UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes
espécies de *Sporothrix sp.* na esporotricose experimental

José Roberto Fogaça de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes
espécies de *Sporothrix sp.* na esporotricose experimental

José Roberto Fogaça de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A447a Almeida, José Roberto Fogaça de
Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes
espécies de *Sporothrix sp.* na esporotricose experimental / José
Roberto Fogaça de Almeida. -- São Paulo, 2013.
90p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Almeida, Sandro Rogério

1. Micologia médica 2. Esporotricose : Medicina 3. Imunologia :
Medicina I. T. II. Almeida, Sandro Rogério, orientador.

616.969 CDD

José Roberto Fogaça de Almeida

Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes espécies de
Sporothrix sp. na esporotricose experimental

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
Orientador/presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, Novembro de 2013

Dedicatória

Dedico,

*À minha mãe **Julia Fogaça**, ao meu pai **Wilson Roberto** e à minha irmã **Juliana Cristina**. As pessoas mais importantes da minha vida. Muito obrigado por tudo!*

*...Dedico também à **Bruna de Bem**, pela dedicação e apoio nos momentos que mais precisei. Obrigado por fazer parte da minha vida!*

Agradecimentos

Agradeço ao **Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida** pela orientação e conselhos durante o desenvolvimento desta dissertação. Agradeço pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pela confiança na minha capacidade de desenvolvimento e pela paciência que não deve ter sido pouca. Muito obrigado!

Agradeço à **Profª. Drª Leila Maria Lopes Bezerra** por ter cedido as cepas de S. brasiliensis para a realização desse trabalho.

Agradeço à **Profª. Drª Regina Lúcia Baldini** por ceder seu espaço laboratorial e materiais para a realização de alguns experimentos desse trabalho.

Agradeço à **Profª. Drª. Adelaide José Vaz** “in memoriam” e ao **Prof. Humberto Valvassori** pela aprendizagem, pelo incentivo e ajuda em seguir a carreira acadêmica.

Agradeço à **Drª. Luci Maria Bezerra Correa** pelo exemplo de dedicação à ciência, seriedade e profissionalismo. Por abrir as portas da microbiologia e do mundo laboratorial para mim. Agradeço a atenção, apoio e tempo a mim dedicados durante o processo de aprendizagem. Muito obrigado!

Agradeço à **Grasielle Pereira Jannuzzi** pela ajuda em todos os experimentos realizados nesse trabalho, pela agradável companhia, pelas discussões de trabalho e pelas outras discussões inúteis, dos temas mais variados e engraçados que possam existir. Muito mais que uma colega de trabalho, uma grande amiga.

Agradeço ao **Gilberto Hideo Kaihami** pela ajuda nos experimentos realizados, pelos ensinamentos e pela ajuda no meu desenvolvimento acadêmico. Obrigado por sempre estar disposto a ajudar e esclarecer infinitas dúvidas. Apesar de demorar uma hora para comer aqueles salgados com aquela pimenta horrível, te considero um grande amigo. Muito obrigado!

Agradeço à **Lavinia Maria Dal'Mas Romera** pela ajuda, pelos ensinamentos e por conseguir fazer qualquer experimento se tornar extremamente engraçado, como Western blot com papelão, ELISA com placas no chão, correr o gel com os fios invertidos...até buscar água Milli-Q era engraçado! Muito obrigado pelo convívio diário.

Agradeço à **Pollyanna Christina da Silva Martins** (Polly doida) pela ajuda, pela companhia, pelas suas frases marcantes e pelos momentos de insanidades que em 4 anos de faculdade não pude observar. Obrigado pela paciência e compreensão com as minhas brincadeiras.

Gostaria de agradecer em especial ao **Dr. Lucas Gonçalves Ferreira**, à **Suelen Silvana dos Santos**, à **Drª. Karla Letícia Santiago** e ao **Fábio Seiti Yamada Yoshikawa** por todo o auxílio, dedicação e paciência nas mais variadas dúvidas e durante a execução de diversos protocolos. Obrigado pelas conversas, pelos momentos alegres, pelas risadas e pela amizade.

Agradeço ao todos os meus amigos de laboratório, à **Profª. Drª. Karen Spadari Ferreira**, à **Luana Rossato**, ao **Roney Henrique Pereira**, à **Sonia Buratto** e à **Nicole Souza de Araujo** pelos ótimos momentos de descontração tornando o ambiente agradável para o trabalho.

Agradeço à **Hadassa Cristhina** do laboratório de microbiologia, pela companhia e pela ETERNA e divertida presença no laboratório de micologia.

Agradeço à **Miriam Akie Kasai**, a melhor IC que um laboratório pode ter.

Agradeço ao pessoal do laboratório de parasitologia, **Luciana Lima**, **Patrícia Ostermayer** e **Katia Sanches** pelo auxílio sempre que necessário.

Agradeço à **Sueli**, **Edna** e **Ana Dantas** pela paciência, pelo bom humor e pela ajuda nas questões burocráticas durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos meus amigos de faculdade, **João Paulo**, **Felipe Scavuzzi**, **Armando Moreira**, **Ricardo Betiol**, **Fernando Évora**, **Kleber Silva**, **Rodrigo Teixeira** e **Bruna Xavier**, pela descontração, pela amizade, pelas bebedeiras, pelas seções de piadas, pelas tensas e engraçadas discussões... Enfim, muito obrigado, pois sem vocês eu nunca seria um farmacêutico!

Agradeço à minha **família** pelo eterno apoio, dedicação e amor em todas as fases da minha vida.

Agradeço ao **Santos Futebol Clube**, meu time do coração, pelos momentos de alegrias e emoções vividos nos últimos anos !!

"A vida é aquilo que acontece enquanto você está planejando o futuro"
John Lennon

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica, no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ALMEIDA, J. R. F. **Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes espécies de *Sporothrix sp.* na esporotricose experimental.** 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Resumo

Esporotricose é uma micose subcutânea, causada principalmente pelo fungo *Sporothrix schenckii* e a nova espécie *Sporothrix brasiliensis*. Foi relatado na literatura que os camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* M-64 produziu uma resposta imune mista, em que o soro dos camundongos infectados reagiram apenas com uma glicoproteína de 70 kDa (gp70), identificada como importante fator de virulência. Assim o presente trabalho visa avaliar a importância à virulência e eficácia do anticorpo monoclonal P6E7 em outras cepas do complexo *Sporothrix*. Camundongos foram infectados com as cepas de *S. schenckii* (1099-18 e 15383) e *S. brasiliensis* (5110 e 17943). Cada 7 dias, o baço e fígado foram retirados para a análise do UFC e citocinas. Foi realizado *western blot* com o soro dos camundongos infectados e com anticorpo monoclonal P6E7 utilizando o exoantígenos das diferentes cepas. Foi realizado protocolo de tratamento com o anticorpo P6E7 nos camundongos infectados, para a avaliação da carga fúngica no baço e no fígado. Análise de citocinas mostrou que as cepas de *S. schenckii* induziram uma resposta mista Th1/Th2, entretanto nos camundongos infectados com as cepas de *S. brasiliensis*, não foi observada produção significativa de citocinas. No *western blot* realizado com exoantígenos das cepas de *Sporothrix sp.* foi observado diferentes componentes antigênicos, quando o soro de camundongos infectados foi utilizado, porém a reação com anticorpo monoclonal contra a gp70 demonstrou que a gp70 estava presente apenas no exoantígeno da cepa mais virulenta 5110. Infecção realizada com todas as cepas demonstrou cronicidade pela análise UFC. O tratamento com o AcMo P6E7 foi eficaz no tratamento da esporotricose experimental, sendo capaz de diminuir a carga fúngica, principalmente no baço dos camundongos infectados.

Palavras chaves: *Sporothrix sp.*. Relação patógeno-hospedeiro. Gp70. Anticorpo monoclonal P6E7.

ALMEIDA, J. R. F. **Immune response and virulence evaluation from different species of *Sporothrix* sp. in experimental sporotrichosis.** 2013. 90f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis, caused mainly by fungi *Sporothrix schenckii* and the new specie *Sporothrix brasiliensis*. Was reported in previous studies that mice infected with low virulent *S. schenckii* M-64 strain, produced a mixed immune response, where the infected mice serum reacted only with a 70 kDa glycoprotein (gp70), identified as important virulence factor. Thus, the present study aims to evaluate the virulence importance and effectiveness of monoclonal antibody P6E7 in other *Sporothrix* complex strains. Mice were infected with *Sporothrix* yeast strain of *S. schenckii* (1099-18 and 15383) and *S. brasiliensis* (5110 and 17943). Each 7 days, the spleen and liver were taken for CFU and cytokines analysis. The *western blot* was performed with the serum obtained from infected mice and a monoclonal antibody P6E7 using exoantigens from different strains. Was performed treatment protocol with the monoclonal antibody P6E7 on infected mice, for spleen and liver fungal burden evaluation. Cytokine analysis showed that *S. schenckii* strains induce a mixed Th1/Th2 response, however in the *S. brasiliensis* strains wasn't observed significant cytokine production. In *western blot* accomplished with the strains exoantigens was observed different antigenic components when the infected mice serum was used, however with monoclonal antibody against gp70 demonstrated that gp70 was present only in most virulent strain 5110. Infection performed with all strains demonstrated chronicity for CFU analysis. Treatment with Mab P6E7 was effective in experimental sporotrichosis, with reducing capable of fungal load, mainly in the spleen of infected mice.

Keywords: *Sporothrix* sp.. Pathogen-host interaction. Gp70. Monoclonal antibody P6E7.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Graus *Celsius*

AcMo P6E7 – Anticorpo monoclonal contra a proteína de 70 kDa

AIDS – *Acquired immunodeficiency syndrome* (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

APCs – *Antigen-presenting cell* (Células apresentadoras de antígenos profissionais)

BHI ágar – *Brain heart infusion* (Infusão cérebro e coração)

BSA – *Bovine serum albumin* (Albumina bovina sérica)

DO – Densidade óptica

ELISA – *Enzyme-Linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)

gp70 – Glicoproteína de 70 kDa

He – Coloração hematoxilina-eosina

IFN – Interferon

IL – Interleucina

kDa – *Kilodalton*

KOH – Hidróxido de potássio

MHC – *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

NO – *Nitrogen oxide* (Óxido nítrico)

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrão Molecular do patógeno)

PAS – Coloração ácido periódico-Schiff

PBS – *Phosphate buffered saline* (Solução salina de fosfato tamponada)

PBS – T – *Phosphate buffered saline with Tween 20* (Solução salina de fosfato tamponada com adição de 0,05% Tween 20)

pH – Potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

PRRs – *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconhecimento padrão)

rpm – Rotações por minuto

SDS-PAGE – *Sodium Dodecylsulfate – poly-acrylamide gel eletrophoresis* (Gel de poliacrilamida)

SPF – *Specific pathogens free* (Livre de patógenos específicos)

TA – Temperatura ambiente

TGF – *Transforming growth factor* (Fator de transformação do crescimento)

Th – Linfócitos T *helper*

TLR – *Toll like receptor* (Receptores do tipo Toll)

TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator alfa de necrose tumoral)

Treg – Linfócitos T regulatórios

UFC – Unidades formadoras de colônias

V – Voltagem

YCG – *Yeast nitrogen – casamino acids glucose*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da cinética na esporotricose experimental	37
Figura 2. Esquema da imunização passiva dos camundongos com o AcMo P6E7 na esporotricose experimental.....	40
Figura 3. Perfil eletroforético dos exoantígenos das cepas de <i>Sporothrix sp.</i> ..	42
Figura 4. <i>Western blot</i> com o “pool” do soro dos camundongos infectados com as cepas de <i>Sporothrix sp.</i>	45
Figura 5. Os níveis de anticorpos totais anti-exoantígeno dos camundongos infectados com as cepas de <i>Sporothrix sp.</i> detectados por ELISA	46
Figura 6. Níveis de IFN- γ produzidos pelo baço e pelo fígado nos camundongos infectados pelas cepas de <i>Sporothrix sp.</i>	48
Figura 7. Níveis de IL-4 produzidos pelo baço e pelo fígado nos camundongos infectados pelas cepas de <i>Sporothrix sp.</i>	49
Figura 8. Níveis de IL-10 produzidos pelo baço e pelo fígado nos camundongos infectados pelas cepas de <i>Sporothrix sp.</i>	50
Figura 9. Carga fúngica nos órgãos dos animais infectados com as cepas de <i>Sporothrix sp.</i> por grama de órgão.....	52
Figura 10. Curva de sobrevivência dos camundongos infectados com as cepas de <i>Sporothrix sp.</i>	53
Figura 11. <i>Western blot</i> com o AcMo P6E7 contra os exoantígenos das cepas de <i>Sporothrix sp.</i>	54
Figura 12. A carga fúngica nos órgãos dos camundongos infectados com a cepa de <i>S. schenckii</i> 15383 após o tratamento com AcMo P6E7	56
Figura 13. A carga fúngica nos órgãos dos camundongos infectados com a cepa de <i>S. schenckii</i> 1099-18 após o tratamento com AcMo P6E7	57
Figura 14. A carga fúngica nos órgãos dos camundongos infectados com a cepa de <i>S. brasiliensis</i> 5110 após o tratamento com AcMo P6E7	58
Figura 15. A carga fúngica nos órgãos dos camundongos infectados com a cepa de <i>S. brasiliensis</i> 17943 após o tratamento com AcMo P6E7	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 <i>Sporothrix</i> sp.	19
1.2 Esporotricose.....	21
1.3 Virulência do <i>Sporothrix</i> sp.	26
1.4 Interação fungo-hospedeiro	28
1.5 Justificativa.....	31
2. OBJETIVO	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Fungo e condições de cultura	35
3.2 Produção do exoantígeno.....	35
3.3 SDS-PAGE das proteínas liberadas pelos cepas de <i>Sporothrix</i> sp.	36
3.4 Infecção experimental com as cepas de <i>Sporothrix</i> sp.	36
3.5 Obtenção dos soros.....	37
3.6 Determinação do UFC	37
3.7 Dosagem de citocina	38
3.8 Dosagem de IgG total.....	38
3.9 <i>Western blot</i>	38
3.10 AcMo P6E7.....	39
3.11 Tratamento profilático	39
3.12 Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1 Perfil eletroforético dos exoantígenos das cepas de <i>Sporothrix</i> sp.	42
4.2 Detecção dos componentes antigênicos nos exoantígenos das cepas de <i>Sporothrix</i> sp.	43
4.3 Dosagens das Imunoglobulinas totais anti-exoantígeno no soro dos camundongos infectados com as cepas de <i>Sporothrix</i> sp.	46
4.4 Detecção de citocinas nos homoeonatos de baço e fígado.....	47
4.5 Contagem do UFC nos órgãos dos camundongos infectados com as cepas de <i>Sporothrix</i> sp.	51
4.6 Percentual de sobrevivência dos camundongos infectados com as diferentes cepas <i>Sporothrix</i> sp.....	53

4.7	Presença da gp70 no exoantígeno das cepas de <i>Sporothrix sp.</i> utilizando o AcMo P6E7	54
4.8	Imunização de modo terapêutico com o AcMo P6E7 em camundongos infectados com as cepas de <i>Sporothrix sp.</i>	55
5.	DISCUSSÃO.....	61
6.	CONCLUSÕES.....	68
7.	BIBLIOGRAFIA.....	69

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Sporothrix sp.*

Esporotricose é micose subcutânea que afeta humanos e animais com frequente comprometimento do sistema linfático, sendo *Sporothrix sp.* seu agente etiológico.

