166, n. 02, p. 102-110, Jan. 2015.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; SAMPAIO, Paula; ALMEIDA-PAES, Rodrigo; PAIS, Célia; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 06. p. 2159-2162, jun. 2012.

PAINE, Timothy; RAFFA, Kenneth; HARRINGTON, Thomas. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. **Annual Review of Entomology**, Riverside, v. 47, n. 01, p. 179-206, jan. 1997.

PAPPAS, Petter; TELLES, Ildefonso; DEEP, Alexandria; NOLASCO, Delia; HOLGADO, Walter; BUSTAMANTE, Beatriz. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hiperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, Abancay, v. 30, n. 01, p. 65-70, dez. 1999.

QUEIROZ-TELLES, Flávio; NUCCI, Marcio; COLOMBO, Arnaldo Lopes; TOBÓN, Angela; RESTREPO, Angela. Mycoses of implantation in the South America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 03, p. 225-236, abr. 2011.

RAMOS-E-SILVA, Marcia; VASCONCELOS, Camila; CARNEIRO, Sueli; CESTARI, Tania. Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 02, p. 181-187, abr. 2007.

REISS, Errol; OBAYASHI, Taminori; ORLE, K.; YOSHIDA, Minoru; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, Rosely Maria. **Medical Mycology**, Atlanta, v. 38, n. suppl 1, pág. 147-159, 2000.

RODRIGUES, Anderson Messias; CHOAPPA, Rodrigo Cruz; FERNANDES, Geisa Ferreira; DE HOOG, Gerrit Sybren; CAMARGO, Zoilo Pires. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agente of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, São Paulo, v. 120, n. 2, p. 246-264, fev. 2016.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, Gerrit Sybren; CAMARGO, Zoilo Pires de. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **Neglected Tropical Diseases**, São Paulo, v. 09, n. 12, p. 1-22, dez. 2015.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, Gerrit Sybren; PIRES, Débora de Cássia; BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira; SIDRIM, José Júlio da Costa; GADELHA, Marcos Fábio; COLOMBO, Arnaldo Lopes; CAMARGO, Zoilo Pires. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Diseases**, São Paulo, v. 219, n. 14, p. 1471-2334, abr. 2014.

ROMEO, Orazio; SCORDINO, Fabio; CRISEO, Giuseppe. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species Complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. **Mycopathologia**, Messina, v. 172, n. 3, p. 179-186, set. 2011.

ROMERO-CABELLO, Raúl; BONIFAZ, Alexandro; ROMERO-FEREGRINO, Raúl; SANCHÉZ, Carlos Javier; LINARES, Yancy; ZAVALA, Jorge Tay; ROMERO, Leticia Calderón; ROMERO-FEREGRINO, Rodrigo; VEGA, José Sanchez. Disseminated sporotrichosis. **BMJ Case Reports**, Puebla, v. 2011, n. 00, p. 1-4, mar. 2011.

ROMÓN, Pedro; ZHOU, XuDong; ITURRUNDOBEITIA, Juan Carlos; WINGFIELD, Michael; GOLDARAZENA, Arturo. Ophiostoma species (Ascomycetes: Ophiostomatales) associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) colonizing *Pinus radiata* in northern Spain. **Canadian Journal of Microbiology**, Espanha, v. 53, n. 06, p. 756-767, 2007.

SANDHU, Gurpreet; KLINE, Bruce; STOCKMAN, Leslie; ROBERTS, Glenn. Molecular probes for diagnostic of fungal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Rochester, v. 33, n. 11, p. 2913-2919, nov. 1995.

SCHENCK, Benjamin Robinson. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. **Johns Hopkins Press**, Baltimore, v. 9, p. 286-290, 1898.

SCHUBACH, Armando; BARROS, Mônica Bastos de Lima; SCHUBACH, Tânia Maria Pacheco; FRANCESCONI-DO-VALE, Antônio Carlos; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara Reis; SUED, Márcio; SALGUEIRO, Mariza de Matos; FIALHO-MONTEIRO, Paulo Cezar; REIS, Rosani santos; MARZOCHI, Keyla Belizia Feldman; WANKE, Bodo; CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cornea**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 04, p. 491-493, maio, 2005.

SGARBI, Diana Bridon da graça; SILVA, Antonio Jorge Ribeiro; CARLOS, Iracilda Zeppone; SILVA, Célio Lopes; ANGLUSTER, Jayme; ALVIANO, Celuta Sales.

Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, Niterói, v. 139, n. 9, p. 9-14, set. 1997.

SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. 1º Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 396.

SILVA-VERGARA, Mario-León; CAMARGO, Zoilo Pires, SILVA, Patricia Ferreira; ABDALLA, Michel Reis; SGARBIERI, Nilsson Ricardo; RODRIGUES, Anderson Messias; SANTOS, Keila Cristina; BARATA, Cristina Hueb; FERREIRA-PAIM, Kennio. Case report: Disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with endocardial and ocular involvement in an HIV- infected patient. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Uberaba, v. 86, n. 03, p. 447-480, out. 2011.