O primeiro relato do patógeno foi feito por Benjamin Robinson Schenck, em 1896, no *Johns Hopkins Hospital* em Baltimore, o fungo foi isolado a partir de nódulos ulcerosos no dedo e no antebraço de um paciente de 36 anos (SCHENCK, 1898; RIPPON, 1988). A amostra foi enviada ao micologista Erwin Smith, que concluiu que o fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum* (SCHENCK, 1898). O segundo caso de esporotricose foi em um menino que sofreu uma lesão no dedo com um martelo em 1900, essa lesão teve regressão espontânea, nesse caso o fungo foi classificado com sua denominação atual, *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) (HEKTOEN; PERKINS, 1900). No Brasil, Lutz e Splendore reportaram o primeiro caso de esporotricose em 1907, além de descreverem a fase parasitária do patógeno (LUTZ & SPLENDORE, 1907). Mais tarde, este fungo foi erroneamente incluído no gênero *Sporotrichum* novamente, que compreende fungos basidiomicetos que não são dimórficos nem patogênicos aos seres humanos ou outros animais (SCHELL et al., 1999). Esta nomenclatura errada permaneceu até 1962, quando Carmichael apontou diferenças na esporulação dos conídios entre os membros do gênero *Sporotrichum* e isolados dos casos de esporotricose (CARMICHAEL, 1962). Em uma revisão sobre taxonomia fúngica, segundo o *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS – número taxonômico serial: 181714), este fungo foi caracterizado no reino *Fungi* na divisão *Ascomycota*, subdivisão *Pezizomycotina*, classe *Sordariomycetes* subclasse *Sordariomycetidae*, ordem *Sordariales*, família *Cephalothecaceae*, gênero *Sporothrix*, espécie *Sporothrix schenckii*.

O *Sporothrix sp.* é um fungo que apresenta dimorfismo térmico, a forma miceliana (saprófita) e a forma de levedura (parasitária) (HOWARD, 1961). Na forma miceliana, o fungo é encontrado no solo, feno, tronco de árvores e vegetais em decomposição. Microscopicamente observa-se um composto de

hifas hialinas, septadas, ramificadas, com 1 à 2 µm de largura. Essas hifas contêm conidióforos finos que no ápice possuem uma pequena vesícula com denticulos, que são capazes de produzir conídios de 2 a 4 µm, que se organizam em grupos parecidos com margaridas. Se for cultivado a 25 °C, o fungo apresenta colônias em forma membranosa, com a superfície enrugada, de tonalidade branca a castanho. Após sucessivos cultivos a colônia pode perder a pigmentação, irreversivelmente (ALMEIDA, 2008; LACAZ, 1998; LOPES-BEZERRA et al., 2006).

Quando presente no tecido do hospedeiro o fungo apresenta-se na forma de levedura. Essa forma é encontrada próxima aos granulomas, geralmente em formato alongado, fusiforme, semelhante a um charuto. Quando cultivado a 37 °C, microscopicamente é observado formas arredondadas ou ovais, com 2 à 6 µm de diâmetros com pequenas células em brotamento (ALMEIDA, 2008; LACAZ et al., 1998; MENDONÇA et al., 1976; SIDRIM et al., 2010; KENYON et al., 1984; MEHTA et al., 2007). As colônias leveduriformes, apresentam-se úmidas, de aspecto cremoso, com tonalidade branca, sendo alguns isolados castanhos (ALMEIDA, 2008; LACAZ et al., 1998; MENDONÇA et al., 1986; SIDRIM et al., 2010).

Antigamente a espécie *S. schenckii* era conhecida como a única espécie responsável pela esporotricose, porém, nos últimos anos foi revelada a existência de grupos, entre os isolados clínicos de humanos e animais da doença, com alta variabilidade genotípica e fenotípica, tratando-se então de um complexo *Sporothrix* (KONG et al., 2006; ZHANG et al., 2006; MARIMON et al., 2006; 2007). Essa variabilidade genotípica foi evidenciada após o surto de esporotricose no estado do Rio de Janeiro (REIS et al., 2009). Também foi observado diferentes perfis fenotípicos como a resistência ao pH, termotolerância e virulência (FERNANDES et al., 2009). Algumas características como diferentes formas macroscópicas, assimilação de carboidratos, capacidade de crescer na temperatura de 37 °C e a sequência do gene calmodulina, foram utilizadas para descrever quatro novas espécies no complexo *Sporothrix*. *Sporothrix globosa*, um fungo distribuído em todo o mundo (MADRID et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010), *Sporothrix brasiliensis* (*S. brasiliensis*), uma espécie isolada somente no Brasil (MARIMON et al., 2007), *Sporothrix mexicana*, limitado ao México (MARIMON et al., 2007), e

Sporothrix luriei, anteriormente *S. schenckii* var. *luriei* (MARIMON et al., 2008). Estas novas espécies identificadas são diferentes entre si, principalmente na quantidade e na forma da gemulação das leveduras e também pelo aspecto das septações das hifas (REVISADO em BARROS et al., 2011).

Castro e colaboradores compararam 12 isolados zoofílicos, antropofílicos e geofílicos originalmente identificados como *S. schenckii*, revelando que, pela análise dos loci (calmodulina e ITS), se tratavam de isolados de duas espécies, *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, sendo os isolados de esporotricose felina todos identificados como *S. brasiliensis* (CASTRO, 2010). Rodrigues corrobora com esses dados, comparando 161 isolados de esporotricose de diversas regiões do país, observou que todos os isolados zoofílicos foram genotipados como *S. brasiliensis* (RODRIGUES, 2010). Nas últimas décadas surtos de esporotricose ocorreram no Brasil por transmissão zoonótica, sendo os gatos os principais hospedeiros. Em um estudo realizado por Rodrigues e colaboradores foi demonstrado que *S. brasiliensis* está em maior prevalência, cerca de 96 %, nos gatos e, conseqüentemente, nos humanos que contraíram a esporotricose destes animais. Nos estados do São Paulo, Paraná e Minas Gerais os isolados partilham do mesmo genótipo dos isolados do surto no Rio de Janeiro (RODRIGUES et al., 2013). Através desses dados, pode ser considerado que existam 2 principais agentes etiológicos da esporotricose, *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, sendo *S. brasiliensis* a mais comum nos casos de esporotricose felina e na humana por transmissão zoonótica.

Nos estudos taxonômicos realizados com a nova espécie *S. brasiliensis* foi observado que esta espécie apresenta conídios sésseis pigmentados, não assimila rafinose e é a única espécie que não assimila sacarose. Apresenta o menor crescimento em ágar batata, a 20 °C e 30 °C, já a 37 °C, *S. brasiliensis* é a espécie que apresenta maior crescimento, quando comparada a outras espécies do complexo *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007; MARIMON et al., 2008).

1.2 Esporotricose

A esporotricose no início do século teve alta prevalência na França e nos Estados Unidos. Atualmente possui distribuição mundial, porém, é mais relatada em países de climas tropicais e subtropicais como México, Brasil, Peru

e Uruguai, ocorrendo frequentemente no outono e no verão (LOPES-BEZERRA et al., 2006; SIDRIM et al., 2010). É considerada a micose subcutânea mais frequente do mundo (BONIFAZ et al., 2010).

Algumas atividades como jardinagem, agricultura, horticultura, pescaria, caça, mineração entre outras, que facilitem a exposição ao fungo, estão associadas com essa micose (BARROS et al., 2011; RIPPON, 1988). No momento, devido à evidência da transmissão zoonótica, veterinários, técnicos de veterinária e proprietários de gatos são considerados uma nova categoria de risco para a aquisição da doença (BARROS et al., 2011). Profissionais de laboratório, que manipulam culturas de *Sporothrix sp.* também pertencem ao grupo de risco (THOMPSON et al., 1977, COOPER et al., 1992).

Nas últimas décadas a frequência da esporotricose esta mudando no modo de transmissão e na distribuição geográfica. Alguns fatores ambientais, melhoria no diagnóstico e na urbanização, explicam as alterações no perfil da doença. Existe pouca informação sobre a incidência da esporotricose, os dados conhecidos são aqueles gerados por publicações de casos (BARROS et al., 2011).

A maior epidemia relatada foi na região de Witwatersrand, na cidade de Johannesburg, África do Sul, entre 1941 e 1944 com cerca de 3000 mineradores infectados pelo fungo presente nas vigas de madeira da estrutura da mina (HELM; BERMAN, 1947; QUINTAL, 2000). Um surto em 15 estados, nos Estados Unidos, envolveu cerca de 80 indivíduos que foram infectados com *S. schenckii* após o contato com um musgo, ao participarem de um programa de reflorestamento (CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1988; DIXON et al., 1991). Fora do continente americano poucos casos são relatados, porém na Austrália a incidência vem aumentando nos últimos anos. Em Queensland, foram registrados 16 casos de esporotricose em nove meses através de contato de agricultores com feno contaminado (CONIAS et al., 1998). Outro caso envolveu 41 pacientes em Busselton-Margaret River, sudoeste australiano, entre 2000 e 2003, também por feno contaminado (FEENEY et al., 2007). Além da Austrália outros países, fora do continente americano, são áreas endêmicas, como a África do Sul, Índia e Japão (PAPPAS et al., 2000; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001). Na América Latina a caça de tatus tem sido muito relacionada a casos de esporotricose,

principalmente no Uruguai (ALVES et al., 2010; CONTI-DIAZ, 1989). Em uma área rural do Peru, dos 238 casos estudados, 60 % ocorreram em crianças menores de 15 anos de idade (PAPPAS et al., 2000). O Peru apresenta a região mais endêmica do mundo, uma área montanhosa chamada de Abancay, teve a incidência de, aproximadamente, 60 casos por 10000 habitantes de 1995 a 1997 (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001).

No Brasil, a esporotricose é mais frequente nas regiões sul e sudeste sendo São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul os estados com maior incidência (BARROS et al., 2001; SCHUBACH et al., 2008). O maior surto zoonótico já registrado ocorreu no Brasil, no estado do Rio de Janeiro (SCHUBACH et al., 2005). De acordo com o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, entre 1998 e 2009 foram registrados mais de 2000 casos em seres humanos e 3000 casos em gatos (BARROS et al., 2010). Em outro estudo, entre 1998 e 2001, cerca de 86 % dos casos de esporotricose registrados foram de pacientes que tiveram contato profissional ou doméstico com gatos contaminados (BARROS et al., 2004). Por conta disso, a doença se tornou endêmica no estado do Rio de Janeiro.

Apesar de já ter sido registrado a transmissão da doença por cães, cavalos, esquilos e tatus, os gatos são os principais transmissores zoonóticos da esporotricose (KAUFFMAN et al., 1999; SCHUBACH et al., 2003; TABOADA, 2000). Um fator importante para o surto ser consequente dos gatos, é a questão socioeconômica. A maioria dos donos de gatos está vivendo em áreas negligenciadas e quando os animais morrem, acabam sendo abandonados nas ruas ou enterrados em terrenos próximos, que permite a volta do agente ao meio ambiente, favorecendo o contato com outros gatos selvagens (CHAVES et al., 2013).

Schubach e colaboradores isolaram *Sporothrix sp.* das unhas e cavidades orais de 148 gatos domésticos com esporotricose e 84 gatos aparentemente saudáveis no estado do Rio de Janeiro, demonstrando que a transmissão pode ocorrer através de arranhões ou mordidas destes animais (SCHUBACH et al., 2001; SCHUBACH et al., 2002). Um dos fatores da alta incidência da transmissão zoonótica pelos gatos, pode ser justificado pelo possível inóculo de leveduras e não de conídios ou fragmentos de hifa. O fato de não haver a

necessidade da transformação de hifa em levedura pode justificar as formas mais graves da doença (FERNANDES et al., 2000).

Existem diversas manifestações clínicas da esporotricose, vários fatores como a quantidade de inóculo, estado do sistema imune do hospedeiro, a virulência do isolado inoculada e profundidade da lesão são capazes de influenciar as formas clínicas da doença. A esporotricose apresenta diferentes classificações realizadas por diversos autores. Uma das classificações utilizadas foi a de acordo com a localização das lesões, sendo dividida em forma cutânea, mucosa e extracutânea (BARROS et al., 2011).

Na forma cutânea, a infecção geralmente aparece após uma inoculação traumática na pele. Depois de penetrar a pele, o fungo converte-se na forma de levedura e pode permanecer localizada no tecido subcutâneo ou se estendem ao longo dos vasos linfáticos adjacentes, constituindo a forma cutânea localizada ou a forma cutânea-linfática, respectivamente (SIDRIM et al., 2010; STALKUP et al., 2002). A forma cutânea localizada é representada por uma única lesão verrucosa, acneiforme e eritomatosa. Embora se caracterizem pela transitoriedade, as lesões, em geral, retornam e frequentemente persistem por anos, até serem tratadas (RIPPON, 1988; BARROS et al., 2011; LOPES-BEZERRA et al., 2006; SIDRIM et al., 2010). A forma cutânea-linfática é a mais frequente, causando cerca de 80 % dos casos (BONIFAZ et al., 2007). A lesão primária é normalmente localizada nas mãos e antebraços onde, posteriormente, ocorre a formação de nódulos subcutâneos, através das vias linfáticas, uma linfagite, característico da esporotricose cutânea-linfática (BARROS et al., 2011; SIDRIM et al., 2010). Existe a forma cutânea disseminada, que é bem menos frequente que as demais, e está associada algum tipo de imunossupressão, caracteriza-se por lesões cutâneas múltiplas em locais não contínuos, sem envolvimento extracutâneo (BARROS et al., 2011; CARVALHO et al., 2002; SIDRIM et al., 2010; STALKUP et al., 2002). A forma mucosa pode afetar a região da mucosa nasal, apresentando lesões no septo, com a drenagem de secreções sanguinolentas. Na região da conjuntiva dos olhos, onde além de uma lesão granulomatosa ocorre a secreção de um líquido seroso-purulento com vermelhidão nos olhos (SCHUBACH et al., 2005; BARROS et al., 2008; HAMPTON et al., 2002).

A forma extracutânea é rara, pode ser causada pela inalação de esporos ou por disseminação hematogênica decorrente de uma inoculação profunda na pele (RAMOS-E-SILVA et al., 2007). Não se encontra associação entre essa forma e a atividade ocupacional, somente existe relação com alguns fatores que prejudiquem a resposta imune, como alcoolismo, transplante de órgãos, diabetes *mellitus* e imunodeficiências (KAUFFMAN et al., 1999; VIEIRA-DIAS et al., 2007; VILELA et al., 2007). A forma osteoarticular e a forma pulmonar constituem a maioria dos casos de esporotricose extracutânea. Também há relatos de sinusite, meningite, endoftalmite, laringite e fungemia por *S. schenckii* (RAMOS-E-SILVA, 2007; ALMEIDA, 2008; SCHECHTMAN, 2010). Esporotricose pode ser diagnosticada principalmente através da correlação entre os dados clínicos com os laboratoriais. O diagnóstico laboratorial é realizado através de tecidos obtidos de biópsias, pus e exsudatos. O material primeiramente é clarificado com KOH (Hidróxido de potássio) 20 % e é realizado o exame de micológico direto, observando corpos em formas ovais ou alongados em formatos de charutos. As colorações mais usadas são pela impregnação pela prata, PAS (Coloração ácido periódico-Schiff) e HE (Coloração hematoxilina-eosina), observando corpos asteroides na zona periférica do granuloma, porém esse método não é usado como rotina num laboratório de micologia, já que achados histopatológicos são inespecíficos, pois o organismo não é facilmente visualizado. A confirmação do diagnóstico micológico é através do isolamento do seu agente etiológico em meios de cultura clássicos como o ágar Sabouraud, acrescido ou não de antibióticos e incubado a 25 - 30 °C por em média 5 dias (ALMEIDA, 2008; SIDRIM et al., 2010). Testes sorológicos como ELISA (Ensaio imunoenzimático) e imunofluorescência não são utilizados como rotina, sendo importante lembrar que o teste cutâneo com a esporotriquina, que é um antígeno do fungo para injeção intradérmica, é geralmente positivo em cerca de 90 % dos casos confirmados de esporotricose e apenas pode excluir esporotricose, pois se positivo pode ser referente a infecções antigas (ALMEIDA, 2008; ITOH et al., 1986).

Para o tratamento da esporotricose, desde a descoberta da doença, o iodeto de potássio é utilizado para as formas cutânea-linfáticas e cutâneas localizadas. Diferentes protocolos terapêuticos são utilizados, dependendo das

condições clínicas do paciente e da extensão da lesão, podem ser usados terbinafina e fluconazol, porém nas formas extracutâneas e disseminadas as medicações de melhor escolha são o itraconazol e a anfotericina B (LOPES-BEZERRA et al., 2006; SIDRIM et al., 2010; SONG et al., 2011).

1.3 Virulência do *Sporothrix* sp.

A virulência é uma capacidade intrínseca que difere microrganismos patogênicos de não patogênicos, contudo alguns microrganismos não virulentos são considerados patogênicos, devido ao imunocomprometimento em alguns indivíduos. Em indivíduos saudáveis a virulência é a responsável pelo momento em que a relação entre o patógeno e o hospedeiro resulta em prejuízo ao hospedeiro, causando assim a doença. A virulência também pode ser medida através da mortalidade produzida pelo patógeno ou pelo seu poder invasivo nos tecidos do hospedeiro (TRABULSI, 2005).

Nos últimos anos vários estudos têm demonstrado uma diversidade de moléculas denominadas como fatores de virulência em fungos, tais como, moléculas de adesão, melanina, proteases, enzimas de vias metabólicas e polissacarídeos (HOGAN et al., 1996). Alguns fatores de virulência do *S. schenckii* são bem conhecidos e semelhantes a outros fungos patogênicos, como por exemplo, a termotolerância (CASADEVALL et al., 2006). Foi demonstrado que alguns isolados clínicos da forma cutânea localizada são incapazes de crescer a 37 °C, diferentemente de formas mais invasivas da esporotricose, como cutânea-linfática e disseminada (TACHIBANA et al., 1999; 2001; KWON-CHUNG et al., 1992; MESA-ARANGO et al., 2002). O ergosterol, também presente na membrana celular, é capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio, produzido pelo macrófago, formando peróxido de ergosterol, sendo isso um mecanismo de evasão do fungo (SGARBI et al., 1997). A melanina, também é capaz de promover resistência ao fungo contra a fagocitose, pelos macrófagos (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000). Macroscopicamente apenas a fase miceliana do fungo se observa a presença de melanina, entretanto, *in vitro*, ocorre à produção de melanina em leveduras durante a infecção (MORRIS-JONES et al., 2003). Foi demonstrado, que uma cepa de *S. schenckii* com presença de melanina é capaz de ter uma grande capacidade invasiva e promover a formação de granulomas multifocais, ao contrário de

uma cepa albina, com o mesmo perfil genotípico (REVISADO em BARROS et al., 2011). A produção dessa melanina ocorre através de compostos fenólicos como a L-DOPA (ALMEIDA-PAES et al., 2009), corroborando com isso, foi demonstrado uma possível modulação da produção de melanina através da composição do meio de cultivo, alterando assim o perfil de virulência do fungo (TEIXEIRA et al., 2010).

Foi observado virulências distintas entre essas novas espécies do complexo *Sporothrix* (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009). Alguns autores defendem que apresentações clínicas mais severas da esporotricose são ocasionadas por fatores intrínsecos do fungo. Vários estudos envolvendo a comparação da virulência de diferentes isolados clínicos da esporotricose já foram realizados, observando que isolados das formas mais invasivas da doença são capazes de serem mais virulentos que isolados de formas mais superficiais, demonstrando que cada isolado possui fatores intrínsecos de virulência, sendo esses fatores determinantes para as manifestações graves da doença (TACHIBANA et al., 1998; BRITO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2009). Porém alguns autores defendem que alterações imunológicas do hospedeiro são os fatores responsáveis pela gravidade da doença (CARLOS et al., 2009; MAIA et al., 2006).

As variações dos componentes da parede celular podem interferir na virulência do fungo. A parede celular fúngica é o envelope que separa a superfície do fungo com o meio extracelular e desempenha um papel central na interação patógeno-hospedeiro, a camada mais externa da parede celular do *S. schenckii* consiste de um material microfibrilar amorfo (LANE et al., 1969). A parede celular dos fungos é constituída de aproximadamente 80-90 % de carboidratos, 5-20 % de proteínas e 1-7 % de lipídios. Existem também polissacarídeos insolúveis como as quitinas e β -glucanas que conferem rigidez à parede celular fúngica em ambas as fases morfológicas do fungo (LOPEZ-BEZERRA, 2006). Os principais constituintes de superfície dos antígenos de *S. schenckii* são raminomananas e galactomananas (TRAVASSOS, 1989).

Um ponto importante na avaliação da virulência de um patógeno é a de adesão nas células do tecido hospedeiro, representando um avanço no processo de invasão, para que assim se estabeleça a doença. Quando os componentes da parede celular fúngica interagem com os componentes da

matriz extracelular do hospedeiro, tal aderência está associada às adesinas, assim essas adesinas se ligam principalmente a fibronectina, laminina e colágeno tipo 2 (LIMA et al., 1999). A fibronectina e a laminina se ligam fortemente em células leveduriforme do *S. schenckii*, diferentemente da ligação nos conídios do fungo (LIMA et al., 2004). Proteinases produzidas extracelularmente, como por exemplo, proteinases 1 e 2, apresentam a propriedade de hidrolisar o extrato córneo, ajudando na disseminação do fungo (TSUBOI et al., 1987). Em processos fisiológicos a fibronectina está envolvida em processos como os de adesão e migração na coagulação e cicatrização (POTTS & CAMPBELL, 1996; WHITE et al., 2008). A expressão das adesinas da fibronectina está diretamente proporcional com a virulência (LIMA et al. 1999; 2001; 2004; TEIXEIRA et al., 2009). Já a laminina, fisiologicamente, participa da sustentação do tecido epitelial. Os receptores fúngicos da laminina são diferentes dos receptores da fibronectina (LIMA et al., 2004).

Através de uma eletroforese dos exoantígenos, obtidos da cepa, pouco virulenta, *S. schenckii* M-64 previamente isolada de um caso de esporotricose cutânea-linfática, foi observado um perfil proteico de 12 bandas, foi demonstrado que uma glicoproteína com a massa molecular de 70 kDa (gp70), está presente na superfície do fungo, e também é secretada no meio de cultura. Também foi demonstrado uma função adesiva à fibronectina (NASCIMENTO et al., 2005). Uma glicoproteína, de mesmo peso molecular observado pelo nosso laboratório, foi purificada e foi observado um pI (ponto isoelétrico) de 4,1 e cerca de 5,7 % da sua massa molecular composta de N-glicanos (RUIZ-BACA et al., 2009).

1.4 Interação fungo-hospedeiro

Como dito anteriormente, alguns autores acreditam que a resposta imunológica do hospedeiro é essencial na progressão da esporotricose (CARLOS et al., 2009; MAIA et al., 2006). Embora os mecanismos imunológicos de defesa contra o *Sporothrix* sp. não estejam bem estabelecidos, a resposta inata, celular e humoral tem um papel importante no controle da esporotricose.

As APCs (Células apresentadoras de antígenos profissionais) como, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, são capazes de reconhecer e

fagocitar o fungo. Para que ocorra o reconhecimento pelas células do hospedeiro, é necessário que os PAMPs (Padrões moleculares do patógeno), expressos na superfície do fungo sejam reconhecidos pelos PRRs (Receptores de reconhecimento padrão), localizados na superfície das APCs, gerando uma série de reações, como a fagocitose do fungo (BUZÁS et al., 2006). Após a fagocitose os peptídeos imunogênicos do fungo são processados pelos fagócitos e apresentados para os linfócitos T, gerando células efectoras e de memória contra o patógeno. A apresentação do antígeno ocorre através do MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) de classe I e do MHC de classe II que primam linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ respectivamente. Depois da ativação, as células TCD4⁺ se diferenciam em Th1, Th2, Th17 (Linfócitos T *helper*) ou Treg (Linfócitos regulatórios) com produção de diferentes citocinas, gerando diferentes tipos de respostas (WÜTHRICH et al., 2012). Uma das funções dessa produção de citocinas é para que ocorra o desenvolvimento do granuloma, que é um componente essencial na defesa do hospedeiro contra o fungo (TACHIBANA et al., 1999; UENOTSUCHI et al., 2006). Os linfócitos TCD4⁺ e os macrófagos, assim como a produção de IFN- γ (Interferon), são necessários para a formação do granuloma (TACHIBANA et al., 1999). Apesar de existir poucos estudos relatando a importância das células TCD8⁺ na esporotricose, sabe-se que, juntamente com os linfócitos TCD4⁺, essa célula está presente no granuloma (TACHIBANA et al., 1999; KOGA et al., 2002).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, tem ativação rápida e é responsável pela defesa nos momentos iniciais da infecção. Em contraste, a imunidade adquirida que é mediada pelos linfócitos T e B, e requer de 7 a 10 dias para que ocorra uma resposta celular e humoral (ALMEIDA, 2012).