SIMÕES, Marta Filipa; SANTOS, Isabel; SANTOS, Cledir; LIMA, Nelson. Micoteca da Universidade do Minho (MUM): Uma coleção de fungos filamentosos a olhar o futuro. **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. No. 1300-3, Porto de Galinhas/PE, Brasil, 8-12 Novembro, 2009. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/32835>> Acesso em: 18 nov. 2016.

SNELDERS, Eveline; VAN DER LEE, Henrich; KUIJPERS, Judith; RIJS, Anthonius; VARGA, János; SAMSON, Robert; MELLADO, Emilia; DONDEERS, Rogier; MELCHERS, Willem; VERWEIJ, Paul. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **Plos Medicine**, Londres, v. 5, n. 11, p. 1629-1637, nov. 2008.

SOTO, Max Carlos Ramirez. Sporotrichosis in the ocular adnexa: 21 cases in an endemic area in peru and review of the literature. **American Journal of Ophthalmology**, Abancay, v. 162, n. 15, p. 173-179, nov. 2015.

STEVENS, David. Diagnosis of fungal infections: current status. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, San Jose, v. 49, n. Suppl 1, p. 11-19, 2002.

STOPGLIA, Cheila Denise Ottoneli; MAGAGNIN, Cibele Massotti; CASTRILLÓN, Mauricio Ramirez; MENDES, Sandra Denise Camargo; HEIDRICH, Daiane; VALENTE, Patricia; SCROFERNEKER, Maria Lúcia. Antifungal susceptibilities and identification of the *Sporothrix schenckii* Complex isolated in Brazil. **Medical Mycolgy**, Porto Alegre, v. 52, n. 1, p. 56-64, jan 2014.

WALLER, Stefanie Bressan; MADRID, Isabel Martins; SERRA, Emanoele Figueiredo; GOMES, Angelita dos Reis; CLEFF, Marlete Brum; FARIA, Renata Osório. *In vitro* susceptibility of the *Sporothrix brasiliensis* to aqueous extracts of the green tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Acta Veterinária Brasilica**, Pelotas, v. 09, n. 04, p. 342-347, 2015.

WALLER, Stefanie Bressan; MADRID, Isabel Martins; FERRAZ, Vanny; PICOLI, Tony; CLEFF, Marlete Brum; FARIA, Renata Osório; MEIRELES, Mário Carlos Araújo; MELLO, João Roberto Braga. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 04, p. 896-901, jul. 2016a.

WALLER, Stefanie Bressan; MADRID, Isabel Martins; SILVA, Anna Luiza; CASTRO, Luciana Laitano Dias; CLEFF, Marlete Brum; FERRAZ, Vanny; MEIRELES, Mário Carlos Araújo; ZANETTE, Régis; MELLO, João Roberto Braga. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oils of Lamiaceae family. **Mycopathologia**, Pelotas, v. 181, n. 11, p. 857-863, dez. 2016b.

WIESER, Andreas; SCHNEIDER, Lukas; JUNG, Jette; SCHUBERT, Sören. MALDI-TOF/MS in microbiological diagnostics- identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Munich, v. 93, n. 03, p. 965-974, dez. 2011.

WOODS, JP; KERSULYTE, D; GOLDMAN, WE; BERG, DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. **Journal of Clinical Microbiology**, Saint Louis, v. 31, n. 02, p. 463–464, Fev. 1993.

YAP, Felix Boon-Bin. Disseminated cutaneous sporotrichosis in an immunocompetent individual. **International Journal of Infectious Diseases**, Jalan Pahang, v. 15, n. 10, p. 727-729, abr. 2011.

ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria; ALMEIDA-PAES, Rodrigo; OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista de; FREITAS, Dayvison Francis Saraiva; GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara. New diagnostic applications in sporotrichosis. In: KHOPKAR, Uday. **Skin Biopsy: Perspectives**. 1º Edição. Slavka Krautzeka: In tech, 2011. cap. 4. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/skin-biopsy-perspectives/new-diagnostic-applications-insporotrichosis>> Acesso em: 16 abr. 2016.

ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely Maria; ALMEIDA-PAES, Rodrigo; RUIZ-BACA, Estela; TORIELLO, Conchita. Diagnosis of sporotrichosis; current status and perspectives. In: CARLOS, Iracilda Zeppone. **Sporotrichosis: new development and future prospects**. 1º Edição. São Paulo: Springer International Publishing, 2015. p. 133-145. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-11912-0_8> Acesso em: 16 abr. 2016.

ZHOU, Xun; RODRIGUES, Anderson; FENG, Peiying; DE HOOG, Gerrit Sybren. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, China, v. 66, n. 01, p. 153-165, maio 2014.

APÊNDICE A – Morfologia de conídios de *Sporothrix* sp. após 21 dias de crescimento em Ágar Corn Meal

A- URM 4861; B- URM 4291; C- URM 1013; D- URM 5111. Magnificação: 400x.