Estudos recentes demonstraram que extratos lipídicos de leveduras de *S. schenckii* se ligam em TLR 4 (Receptores do tipo Toll) e essa interação leva indução de um *burst* oxidativo contra o fungo (CARLOS et al., 2009; SASSA et al., 2012). Uma levedura de *S. schenckii* isolada de uma forma cutânea localizada é capaz de se ligar em TLR 2 e TLR 4 induzindo a ativação de JNK, ERK e p38 MAPK, ocorrendo a produção de IL-6 (Interleucina) e TNF- α (Fator de necrose tumoral), diferentemente da levedura isolada da forma mucosa. Kajiwara e colaboradores defendem que o TLR 4 é o principal receptor contra o

S. schenckii na forma cutânea localizada, pois é capaz de induzir uma resposta Th1, com a produção de citocinas pró inflamatórias (UENOTSUCHI et al. 2006; KAJIWARA et al., 2004).

Foi relatada a importância dos neutrófilos no controle da esporotricose (KAJIWARA et al., 2004). Os neutrófilos são capazes de destruir o fungo logo após sua invasão no tecido hospedeiro, através da fagocitose e de liberação de espécies reativas de oxigênio, independente de linfócitos T. Sem os linfócitos T no tecido os macrófagos também são capazes de fagocitar o fungo, devido a receptores na sua superfície para galactomanana e raminomanana, presentes nas células fúngicas, descritos anteriormente (REX et al., 1990; CUNNINGHAM et al., 1979).

A resposta imune celular envolve principalmente a ativação dos macrófagos. A ativação dessas células ocorre, principalmente, por $\text{TNF-}\alpha$, que estimula os macrófagos a produzirem NO (óxido nítrico), uma molécula oxidante, altamente citotóxica para o *S. schenckii* (CARLOS et al., 2003; FERNANDES et al., 2000). Ocorre uma diminuição da produção de $\text{TNF-}\alpha$ nas 6 semanas iniciais da infecção, favorecendo a projeção da doença. O oposto ocorre 2 meses após a infecção, quando aumenta os níveis de IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$, favorecendo a eliminação do fungo (CARLOS et al., 1994). Vários estudos relatam a importância da resposta imune celular na esporotricose, onde foi observado o que em pacientes, com alguma deficiência nesse tipo de resposta, apresentam formas extracutâneas da doença. Na esporotricose experimental foi demonstrado que a transferência de timócitos para camundongos atímicos tornam esses camundongos suscetíveis em camundongos resistentes a doença (DICKERSON et al., 1983; PLOUFFE et al., 1979).

Uma resposta baseada em anticorpos é capaz de mostrar proteção contra algumas micoses, como a paracoccidioidomicose e candidíase (CASADEVALL et al., 2005; XANDER et al., 2007; BUISSA-FILHO et al., 2008; TOLEDO et al., 2010; ZHANG et al., 2011). Foi sugerido por Carlos e colaboradores a participação da resposta imune humoral apenas em estágios mais avançados da doença, onde também foi observada a produção de IL-4 após 6 semanas de infecção (CARLOS et al., 2009; MAIA et al., 2006). Como descrito anteriormente, nosso grupo laboratorial demonstrou que camundongos

infectados com a cepa de *S. schenckii* M-64, são capazes de produzir anticorpos, IgG1, específicos contra uma glicoproteína de 70 kDa durante a esporotricose experimental, indicando que essa glicoproteína seja um importante componente antigênico do *S. schenckii*, participando da modulação da resposta imune (NASCIMENTO et al., 2005). Essa glicoproteína é caracterizada como uma adesina por se ligar na matriz extracelular do hospedeiro, facilitando uma lesão no tecido do hospedeiro. Sabe-se que um dano tecidual induz a produção de TGF- β 1 (Fator de transformação do crescimento), que é capaz de aumentar a adesão do fungo nas células endoteliais, e com isso favorecer a migração do fungo para tecidos mais profundos (FIGUEREDO et al., 2007). Um AcMo (anticorpo monoclonal) contra a gp70, denominado P6E7, produzido em nosso laboratório, demonstrou ser protetor na esporotricose experimental. Foi observado em camundongos tratados com o AcMo P6E7, após, antes e durante a infecção, uma diminuição da carga fúngica no baço e no fígado, além de prevenir um desenvolvimento de formas mais grave da doença. Os anticorpos foram capazes de opsonizarem as células fúngicas aumentando assim a fagocitose dos mesmos, além de aumentar a produção de IFN- γ nos órgãos infectados (NASCIMENTO et al., 2008). Também foi observado que essa opsonização é capaz de aumentar os níveis de TNF- α , *in vitro*, assim aumentando a capacidade fungicida dos macrófagos (FRANCO et al., 2011). Uma resposta do tipo Th1 é de grande importância no controle da esporotricose, sendo IFN- γ e TNF- α as citocinas mais características desse tipo de resposta (UENOTSUCHI et al. 2006).

1.5 Justificativa

A virulência e a resposta imune são determinantes para o desenvolvimento e a gravidade da esporotricose. Com recentes surtos de esporotricose em áreas urbanas, surgimento da transmissão zoonótica felina e predominância de *S. brasiliensis* nos casos da doença, criou-se um novo paradigma da doença, aumentando a importância de estudar aspectos como a virulência e a resposta imunológica contra os principais membros do complexo *Sporothrix*, assim como observar a presença da gp70 e a eficácia do anticorpo monoclonal P6E7 em cepas mais virulentas e de espécies diferentes da *S. schenckii* M-64.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imunológica contra cepas virulentas 15383 e 1099-18 de *S. schenckii* e 5110 e 17943 de *S. brasiliensis*, e determinar a eficácia do AcMo P6E7 no tratamento da esporotricose experimental ocasionada por essas cepas.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil eletroforético dos exoantígenos das diferentes cepas de *Sporothrix sp.* e os componentes antigênicos presentes nesses exoantígenos através do soro dos camundongos infectados, assim como a presença da gp70 com o AcMo P6E7;
- Avaliar o tipo de resposta imunológica induzida pelas cepas de *Sporothrix sp.* Pela dosagem de IFN- γ , IL-4 e IL-10 no homogeonatos do fígado e do baço dos camundongos infectados;
- Comparar a virulência das cepas de *Sporothrix sp.* através da carga fúngica no fígado e no baço dos camundongos infectados;
- Avaliar a eficácia do tratamento da esporotricose experimental com o AcMo P6E7 nas cepas de *Sporothrix sp.*;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fungo e condições de cultura

Foram utilizadas quatro cepas do *Sporothrix sp.*: cepa de *S. schenckii* 15383 (ATCC MYA - 4820) - um isolado de esporotricose cutânea e osteoarticular; cepa *S. schenckii* 1099-18 (ATCC MYA - 4821) - um isolado de esporotricose cutânea-linfática; cepa de *S. brasiliensis* 5110 (ATCC MYA - 4823) - um isolado de esporotricose cutânea em um felino no Rio de Janeiro e a cepa de *S. brasiliensis* 17943 (ATCC MYA - 4824) - um isolado de meningite por esporotricose. Estas cepas foram mantidas na micoteca do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), na fase de levedura em ágar-BHI (Infusão cérebro e coração) (HIMEDIA) a 37 °C com repiques realizados a cada 15 dias.

3.2 Produção do exoantígeno

As células leveduriformes, de cada uma das cepas de *Sporothrix sp.*, cresceram em cinco tubos de ágar-BHI, por cinco dias a 37 °C, e foram transferidas para balões de Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 100 mL de meio líquido YCG (*Yeast Nitrogen – Casamino Acids Glucose*) cada. Os pré-inóculos foram cultivados por três dias, sob agitação de 200 rpm (rotações por minuto) a 37 °C. Estes pré-inóculos, foram transferidos para balões de Erlenmeyer de 2000 mL, contendo 400 mL de meio líquido YCG e foram incubados por mais sete dias sob agitação de 200 rpm, à 37 °C. Após este período, o crescimento fúngico foi interrompido pela adição de 0,2 g/L de timerosal (SYNTH) e os cultivos foram mantidos por 24 horas a 4 °C. Em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm, sendo que os sedimentos foram desprezados e os sobrenadantes filtrados em papel filtro e concentrados 10 vezes pelo sistema Amicon (MILLIPORE) com uma membrana de ultrafiltração YM10 com o peso molecular limite de 10 kDa (MILLIPORE) e então dialisados contra PBS (Solução salina de fosfato tamponada), com duas trocas, por 24 horas a 4 °C. A seguir, os exoantígenos dialisados foram filtrados em filtro de 45 µm (MILLIPORE) e estocados a -20 °C (SCOTT; MUCHMORE, 1989).

Posteriormente as proteínas foram dosadas utilizando o reagente Bradford (SIGMA) e como padrão o BSA (Albumina de soro bovino) (SIGMA). Todos os procedimentos seguiram-se de acordo com o fabricante.

3.3 SDS-PAGE das proteínas liberadas pelas cepas de *Sporothrix sp.*

O gel de SDS-PAGE (Gel de poliacrilamida) para eletroforese vertical foi preparado em uma cuba de eletroforese vertical para mini gel (BIO-RAD Mini PROTEAN), constando de um gel de separação linear a 12 % de poliacrilamida e um gel de empilhamento a 3 % de poliacrilamida com 0,75 mm de espessura.

Alíquotas dos exoantígenos das cepas de *Sporothrix sp.* foram diluídas em tampão de Laemmli e mantidas por 10 minutos, em água 100 °C, por banho Maria, e aplicadas nos géis. Foi utilizado como padrão de peso molecular o *PageRuler Range Prestained Protein Ladder* (THERMO SCIENTIFIC). A corrida das proteínas e do padrão foi submetida a uma corrente eletroforética de 120 V (Voltagem) por 90 minutos. Após a separação das proteínas, os géis foram submetidos a realização de *western blot* (item 3.5) ou corados pela prata, no qual utilizar-se o *SilverQuest Staining Kit* (INVITROGEN) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com o fabricante.

3.4 Infecção experimental com as cepas de *Sporothrix sp.*

Foram utilizados 100 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c de 8 a 12 semanas de idade, por experimento, que foram obtidos no biotério de produção e experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram criados em condições – SPF (Livre de patógenos específicos). As cepas de *Sporothrix sp.* foram cultivadas em meio Ágar-BHI a 37 °C por cinco dias. A seguir as leveduras foram suspensas em 5 mL de PBS estéril para realização da contagem das leveduras na câmara de Neubauer e diluídas na proporção de 1:1 com corante azul de trypan para verificação da viabilidade celular. Quatro grupos de 20 camundongos foram infectados, intraperitonealmente, com um inóculo de 100 µL com 5×10^6 de leveduras das cepas de *Sporothrix sp.* com o auxílio de uma seringa de 1 mL. Outro grupo de 20 camundongos, considerado como grupo controle, recebeu intraperitonealmente 100 µL de PBS estéril.

Nos 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção, cinco camundongos de cada grupo foram anestesiados e eutanasiados através de punção intracardiaca. O baço e o fígado destes animais foram retirados para avaliação da infecção pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e dosagem das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 (**Figura 1**).

Figura 1. Esquema da cinética na esporotricose experimental. Camundongos BALB/c foram divididos em 4 grupos de 20 camundongos cada e foram infectados intraperitonealmente, com um inóculo de 100 μ L com 5×10^6 de leveduras das cepas de *Sporothrix* sp.. Outro grupo de 20 camundongos, considerado como grupo controle, recebeu intraperitonealmente 100 μ L de PBS estéril. Nos 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção, cinco camundongos de cada grupo foram eutanasiados através da punção intracardiaca e o baço e o fígado destes animais foram retirados para avaliação da infecção pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e dosagem de citocinas.

3.5 Obtenção dos soros

O sangue dos camundongos coletados durante a punção intracardiaca foram centrifugados a 10000 rpm por 20 minutos para separação dos soros. Estes foram estocados à temperatura de -20 °C até o momento do uso.

3.6 Determinação do UFC

O fígado e o baço retirados de cada animal foram colocados em placas de Petri estéreis e pesados imediatamente. Cada órgão foi homogeneizado mecanicamente em 2 mL de PBS estéril. Desta solução foi feita diluições específicas para cada órgão e cepa, e posteriormente semeadas em placas de Ágar-BHI. As placas foram mantidas a 30 °C por sete dias. As colônias fúngicas foram contadas e os valores de UFC foram utilizados para calcular a média de UFC por grama de órgão.

3.7 Dosagem de citocina

A determinação da concentração das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 foi avaliada por meio do teste de ELISA. Para este ensaio, o macerado de baço e fígado dos animais foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, o sedimento foi desprezado e o sobrenadante estocado a -20 °C até o momento do uso. O teste de ELISA foi realizado utilizando um kit comercial específico para cada citocina (R&D SYSTEMS). Todos os procedimentos seguiram-se de acordo com o fabricante.

3.8 Dosagem de IgG total

A dosagem de IgG total foi realizada por teste de ELISA, contra os exoantígenos das cepas de *Sporothrix sp.* na concentração de 4 μ g/mL, diluído em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,795g, NaHCO_3 em 500mL de H_2O destilada). As placas foram incubadas overnight em temperatura ambiente (TA). Após o tempo de incubação, foi realizado 3 lavagens com PBS-T (Solução salina de fosfato tamponada com adição de 0,05% Tween 20), seguido da adição de 200 μ L da solução de bloqueio (PBS + 5 % de leite + 2,5 % BSA). Incubou-se por 2 horas a 37 °C. Posteriormente foi desprezado a solução de bloqueio e, sem lavar as placas, adicionou-se foi adicionado o soro dos camundongos, e este foi diluído na proporção de 1:50, em PBS-leite (PBS + 5 % de leite). Foi incubado por 1 hora a TA. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e foi adicionado 50 μ L do anticorpo conjugado, previamente titulado, anti mouse IgG-peroxidase e diluído em solução bloqueio. Foi incubado a TA por 1 hora. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e foi adicionado 100 μ L/poço da solução revelação (1mg/mL de OPD em tampão citrato-fosfato – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3,68g, ácido cítrico 1,16g, H_2O 200mL, pH ajustado para 5,3). Incubou-se por 15 minutos no escuro, posteriormente reação foi parada com 50 μ L/poço de H_2SO_4 4N. A leitura foi realizada no leitor de ELISA com o filtro de 492nm. As DO (Densidades ópticas), obtidas das leituras dos soros, foram comparados nos diferentes tempos de infecção.

3.9 Western blot

O tratamento dos exoantígenos das cepas de *Sporothrix sp.* já foi anteriormente descrito (item 3.3). Após a corrida eletroforética, realizou-se a

transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (GE HEALTHCARE) no aparelho *ECL Semi-dry Blotters* (AMERSHAM BIOSCIENCES). A membrana foi corada por Ponceau S, confirmando a transferência das proteínas e auxiliando o corte das membranas em tiras de 0,5 cm, para o seguimento do *western blot*, através da visualização das bandas. Para o bloqueio dos sítios livres das membranas de nitrocelulose, estas foram cobertas com 5 mL de PBS-T com 5 % de leite por 2 horas, sob agitação leve, à temperatura ambiente. Depois foram lavadas 3 vezes com PBS-T por 10 minutos. As membranas cortadas em tiras foram colocadas em uma canaleta para reagir com o anticorpo primário (os soros dos camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.*, de camundongos não infectados e do AcMo P6E7). Os anticorpos primários foram incubados em 5 mL de PBS-T diluídos 1:200 overnight, sob agitação leve, à 4 °C. Após a reação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T por 10 minutos e depois da lavagem adicionou-se, o anticorpo secundário anti-Ig de camundongo ligado à peroxidase (BIORAD), diluídos a 1:5000 em PBS-T por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação leve. Depois da etapa adicionou-se, em cada canaleta, 100 µL por canaleta da solução de substrato *Novex ECL* (INVITROGEN) por um período de um minuto. Na sala escura, a membrana de nitrocelulose foi incubada por um período de 2 minutos com Amersham *Hyperfilm ECL* (GE HEALTHCARE), revelado, lavado e fixado para a visualização das bandas.

3.10 AcMo P6E7

Utilizou-se o AcMo P6E7 que foi gerado pela fusão das células de mieloma murino da linhagem SP 2/O com esplenócitos de camundongos com alta resposta policlonal (NASCIMENTO et al., 2008).

3.11 Tratamento profilático

Foi utilizado 4 grupos de 16 camundongos cada da linhagem BALB/c de 8 a 12 semanas de idade. Os camundongos foram infectados intraperitonealmente com as diferentes cepas de *Sporothrix sp.* Seguindo-se as mesmas condições de infecção já descritas anteriormente (item 3.4). Nos 3º e 10º dias após a infecção os camundongos, com o auxílio de uma seringa de 1 mL, cada animal

receberam intraperitonealmente 100 µg do AcMo P6E7 e nos 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção 4 camundongos de cada grupo foram sacrificados (**Figura 2**). O baço e o fígado destes animais foram retirados para avaliação da infecção pela contagem das colônias fúngicas conforme descrito anteriormente (item 3.6).

Figura 2. Esquema da imunização passiva dos camundongos com o AcMo P6E7 na esporotricose experimental. Camundongos BALB/c foram divididos em 4 grupos de 16 camundongos cada e foram infectados intraperitonealmente, com um inóculo de 100 µL com 5×10^6 de leveduras das cepas de *Sporothrix* sp.. Nos 3º e 10º dias após a infecção os camundongos, receberam intraperitonealmente 100 µg do anticorpo monoclonal P6E7. Nos 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção, quatro camundongos de cada grupo foram e o baço e o fígado destes animais foram retirados para avaliação da infecção pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

3.12 Análise estatística

A análise estatística aplicada aos resultados obtidos foram analisados pelo One-Way e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. Os resultados dos tratamentos com o AcMo P6E7 foram analisados Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, em todas as amostras analisadas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Perfil eletroforético dos exoantígenos das cepas de *Sporothrix sp.*

Para avaliar se as cepas de *Sporothrix sp.* apresentavam perfis proteicos diferentes no exoantígeno, foi realizado uma corrida eletroforética dos exoantígenos com um padrão de perfil proteico variando de 250 à 20 kDa (**Figura 3**).

A cepa *S. schenckii* 15383 apresentou alta expressão de proteínas entre 70 à 50 kDa e na altura de 40, 30 e 20 kDa. A cepa *S. schenckii* 1099-18 teve alta expressão de proteínas entre 150 à 100 kDa e na altura de 40 kDa. A cepa de *S. brasiliensis* 5110, possui uma banda majoritária entre 100 e 70 kDa. A cepa de *S. brasiliensis* 17943 apresenta uma grande variedade proteica no exoantígeno quando comparado com as outras cepas, contudo uma banda majoritária entre 100 e 70 kDa pode ser observada.

Figura 3. Perfil eletroforético dos exoantígenos das cepas de *Sporothrix sp.* Linha1: os exoantígenos das cepas de *Sporothrix sp.*; Linha 2: Padrão de peso molecular. Os géis de SDS-PAGE foram corados pela prata.

4.2 Detecção dos componentes antigênicos nos exoantígenos das cepas de *Sporothrix* sp.

Foi observado, através do soro obtido dos camundongos infectados no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção com as cepas de *Sporothrix* sp., os possíveis componentes antigênicos nos exoantígenos das cepas de *S. schenckii* 15383, *S. schenckii* 1099-18, *S. brasiliensis* 5110 e *S. brasiliensis* 17943 (**Figura 4**).

O soro controle como o soro do 7º dia de infecção, reconheceram uma banda na altura de 40 kDa e 25 kDa no exoantígeno da cepa de *S. schenckii* 15383, a partir do 14º dia de infecção é reconhecido uma banda entre 100 e 70 kDa e na altura de 100 kDa (**Figura 4 A**).

Uma banda entre 100 e 70 kDa é visualizada no exoantígeno da cepa de *S. schenckii* 1099-18 a partir do 14º até o 28º dia de infecção (**Figura 4 B**).

O exoantígeno da cepa de *S. brasiliensis* 5110, com o reconhecimento de uma banda entre 100 a 70 kDa no soro controle e nos camundongos infectados até o 7º dia. A partir do 14º dia de infecção, observa-se o reconhecimento de 2 bandas, uma com o peso próximo a 100 kDa e outra próxima 70 kDa (**Figura 4 C**).

O exoantígeno da cepa de *S. brasiliensis* 17943 revelou uma banda entre 100 e 70 kDa, e uma banda próximo de 35 kDa no 14º e 28º dia de infecção (**Figura 4 D**).

A *S. schenckii*
15383

B *S. schenckii*
1099-18

C *S. brasiliensis*
5110

D *S. Brasiliensis*
17943

Figura 4. Western blot com o “pool” do soro dos camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix* sp.. O soro foi recolhido dos camundongos BALB/c (n = 5 por grupo) no 7°, 14°, 21° e 28° dias após a infecção com 5×10^6 leveduras das cepas de *Sporothrix* sp.. O “pool” do soro controle (n = 5 por grupo) foi recolhido 28° dia após a inoculação de PBS estéril em camundongos BALB/c. Western blot foi realizado contra o exoantígeno das cepas de *Sporothrix* sp. sendo **A** *S. schenckii* 15383; **B** *S. schenckii* 1099-18, **C** *S. brasiliensis* 5110 e **D** *S. brasiliensis* 17943. Representativo de 3 experimentos independentes.

4.3 Dosagens das Imunoglobulinas totais anti-exoantígeno no soro dos camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.*

Para observar a participação da resposta humoral, o soro obtidos dos camundongos do grupo controle e dos grupos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.*, foram dosadas por ELISA (**Figura 5**). O perfil de produção de imunoglobulinas (IgG) nos camundongos infectados com as cepas 15383 e 1099-18 de *S. schenckii* e com a cepa de *S. brasiliensis* 5110 foram similares, com o aumento gradativo de imunoglobulinas, observa-se uma maior produção no 28º dia de infecção, já com a cepa de *S. brasiliensis* 17943 houve um pico de produção no 14º dia de infecção, que apesar de ter uma queda significativa no 28º dia de infecção, manteve uma alta produção, quando comparado com o controle e com 7º dia de infecção.

Figura 5. Os níveis de anticorpos totais anti-exoantígeno dos camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.* detectados por ELISA. O pool de soro foi recolhido dos camundongos BALB/c (n = 5 por grupo) no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a infecção com 5×10^6 leveduras das cepas de *Sporothrix sp.* O pool do soro controle (n = 5 por grupo) foi recolhido 28º dia após a inoculação de PBS estéril em camundongos BALB/c. O teste de ELISA foi realizado utilizando os soros contra seus respectivos exoantígenos. Representativo de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.4 Detecção de citocinas nos homogeonatos de baço e fígado

Foi dosado os níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 para observar o padrão da resposta imunológica induzida pelas cepas de *Sporothrix sp.* (**Figura 6, 7 e 8**).

Os camundongos infectados com as cepas 5110 e 17943 de *S. brasiliensis* tiveram produções similares das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10, não sendo observados altos níveis dessas citocinas em ambos os órgãos analisados, ficando próximos aos níveis basais.

No baço dos camundongos infectados com a cepa de *S. brasiliensis* 5110 os níveis de IFN- γ ficaram menores que o controle ou indetectáveis, já os níveis de IL-4 foram superiores ao nível basal no 7º e 21º dias de infecção, porém não foram significativos estatisticamente.

Os camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* 15383 produziram altos níveis de IFN- γ durante todo o período de infecção no fígado. No baço os níveis ficaram abaixo dos níveis basais, exceto no 28º dia de infecção, onde ficaram similares aos níveis dos camundongos controles. A produção de IL-4 no baço foi alta até o 14º dia de infecção, sendo que no 21º e no 28º dia a produção de IL-4 ficou próximo aos níveis basais. No fígado ocorreu uma alta produção de IL-4 no 7º dia de infecção. Os níveis de IL-10 no baço dos camundongos infectados com essa cepa foram similares ao do controle, exceto no 21º dia de infecção, onde houve um pico de produção. No fígado os níveis de IL-10 foram altos durante todo o período de infecção, principalmente no 7º e no 14º dias de infecção.

A cepa de *S. schenckii* 1099-18 induziu nos camundongos infectados uma alta produção de IFN- γ em ambos os órgãos. No baço os níveis de IFN- γ foram altos a partir do 14º dia de infecção, estando próximo aos níveis basais no 28º dia de infecção. No fígado os níveis de IFN- γ foram superiores aos níveis basais durante todo período de infecção. Os camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* 1099-18 foram os que demonstraram a maior produção de IL-4 no baço e principalmente no fígado, quando comparados aos camundongos infectados com as outras cepas de *Sporothrix sp.*. Os camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* 1099-18 apresentaram altos níveis de IL-10 durante todo período de infecção no fígado e níveis basais no baço.

Figura 6. Níveis de IFN- γ produzidos pelo baço e pelo fígado nos camundongos infectados pelas cepas de *Sporothrix* sp. As citocinas foram detectadas nos homogenatos do baço e fígado dos camundongos BALB/c ($n = 5$ por grupo) infectados com 5×10^6 leveduras das cepas de *Sporothrix* sp. por ELISA no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção. O grupo controle ($n = 5$ por grupo) recebeu PBS estéril, e foi sacrificado nos mesmos dias do que o grupo infecção. Representativo de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Figura 7. Níveis de IL-4 produzidos pelo baço e pelo fígado nos camundongos infectados pelas cepas de *Sporothrix* sp. As citocinas foram detectadas nos homogenatos do baço e fígado dos camundongos BALB/c ($n = 5$ por grupo) infectados com 5×10^6 leveduras das cepas de *Sporothrix* sp. por ELISA no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção. O grupo controle ($n = 5$ por grupo) recebeu PBS estéril, e foi sacrificado nos mesmos dias do que o grupo infecção. Representativo de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Figura 8. Níveis de IL-10 produzidos pelo baço e pelo fígado nos camundongos infectados pelas cepas de *Sporothrix* sp. As citocinas foram detectadas nos homogenatos do baço e fígado dos camundongos BALB/c ($n = 5$ por grupo) infectados com 5×10^6 leveduras das cepas de *Sporothrix* sp. por ELISA no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção. O grupo controle ($n = 5$ por grupo) recebeu PBS estéril, e foi sacrificado nos mesmos dias do que o grupo infecção. Representativo de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.5 Contagem do UFC nos órgãos dos camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.*

Foi avaliado a carga fúngica no baço e no fígado dos camundongos infectados para comparar a virulência das cepas de *Sporothrix sp.* (**Figura 9**).

A carga fúngica no baço dos camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* 15383 é superior a dos camundongos infectados com as outras cepas, diminuindo-se no 21º dia de infecção e permanecendo-se constante até o 28º dia. Os camundongos infectados com as cepas 5110 e 17943 de *S. brasiliensis* possuem cargas fúngicas similares e constantes durante o período de infecção, no 28º dia a carga fúngica dessas cepas são superiores aos camundongos infectados com as cepas 15383 e 1099-18 de *S. schenckii*. Os camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* 1099-18 tiveram a carga fúngica constante até 21º dia de infecção, porém foi observado no 28º dia uma diminuição da carga fúngica, sendo muito inferior do que os camundongos infectados com as outras cepas.

A carga fúngica no fígado dos camundongos infectados com a cepa *S. brasiliensis* 5110 é superior quando comparado com os camundongos infectados com as outras cepas do fungo, principalmente no 21º dia de infecção. A carga fúngica da cepa de *S. brasiliensis* 17943 é similar a das cepas de *S. schenckii*.

Todas as cepas indicam uma evolução crônica da doença.

Figura 9. Carga fúngica nos órgãos dos animais infectados com as cepas de *Sporothrix* sp. por grama de órgão. Os camundongos BALB/c (n = 5 por grupo) foram infectados com 5×10^6 leveduras das cepas de *Sporothrix* sp. e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram recuperadas do baço e fígado desses camundongos no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção. Os resultados apresentam as médias $\pm$ DP obtidos nos diversos tempos de infecção. Representativo de 1 de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi analisada pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.6 Percentual de sobrevivência dos camundongos infectados com as diferentes cepas *Sporothrix sp.*

Foi observado que alguns camundongos infectados com a cepa de *S. brasiliensis* 5110, apresentaram menor sobrevivência que os camundongos infectados com as outras cepas (Figura 10).

Figura 10. Curva de sobrevivência dos camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.* Camundongos BALB/c ($n = 20$ por grupo) infectados com 5×10^6 leveduras das cepas de *S. schenckii* 15383 e 1099-18 e de *S. brasiliensis* 5110 e 17943 que faleceram durante o experimento, devido a doença, foram marcados como mortes, e os camundongos eutanasiados, conforme o protocolo do experimento, foram marcados como censurados. Representativo de 3 experimentos independentes. Foi utilizado o teste de Mantel-cox. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.7 Presença da gp70 no exoantígeno das cepas de *Sporothrix sp.* utilizando o AcMo P6E7

Foi observado a presença da gp70 no exoantígeno das cepas de *Sporothrix sp.* através de *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal P6E7 (**Figura 11**).

Foi identificado a gp70 no exoantígeno da cepa de *S. brasiliensis* 5110, entre 100 e 70 kDa (**Figura 11 A**). A cepa de *S. schenckii* M-64 foi utilizada como controle positivo (**Figura 11 B**).

Figura 11. Western blot com o AcMo P6E7 contra os exoantígenos das cepas de *Sporothrix sp.* **A** O AcMo P6E7 foi colocado para reagir contra os exoantígenos das cepas *Sporothrix sp.*. **B** O AcMo P6E7 foi colocado para reagir contra o exoantígeno da cepa *S. schenckii* M-64, como controle positivo e o exoantígeno da cepa *S. brasiliensis* 5110, o único que reagiu com o AcMo P6E7. Representativo de 3 experimentos independentes.

4.8 Imunização de modo terapêutico com o AcMo P6E7 em camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.*

Foi realizado um tratamento com o AcMo P6E7 nos camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.*, para avaliar a eficácia desse anticorpo em cepas mais virulentas que a cepa de *S. schenckii* M-64 (**Figura 12, 13 e 14**).

Foi observada redução da carga fúngica no baço dos camundongos infectados por todas as cepas de *Sporothrix sp.*, principalmente nos momentos iniciais da infecção, ocorrendo recidivas no período final da infecção. No baço dos camundongos infectados pela cepa *S. schenckii* 1099-18, não foi possível detectar a presença de carga fúngica no 21º e 28º dias de infecção, após o tratamento com o AcMo P6E7.

No fígado, houve redução significativa da carga fúngica apenas em alguns momentos do período da infecção, porém a carga fúngica dos camundongos tratados permaneceu similar ao grupo sem tratamento na maioria do tempo.

Figura 12. A carga fúngica nos órgãos dos camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* 15383 após o tratamento com AcMo P6E7. As UFC foram recuperadas dos baços e fígados de dois grupos de camundongos BALB/c no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção. Dois grupos de camundongos BALB/c foram infectados com 5×10^6 leveduras da cepa *S. schenckii* 15383, sendo um grupo ($n = 5$ por grupo) não tratado e outro grupo ($n = 4$ por grupo) foram tratados com 100µg do anticorpo monoclonal P6E7 intraperitonealmente no 3º, 10º, 17º e 24º dias durante a infecção. Representativo de 2 experimento. Apresentam as médias $\pm$ DP obtidos nos diversos tempos de infecção. A análise estatística foi analisada pelo Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Figura 13. A carga fúngica nos órgãos dos camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* 1099-18 após o tratamento com AcMo P6E7. As UFC foram recuperadas dos baços e fígados de dois grupos de camundongos BALB/c no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção. Dois grupos de camundongos BALB/c foram infectados com 5×10^6 leveduras da cepa *S. schenckii* 1099-18, sendo um grupo ($n = 5$ por grupo) não tratado e outro grupo ($n = 4$ por grupo) foram tratados com $100 \mu\text{g}$ do anticorpo monoclonal P6E7 intraperitonealmente no 3º, 10º, 17º e 24º dias durante a infecção. Representativo de 1 experimento. Apresentam as médias $\pm$ DP obtidos nos diversos tempos de infecção. A análise estatística foi analisada pelo Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Figura 14. A carga fúngica nos órgãos dos camundongos infectados com a cepa de *S. brasiliensis* 5110 após o tratamento com AcMo P6E7. As UFC foram recuperadas dos baços e fígados de dois grupos de camundongos BALB/c no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção. Dois grupos de camundongos BALB/c foram infectados com 5×10^6 leveduras da cepa *S. brasiliensis* 5110, sendo um grupo (n = 5 por grupo) não tratado e outro grupo (n = 4 por grupo) foram tratados com 100µg do anticorpo monoclonal P6E7 intraperitonealmente no 3º, 10º, 17º e 24º dias durante a infecção. Representativo de 1 experimento. Apresentam as médias ± DP obtidos nos diversos tempos de infecção. A análise estatística foi analisada pelo Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Figura 15. A carga fúngica nos órgãos dos camundongos infectados com a cepa de *S. brasiliensis* 17943 após o tratamento com AcMo P6E7. As UFC foram recuperadas dos baços e fígados de dois grupos de camundongos BALB/c no 7º, 14º, 21º e 28º dias de infecção. Dois grupos de camundongos BALB/c foram infectados com 5×10^6 leveduras da cepa *S. brasiliensis* 17943, sendo um grupo ($n = 5$ por grupo) não tratado e outro grupo ($n = 4$ por grupo) foram tratados com $100 \mu\text{g}$ do anticorpo monoclonal P6E7 intraperitonealmente no 3º, 10º, 17º e 24º dias durante a infecção. Apresentam as médias $\pm$ DP obtidos nos diversos tempos de infecção. Representativo de 1 experimento. A análise estatística foi analisada pelo Two-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$, sendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Sporothrix sp. é o agente etiológico da esporotricose, uma doença que acomete tanto humanos quanto outros animais, apresentando diversas manifestações clínicas. Diferenças nas manifestações clínicas estão relacionadas com o estado imunológico do hospedeiro, fatores de virulência ou a diferentes genótipos do patógeno (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; CARLOS et al., 2009; HOGAN et al., 1996; MAIA et al., 2006).

O sistema imunológico do hospedeiro, como a resposta mediada por células e a resposta imune inata, são os principais mecanismos do hospedeiro contra a esporotricose. Nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância da resposta imune humoral no controle da doença (NASCIMENTO et al., 2005). Já foi demonstrado que algumas das cepas utilizadas nesse trabalho, apresentam virulência distinta na esporotricose experimental, porém por via intravenosa em camundongos C57BL/6 (TEIXEIRA et al., 2009). Foi relatado que camundongos BALB/c infectados com a cepa com baixa virulência de *S. schenckii* M-64 produziu uma resposta imune mista, e que o soro dos camundongos infectados reagiram apenas com uma glicoproteína de 70 kDa (gp70), identificada como importante fator de virulência (NASCIMENTO et al., 2005).

No presente estudo foi utilizado 2 cepas virulentas de *S. schenckii* (15383 e 1099-18) e *S. brasiliensis* (5110 e 17943). Essa nova espécie, *S. brasiliensis*, foi a mais prevalente nos casos do primeiro surto zoonótico da esporotricose que ocorreu no Rio de Janeiro (CASTRO, 2010; RODRIGUES, 2010).

Analisando o perfil de proteínas secretadas pelas cepas leveduriformes de *Sporothrix sp.* observamos que as cepas apresentam perfis diferentes, demonstrando produções e concentrações diferentes de proteínas, que podem influenciar na virulência nessas cepas de *Sporothrix sp.*. Através de *western blot*, foi observado que, ao decorrer da infecção, os soros dos camundongos infectados reagiram com componentes antigênicos de tamanho entre 100 à 50 kDa. Esses antígenos podem ser isoformas da gp70 ou conter sequências que o AcMo P6E7 não reconheça. A variação de tamanho pode ocorrer devido a possíveis glicosilações com a proteína (RUIZ-BACA et al., 2009). Foi

demonstrado a presença da gp70, utilizando-se o AcMo P6E7, na parede celular das cepas de *S. schenckii* 15383 e 1099-18 e da cepa de *S. brasiliensis* 17943. Porém, foi observada baixa presença na superfície celular das leveduras da cepa de *S. brasiliensis* 5110 (TEIXEIRA, 2011).

Em contrapartida, no presente estudo apenas no exoantígeno da cepa *S. brasiliensis* 5110 foi detectado a presença de uma banda na altura de 100 kDa, utilizando-se o AcMo P6E7.

Analizando a carga fúngica no baço e no fígado dos camundongos infectados com as cepas de *Sporothrix sp.* todas as cepas demonstram uma evolução crônica da doença em ambos os órgãos. Corroborando com esses resultados, foi observada uma carga fúngica similar no baço e no fígado de camundongos infectados com as duas cepas de *S. schenckii* 15383 e 1099-18 e a cepa de *S. brasiliensis* 17943, por infecção via intravenosa (TEIXEIRA et al., 2009). Diferentemente da cepa de *S. schenckii* M-64, que a partir do 14º dia de infecção ocorria uma redução significativa da carga fúngica que permanecia baixa até o 28º dia de infecção (NASCIMENTO et al., 2005). Desta forma as cepas do presente estudo são mais virulentas do que a cepa de *S. schenckii* M-64, anteriormente estudada pelo nosso grupo.

Apenas no baço dos camundongos infectados com a cepa de *S. schenckii* 1099-18, no 28º dia de infecção, a carga fúngica diminui significativamente demonstrando um possível controle da infecção nesse órgão, possivelmente por esta cepa ser a única que induziu uma alta resposta imunológica no baço, através da alta produção de IFN- γ e IL-4.

Diversos trabalhos demonstram que isolados de casos mais severos de esporotricose, como esporotricose disseminada e cutâneo-linfática, são mais virulentos que isolados ambientais e de casos mais superficiais da doença (TACHIBANA et al., 1998; BRITO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2009). Contudo, casos graves de esporotricose felina vem ocorrendo de forma crescente no Brasil nos últimos anos, e há poucos estudos sobre a possível virulência desses isolados. No presente estudo, a cepa isolada de um caso de esporotricose felina, a *S. brasiliensis* 5110, apresentou a maior carga fúngica nos camundongos, quando comparado com as outras cepas, no fígado, além de ser a única capaz de causar morte dos camundongos infectados. Esses

resultados demonstram que a cepa de *S. brasiliensis* 5110 é a mais virulenta, entre as cepas estudadas neste trabalho.

A resposta imune celular, mediada pelo linfócito T e por outras células como macrófagos, células dendríticas e células *natural killer*, é fundamental na defesa do hospedeiro contra o *Sporothrix sp.* uma vez que pacientes deficientes nesse tipo de resposta, como pacientes portadores de AIDS ou outras doenças hematológicas por exemplo, são grupos mais suscetíveis a esporotricose. Isso foi evidenciado em modelos murinos, utilizando camundongos *nude*, observando-se alta suscetibilidade frente a esporotricose (HACHISUKA et al., 1981).

No modelo de esporotricose experimental, podemos observar um padrão misto de resposta, com a produção de citocinas características dos dois tipos de resposta, Th1 e Th2, no baço e no fígado dos camundongos infectados pelas cepas 15383 e 1099-18 de *S. schenckii*. Uma resposta mista de citocinas demonstrou o controle da infecção pela cepa *S. schenckii* M-64 (NASCIMENTO et al., 2005). Contudo isso não foi observado nas cepas 15383 e 1099-18 de *S. schenckii*, demonstrando que a virulência é um importante fator na gravidade da doença, já que uma resposta imunológica similar a observada antes não foi suficiente para controlar a infecção.

Os camundongos infectados pela cepa *S. schenckii* 15383, induziram altos níveis de IFN- γ no fígado durante todo o período de infecção, já no baço apenas no 28º dia de infecção, os níveis dessa citocina foram superiores aos níveis basais. Os níveis de IL-4 foram decrescentes em ambos os órgãos, igualmente os níveis de IL-10 no fígado. No baço os níveis de IL-10 foram basais, com exceção no 21º dia de infecção. Apesar da produção mista de citocinas não foi possível observar a diminuição da carga fúngica no fígado e no baço. A cepa de *S. schenckii* 1099-18 induziu níveis elevados de IFN- γ , IL-4 e IL-10 em ambos os órgãos durante todo o período de infecção, com exceção dos níveis basais de IL-10 no baço. Os camundongos infectados com essa cepa foram os únicos altos níveis de citocinas durante os 28 dias de infecção, também foram os únicos que demonstraram uma queda da carga fúngica no baço.

As cepas 5110 e 17943 de *S. brasiliensis* não induziram níveis significantes das citocinas analisadas no e baço e no fígado. A não produção de citocinas

pelos camundongos infectados pela cepa de *S. brasiliensis* 5110, pode ser um dos motivos da suscetibilidade dos camundongos pela infecção. Porém os camundongos infectados pela cepa de *S. brasiliensis* 17943, também não tiveram níveis altos de citocinas e não morreram pela doença durante o experimento. Provavelmente a virulência intrínseca da cepa *S. brasiliensis* 5110 seja muito maior do que da cepa de *S. brasiliensis* 17943, que foi isolado de um caso de meningite por esporotricose.

Os camundongos infectados por todas as cepas apresentavam lesões típicas de esporotricose, principalmente na cauda, no local da inoculação do fungo e nas patas traseiras (dados não mostrados). Sabe-se que o *Sporothrix* sp. possuiu alta adesão a fibronectina e laminina, que estão bastante presentes nas patas e na cauda dos camundongos (TEIXEIRA et al., 2009).

Foi relatada a participação da resposta imune humoral apenas em estágios mais avançados da doença (CARLOS et al., 2009; MAIA et al., 2006). Estudos recentes demonstraram que anticorpos específicos induzem uma proteção contra infecções fúngicas (CASADEVALL et al., 2005). Nosso grupo demonstrou que o tratamento com o AcMo P6E7 após, antes e durante a infecção, induz a diminuição da carga fúngica no baço e no fígado dos camundongos infectados com a cepa *S. schenckii* M-64, essa proteção ocorreu também em camundongos *nude*, que são mais suscetíveis a doença, em ambos tratamentos foi possível observar o aumento de IFN- γ no baço e no fígado (NASCIMENTO et al., 2008). Citocinas características de uma resposta Th1, são consideradas protetoras em várias infecções fúngicas, como a esporotricose.

Foi observado um aumento na produção de imunoglobulinas específicas contra o exoantígeno das cepas do fungo a partir do 14º dia de infecção, o aumento é crescente observando-se uma maior produção no 28º dia, dados similares foram relatados por Nascimento e colaboradores em 2008. Isso demonstra a indução da resposta imune humoral na esporotricose por todas as cepas virulentas estudadas.

Foi observado que o AcMo P6E7 foi capaz de reduzir a carga fúngica em camundongos infectados com as cepas 15383 e 1099-18 de *S. schenckii* e as cepas 5110 e 17943 de *S. brasiliensis* que são mais virulentas que a cepa *S. schenckii* M-64. Apesar da cepa *S. brasiliensis* 5110 apresentar baixa presença

da gp70 na superfície celular, o AcMo P6E7 diminuiu a carga fúngica nos órgãos dos camundongos no 14º dia de infecção. O AcMo P6E7 é capaz de opsonizar o fungo, tornando a levedura alvo dos fagócitos e do sistema complemento.

Na carga fúngica do baço foi possível observar um melhor prognóstico da doença, principalmente nos camundongos infectados pela cepa *S. schenckii* 1099-18, onde não foi possível observar colônias fúngicas no 21º e 28º dias de infecção, indicando um possível controle da infecção.

O fato dos camundongos infectados apresentarem um controle melhor da infecção, após o tratamento com o AcMo P6E7, não está muito bem esclarecido, pode ser pela formação de granulomas no baço e não no fígado, contendo a disseminação do fungo, e pelas diferentes composições celulares dos órgãos, porém devem ser realizados mais estudos sobre esses aspectos.

Contudo, no fígado houve queda significativa, apenas em alguns momentos da infecção, no 14º e no 21º por exemplo, nos fígados infectados pelas cepas *S. brasiliensis* 17943 e *S. schenckii* 15383, respectivamente. Também foi observada uma queda significativa no fígado dos camundongos infectados pela cepa *S. brasiliensis* 5110, após o tratamento com o AcMo P6E7, no 14º dia de infecção.

As diminuições das cargas fúngicas ocorreram posteriores a segunda dose do AcMo P6E7, um possível tratamento com uma dose maior ou com mais doses do AcMo P6E7 pode promover um melhor controle da infecção. Diferentemente do tratamento observado com *S. schenckii* M-64, onde não foi mais possível visualizar colônias fúngicas a partir do 14º dia de infecção com apenas uma dose de 100 µg do AcMo P6E7 no 3º dia (NASCIMENTO et al., 2008).

Os dados apresentados nesse estudo demonstram que o AcMo P6E7 é eficaz no tratamento da esporotricose experimental causada por cepas mais virulentas que a cepa *S. schenckii* M-64. Porém, foi visto apenas uma redução da carga fúngica no baço e no fígado dos camundongos infectados, e não a cura ou um melhor prognóstico da doença, já que ocorreram recidivas. Um tratamento com antifúngicos, juntamente com o AcMo P6E7 pode promover uma eliminação mais rápida e eficaz do fungo, eliminando possíveis recidivas, já que além do combate direto contra o fungo, pelos antifúngicos, o sistema

imunológico do hospedeiro estaria auxiliando, através da opsonização do fungo. No entanto, são necessários maiores estudos sobre a eficácia de tratamentos acoplados com o AcMo P6E7, o papel da gp70 na modulação da resposta imune do hospedeiro assim como os principais *PRR*'s envolvidos no reconhecimento do *S. brasiliensis* e do *S. schenckii*, já que estes induzem respostas imunes diferentes.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- As cepas analisadas apresentam perfis proteicos diferentes nos exoantígenos;
- O soro dos camundongos infectados reagem sempre com um componente antigênico entre 50 e 100 kDa do exoantígeno, porém o AcMo P6E7 apenas reagiu contra o exoantígeno da cepa de *S. brasiliensis* 5110;
- Todas as cepas induzem uma evolução crônica da doença no baço e no fígado dos camundongos infectados;
- As 2 cepas de *S. schenckii* induziram uma produção de padrão misto de citocinas com altos níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10, diferentemente das cepas de *S. brasiliensis* que não induziram níveis significantes de nenhuma das citocinas analisadas;
- As 4 cepas induzem uma forte produção de imunoglobulinas, demonstrando que a resposta humoral tem um papel importante na esporotricose;
- A cepa de *S. brasiliensis* 5110, o único isolado de esporotricose felina, foi o único que causou morte ao longo do experimento;
- O AcMo P6E7 foi capaz de diminuir a carga fúngica, em alguns momentos durante a infecção, demonstrando que o AcMo P6E7 é eficaz contra cepas mais virulentas que a cepa *S. schenckii* M-64;

7. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA S. R. **Micologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 6: 64-67, 2008.

ALMEIDA, S. R. Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis. **Front Microbiol.** 3: 409, 2012.

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; FIALHO MONTEIRO, P.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes Infect.** 11: 554–562, 2009.

ALMEIDA-PAES, R.; PIMENTA, M. A.; MONTEIRO, P. C. F.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. **Clin. Vaccine Immunol.** 14: 1149–1157, 2007.

ALVES, S. H.; BOETTCHER, C. S.; OLIVEIRA, D. C.; TRONCO-ALVES, G. R.; SGARIA, M. A.; THADEU, P.; OLIVEIRA, L. T.; SANTURIO, J. M. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 43: 523–525, 2010.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clin Microbiol Infect.** 15 (7): 651-5, 2009.

BARROS, M. B. L.; ALMEIDA-PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**. 24(4): 633-654, 2011

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; WANKE, B.; LAMBERT-PASSOS, S. R. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiol. Infect.** 136: 1192–1196, 2008.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A.; VALLE, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin Infect Dis**. 38: 529–535, 2004.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. M. P.; GALHARDO, M. C. G.; SCHUBACH, A. O.; MONTEIRO, P. C. F.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; LAZÉRA, M. S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T. C. M.; MARZOCHI, K. B. F.; WANKE, B.; VALLE, A. C. F. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 96: 777-779, 2001.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Rev Panam Salud Publica**. 27 (6): 455-460, 2010.

BONIFAZ A.; SAÚL A.; PAREDES-SOLIS V.; FIERRO L.; ROSALES A.; PALACIOS C.; ARAIZA J. Sporotrichosis in childhood: clinical and therapeutic experience in 25 patients. **Pediatr. Dermatol**. 24 (4): 369–372, 2007.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. Sporotrichosis: an update. **G Ital Dermatol Venereol**. 145: 659-673, 2010.

BRITO M. M. S.; CONCEIÇÃO-SILVA F.; MORGADO F. N.; RAIBOLT P. S.; SCHUBACH A.; SCHUBACH T. B.; SCHAFFER G. M.; BORBA C. M. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Med. Micol.** 45 (8): 721-729, 2007.

BUISSA-FILHO, R.; PUCCIA, R.; MARQUES, A. F.; PINTO, F. A.; MUÑOZ, J. E.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect Immun.** 76 (7): 3321-3328, 2008.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Endemic sporotrichosis. **Curr Opin Infect Dis.** 14 (2):145-149, 2001.

BUZÁS, E. I.; GYÖRGY, B.; PÁSZTÓI, M.; JELINEK, I.; FALUS, A.; GABIUS, H. J. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. **Autoimmunity.** 39 (8): 691-704, 2006.

CARLOS, I. Z.; SASSA, M. F.; DA GRACA SGARBI, D. B.; PLACERES, M. B.; MAIA, D. C. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia.** 168 (1): 1–10, 2009.

CARLOS, I. Z.; SGARBI, D. B.; SANTOS, G. C.; PLACERES, M. C. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. **Scand. J. Immunol.** 57 (3): 214–220, 2003.

CARLOS, I. Z.; ZINI, M. M.; SGARBI, D. B.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S.; SILVA, C. L. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. **Mycopathologia.** 127: 189–194, 1994.

CARMICHAEL, J. W. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic hyphomycetes. **Canad. J. Bot.** 40: 1137-1181, 1962.

CARVALHO, M. T. M.; CASTRO, A. P.; BABY, C.; WERNER, B.; NETO, J. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. **Soc. Bras. Med. Trop.** 35: 655–659, 2002.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Insights into mechanisms of antibody-mediated immunity from studies with *Cryptococcus neoformans*. **Curr. Mol. Med.** 5 (4): 421–433, 2005.

CASTRO, RAFAELA ALVES, Correlação entre o perfil fenotípico, genotípico e a virulência de isolados geofílicos, antropofílicos e zoofílicos de *Sporothrix schenckii*. **Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro**. 99f, 2010.

CENTER DISEASE CONTROL. Multistate outbreak of sporotrichosis in seedling handlers. **Morb. Mortal. Wkly Rep.** 37: 652-653, 1988.

CHAVES, A. R.; DE CAMPOS, M. P.; BARROS, M. B.; DO CARMO, C. N.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. Treatment abandonment in feline sporotrichosis – Study of 147 cases. **Zoonoses Public Health.** 60 (2): 149-53, 2013.

CONIAS, S.; WILSON, P. Epidemic cutaneous sporotrichosis: report of 16 cases in Queensland due to mouldy hay. **Australas J Dermatol.** 39 (1): 34-37, 1998.

CONTI-DIAZ, I. A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia.** 108:113–116, 1989.

COOPER, C. R.; DIXON, D. M.; SALKIN, I. F. Laboratory-acquired sporotrichosis. **J. Med. Vet. Mycol.** 30 (2): 169–171, 1992.

CUNNINGHAM, K. M.; BULMER, G. S.; RHOADES, E. R. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. **J Infect Dis.** 140 (5): 815-817, 1979.

DICKERSON, C. L.; TAYLOR, R. L.; DRUTZ, D. J. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. **Infect Immun.** 40 (1): 417-420, 1983.

DIXON, D. M.; DUNCAN R. A.; HURD N. J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp.* from the largest US epidemic of sporotrichosis. **J Clin Microbiol.** 30 (4): 951-954, 1992.

DIXON, D.; SALKIN, I. F.; DUNCAN, R. A.; HURD, N. J.; HAINES, J. H.; KEMNA M. E.; COLES, F. B. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **J Clin Microbiol.** 29: 1106-1113, 1991.

FEENEY, K. T.; ARTHUR, I. H.; WHITTLE, A. J.; ALTMAN, S. A.; SPEERS, D. J.; Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. **Emerg Infect Dis.** 13 (8): 1228-1231, 2007.

FERNANDES, G. F.; SANTOS, P. O.; AMARAL, C. C.; SAZAKI, A. A.; GODOY-MARTINEZ, P.; CAMARGO, Z. P. Characteristics of 151 brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geografic regions of Brazil: A forgotten an re-emergent pathogen. **Open Mycol J.** 3: 48-58, 2009.

FERNANDES, K. S. S.; COELHO, A. L. J.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. **Immunology.** 101 (4): 563-569, 2000.

FIGUEREDO, C. C.; DECCACHE, P. M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. TGF- α 1 Induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. **Microbiology**. 153 (9): 2910-21, 2007.

FLEURY, R. N.; TABORDA, P. R.; GUPTA, A. K.; FUJITA, M. S.; ROSA, P. S.; WECKWERTH, A. C.; NEGRÃO, M. S.; BASTAZINI, I. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. **Int. J.Dermatol**. 40 (5): 318–322, 2001.

FRANCO, D. L.; NASCIMENTO, R. C.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Antibodies against *Sporothrix schenckii* enhance TNF- α production and killing by macrophages. **Scand.J.Immunol**. 75: 142–146, 2012.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clin Microbiol. Rev**. 12: 454-500, 1999.

HACHISUKA, H.; SASAI, Y. Development of experimental sporotrichosis in normal and modified animals. **Mycopathologia** 76 (2): 79–82, 1981.

HAMPTON, D. E.; ADESINA, A.; CHODOSH, J. Conjunctival sporotrichosis in the absence of antecedent trauma. **Cornea**. 21 (8): 831-3, 2002.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. **J. Exp. Med**. 5 (1): 77–91, 1900.

HELM, M.; BERMAN, C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of sporotrichosis infection of the mines. **Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association Sporotrichosis Infection on Mines of the Witwatersrand Johannesburg: The Transvaal Chamber of Mines**. 59-67, 1947.

HIRANO, M.; WATANABE, K.; MURAKAMI, M.; KANO, R.; YANAI, T.; YAMAZOE, K.; FUKATA, T.; KUDO, T. A case of feline sporotrichosis. **J. Vet. Med. Sci.** 68 (3): 283–284, 2006.

HOGAN, L. H.; KLEIN, S. M.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev.** 9: 469-488, 1996.

HOWARD, D. H. Dimorphism of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Bacteriology.** 81 (3): 464-469, 1961.

ITOH, M.; OKAMOTO, S.; KARIYA, H. Survey of 200 cases of sporotrichosis. **Dermatologica.** 172 (4): 209-13, 1986.

KAJIWARA, H.; SAITO, M.; OHGA, S.; UENOTSUCHI, T.; YOSHIDA, S. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infect. Immun.** 72: 5073–5079, 2004.

KAUFFMAN, C. A. Sporotrichosis. **Clin Infect Dis.** 29: 231-236, 1999.

KENYON, E. M.; RUSSELL, L. H.; MCMURRAY, D. N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from potting soil. **Mycopathologia.** 87: 128, 1984.

KOGA, T.; DUAN, H.; FURUE, M. Immunohistochemical detection of interferon-g cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Med Mycol.** 40 (2): 111 – 114, 2002.

KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H.D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clin Microbiol Infect.** 12: 1077-1081, 2006.

KWON-CHUNG, K.; BENNETT, J. Sporotrichosis. **Med Mycol.** 707–729, 1992.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Guia para identificação: fungos, actinomicetes, algas de interesse médico. **Sarvier**. 53-344, 1998.

LANE, J. W.; GRRISON, R. G.; FIELD, M. F. Ultrastructural studies on the yeastlike and mycelial phases of *Sporotrichum schenckii*. **J Bacteriol**. 100: 1010-1019, 1969.

LIMA, O. C.; BOUCHARA, J. P.; RENIER, G.; MAROT-LEBLOND, A.; CHABASSE, D.; LOPES-BEZERRA, L. M. Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. **Microb. Pathog**. 37 (3):131–140, 2004.

LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C.; PEREIRA, B. A.; COELHO, M. G.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 32 (5): 651–657, 1999.

LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; MORANDI, V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. **Infect. Immun**. 69: 6874–6880, 2001.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. 78: 293-308, 2006.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Med. São Paulo**. 21: 433-450, 1907.

MADRID, H.; CANO, J.; GENÉ, J.; BONIFAZ, A.; TORIELLO, C.; GUARRO, J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Iberoam. Micol**. 26 (3): 218–222, 2009.

MAIA, D. C.; SASSA, M. F.; PLACERES, M. C.; CARLOS, I. Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**. 161 (1): 11–19, 2006.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; GUARRO, J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Med. Mycol.** 46 (6): 621–625, 2008.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J. Clin. Microbiol.** 45 (10): 3198–3206, 2007.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; DOS SANTOS LAZERA, M.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol.** 44: 3251–3256, 2006.

MEHTA, K. I.; SHARMA, N. L.; KANGA, A. K.; MAHAJAN, V. K.; RANJAN, N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: results of a pilot study. **Mycoses**. 50 (6): 496–501, 2007.

MENDONÇA, L.; GORIN, P. A. J.; LLOTD, K. O.; TRAVASSOS, L. R. Polymorphism of *Sporothrix schenckii* surface polysaccharides as a function of morphological differentiation. **Biochemistry**. 15 (11): 2423–2431, 1976.

MESA-ARANGO, A. C.; REYES-MONTES, M. R.; PÉREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚÑIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **J Clin Microbiol.** 40 (8): 3004–3011, 2002.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B. L.; AISEN, P.; HAY R. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL A, HAMILTON AJ. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infect. Immun.** 71: 4026–4033, 2003.

NASCIMENTO, ROSANA CÍCERA, Caracterização da glicoproteína de 70 kDa de *Sporothrix schenckii* e sua participação na regulação da resposta imune na esporotricose experimental. **Dissertação (Doutorado em Análises clínicas) – Universidade de São Paulo.** 152f, 2008.

NASCIMENTO, R. C.; ALMEIDA, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 43 (2): 241–247, 2005.

NASCIMENTO, R. C.; ESPÍNDOLA, N. M.; CASTRO, R. A.; TEIXEIRA, P. A.; LOUREIRO Y PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ALMEIDA, S. R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. **Eur. J. Immunol.** 38 (11): 3080–3089, 2008.

OLIVEIRA, M. M.; ALMEIDA-PAES, R.; MEDEIROS, M. M.; LIMA, M. B. B.; GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathologia.** 169 (5): 359–363, 2010.

PAPPAS, P. G.; TELLEZ, I.; DEEP, A. E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clin. Infect. Dis.** 30 (1): 65–70, 2000.

PLOUFFE, J. F. JR.; SILVA, J. JR.; FEKETY, R.; REINHALTER, E.; BROWNE, R. Cell-mediated immune responses in sporotrichosis. **J Infect Dis.** 139 (2): 152-7, 1979.

POTTS, J. R.; CAMPBELL, I. D. Structure and function of fibronectin modules. **Matrix Biol.** 15: 313-320, 1996.

QUINTAL, D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. **J Cutan Med Surg.** 4 (1): 51-54, 2000.

RAMOS-E-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology.** 25 (2): 181- 187, 2007.

REIS, R. S.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; TAVARES, P. M.; MONTEIRO, P. C.; SCHUBACH, T. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Molecular characterization of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 104: 769-774, 2009.

REX, J. H.; BENNETT, J. E. Administration of potassium iodide to normal volunteers does not increase killing of *Sporothrix schenckii* by their neutrophils or monocytes. **J Med Vet Mycol.** 28 (3):185-189, 1990.

RIPPON, J. W. Sporotrichosis. **Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.** 11: 325-352, 1988.

RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl Trop Dis.** 20;7 (6): 2281, 2013.

RODRIGUES, ANDERSON MESSIAS. Taxonomia polifásica e características proteômicas do complexo *Sporothrix schenckii*. **Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo.** 241f, 2010.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and function of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infect Immunology**. 68 (6): 3696–3703, 2000.

RUIZ-BACA, E.; TORIELLO, C.; PEREZ-TORRES, A.; SABANERO-LOPEZ, M.; VILLAGOMEZ-CASTRO, J. C.; LOPEZ-ROMERO, E. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Med. Mycol.** 47 (2): 185–196, 2009.

RUIZ-BACA, E.; MORA-MONTES, H. M.; LÓPEZ-ROMERO, E.; TORIELLO, C.; MOJICA-MARÍN, V.; URTIZ-ESTRADA, N. 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 106 (2): 248-50, 2011.

SASSA, M. F.; FERREIRA, L. S.; RIBEIRO, L. C.; CARLOS, I. Z. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4- deficient mice. **Mycopathologia**. 174 (1): 21–30, 2012.

SCHECHTMAN, R. C. Sporotrichosis: Part I. **SKINmed**. 8 (4): 216-220, 2010.

SCHECHTMAN, R. C. Sporotrichosis: Part II. **SKINmed**. 8 (5): 275- 280, 2010.

SHELL, W. A.; SALKIN, I. F.; PASARELL, L.; MCGINNIS, M. R. *Bipolaris*, *Exophiala*, *Scedosporium*, *Sporothrix* and other dematiaceous fungi. **Manual of clinical microbiology**. 1295–1317, 1999.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. **Bull. Johns Hopkins Hosp**. 9: 286–290, 1898.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Curr Opin Infect Dis.** 21 (2): 129-133, 2008.

SCHUBACH, A.; LIMA BARROS, M. B.; SCHUBACH, T. M.; VALLE, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; SUED, M.; SALGUEIRO, M. M.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; MARZOCHI, K. B.; WANKE, B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cornea.** 24 (4): 491–493, 2005.

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B. L.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; PEREZ, M. A.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **J Am Vet Med Assoc.** 224: 1623–1629, 2004.

SCHUBACH, T. M.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DOS REIS, R. S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T. C.; MONTEIRO, D. F.; BARROS, B. M.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; FIALHO MONTEIRO, P. C.; WANKE, B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia.** 153: 83–86, 2002.

SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A. O.; CUZZI-MAYA, T.; OKAMOTO, T.; REIS, R. S.; MONTEIRO, P. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; WANKE, B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Vet Rec.** 152 (6): 172-175, 2003.

SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; PEREIRA, S. A.; DOS SANTOS, I. B.; ALMEIDA-PAES, R.; PAES-LEME, L. R.; WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Med Mycol.** 44 (1): 87–92, 2006.

SCHUBACH, T. M.; VALLE, A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MARZOCHI, K. B.; SCHUBACH, A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Med Mycol.** 39 (1): 147-149, 2001.

SCOTT, E. N.; MUCHMORE, H. G. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol.** 27: 300-304, 1989.

SGARBI, D. B.; DA SILVA, A. J.; CARLOS, I. Z.; SILVA, C. L.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia.** 139 (1): 9–14, 1997.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; Micologia médica à luz de autores contemporâneos. **Rio de janeiro: Guanabara Koogan.** 17: 177-188, 2010.

SONG, Y.; ZHONG, S. X.; YAO, L.; CAI, Q.; ZHOU, J. F.; HUO, S. S. Efficacy and safety of itraconazole pulses vs. continuous regimen in cutaneous sporotrichosis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.** 25: 302–305, 2011.

STALKUP, J. R.; BELL, K.; ROSEN, T. Disseminated cutaneous sporotrichosis treated with itraconazole. **Cutis.** 69 (5): 371–374, 2002.

TABOADA, J. Systemic mycoses. In: **ETTINGER, S.; FELDMAN, E. (ed.), Textbook of veterinary internal medicine—diseases of the dog and cat.** 453–476, 2000.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Med. Mycol.** 37 (6): 397-404, 1999.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. **Med Mycol.** 36 (1): 21-7, 1998.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Med Mycol.** 39 (3): 295-298, 2001.

TEIXEIRA, P. A.; CASTRO, R. A.; FERREIRA, F. R.; CUNHA, M. M.; TORRES, A. P.; PENHA, C. V.; ROZENTAL, S.; LOPES-BEZERRA, L. M. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Medical Mycology.** 48 (5): 687-695, 2010.

TEIXEIRA, P. A.; DE CASTRO, R. A.; NASCIMENTO, R. C.; TRONCHIN, G.; TORRES, A. P.; LAZÉRA, M.; ALMEIDA, S. R.; BOUCHARA, J. P.; LOUREIRO Y PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Cell surface of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. **Microbiology.** 155 (11): 3730-3738, 2009.

TEIXEIRA, PEDRO ANTÔNIO CASTELO, Estudo da virulência, adesão e características fenotípicas de isolados do complexo *Sporothrix*. **Dissertação (Doutorado em Biociências) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.** 122f, 2011.

THOMPSON, D. W.; KAPLAN, W. Laboratory acquired sporotrichosis. **Sabouraudia.** 15: 167–170, 1977.

TOLEDO, M. S.; TAGLIARI, L.; SUZUKI, E.; SILVA, C. M.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Effect of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in pathogenic fungal growth and differentiation. Characterization of monoclonal antibody MEST-3 directed to Man α 1 $\rightarrow$ an α 1 $\rightarrow$ 2IPC. **BMC Microbiol.** 10:47: 1471-2180, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRAVASSOS, L. R. Antigenic structures of *Sporothrix schenckii*. In: **KURSTAK, E. Immunology of fungal disease**. New York: Dekker. 193-221, 1989.

TSUBOI, R.; SANADA, T.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. **J Bacteriol**. 4104-4109, 1987.

UENOTSUCHI, T.; TAKEUCHI, S.; MATSUDA, T.; URABE, K.; KOGA, T.; UCHI, H.; NAKAHARA, T.; FUKAGAWA, S.; KAWASAKI, M.; KAJIWARA, H.; YOSHIDA, S.; MOROI, Y.; FURUE, M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. **Int Immunology**. 18 (12): 1637-1646, 2006.

VIEIRA-DIAS, D.; SENA, C. M.; ORÉFICE, F.; TANURE, M. A.; HAMDAN, J. S. Ocular and concomitant cutaneous sporotrichosis. **Mycoses**. 40 (5/6): 197-201, 2007.

VILELA, R.; SOUZA, G. F.; FERANDES-COTA, G.; MENDOZA, L. Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient. **Iberoam. Mocol**. 24 (2): 161-163, 2007.

VISMER, H. F.; HULL, P. R. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. **Mycopathologia**. 137 (3): 137-143, 1997.

WHITEMORE, J. C.; WEBB, C. B. Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. **Can Vet J**. 48 (4): 411-414, 2007.

WÜTHRICH, M.; DEEPE, G. S. JR.; KLEIN, B. Adaptive immunity to fungi. **Annu Rev Immunol.** 30: 115-148, 2012.

XANDER, P.; VIGNA, A. F.; FEITOSA, L. S.; PUGLIESE, L.; BAILÃO, A. M.; SOARES C. M. A.; MORTARA, R. A.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. A. Surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. **Microbes Infect.** (12-13): 1484-1492, 2007.

ZHANG, H. B.; JIA, C. K.; XI, H. J.; LI, S. Y.; YANG, L. L.; WANG, Y. Specific inhibition of *Candida albicans* growth *in vitro* by antibodies from experimental *Candida keratitis* mice. **Exp.EyeRes.** 93: 50–58, 2011.

ZHANG, Z.; HOU, B.; XIN, Y.; LIU, X. Protein profiling of the dimorphic pathogenic fungus, *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia.** 173 (1): 1-11, 2011.

ZHANG, Z.; LIU, X.; YANG, G.; GAO, X.; JIN, L.; AN, L. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. **Mycoses.** 49: 305-310, 2006.

Ofício CEUA/FCF/93/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Comparação da virulência e da resposta imune de diferentes espécies de *Sporothrix* spp. em modelos animais" (Protocolo CEUA/FCF/319), de responsabilidade do pesquisador **José Roberto Fogaga de Almeida**, sob a orientação do Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 6 de junho de 2011.

São Paulo, 11 de outubro de 2011.

Marco Antonio Stephano
Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP