

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS  
INFECCIOSAS

LUÃ CARDOSO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO  
FENOTÍPICA DA ENZIMA UREASE DE *Sporothrix  
brasilensis***

Rio de Janeiro

2016

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO  
FENOTÍPICA DA ENZIMA UREASE DE *SPOROTHRIX*  
*BRASILIENSIS***

**LUÃ CARDOSO DE OLIVEIRA**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação Strictu-Sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em ciências

Orientadores: Dra Rosely Maria Zancopé Oliveira e Dr Rodrigo de Almeida Paes

Rio de Janeiro

2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O48 Oliveira, Luã Cardoso de

Caracterização molecular e expressão fenotípica da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis* / Luã Cardoso de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2016.

xviii, 75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2016.

Bibliografia: f. 79-90

1. *Sporothrix brasiliensis*. 2. Urease. 3. Virulência. 4. Sequenciamento. 5. Modelagem molecular. I. Título.

CDD 579.5

Dedico este trabalho a minha avózinha, Dona Léa Andrade de Oliveira *In memoriam*,  
sem ela nada disso seria possível, pela criação, por todo amor devotado, por ter  
acreditado em mim e pago parte da minha graduação, e por todo carinho que um neto  
poderia querer, onde estiver saiba que te amo muito. Muito  
Obrigado vózinha

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares, Jorge Luiz, Maria Amélia, Mariana Cardoso, Polly, Mauro Andrade, Anderson Cardoso e Camila Cardoso que durante toda a minha criação me deram apoio e amor incondicional e fundamental para continuar nessa estrada, Meu Muito Obrigado!

À minha noiva Gabriela Lopes Vitória, por todo o amor, carinho e companhia, fatores cruciais para o término desse trabalho, às vezes algumas pessoas entram na nossa vida vestidas de anjo, e está sempre do nosso lado, independente do que aconteça, para dar suporte emocional, profissional, amoroso, financeiro. Muito Obrigado por ser o anjo na minha vida que eu não pedi, mas tanto precisava.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosely Maria Zancopé Oliveira e ao Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes, pela orientação a mim dedicada, pelo apoio incondicional ao meu trabalho, pelo reconhecimento de minhas capacidades e pela oportunidade de realizar uma dissertação de Mestrado quando menos achei que fosse conseguir. Sinto uma gratidão enorme aos dois. Muito Obrigado

A Dra. Juliana Alves Parente Rocha e Dra. Célia Maria de Almeida Soares, e todos os integrantes de seu laboratório, pelo acolhimento, apoio científico e financeiro durante minhas estadas na Universidade Federal de Goiás e pela importantíssima ajuda na interpretação de dados e delineamento de experimentos.

A amiga Lilian Baeza por ter me hospedado em sua casa e compartilhado seu conhecimento comigo acerca de aspectos da minha dissertação

Aos amigos Dr. Carlos Roberto Alves e Dr. Franklin Souza da Silva do Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Endêmicas do IOC/Fiocruz, sem sua entrada neste trabalho não seria possível obter este resultado final.

Aos preciosos amigos adquiridos durante o Curso de Mestrado, Ananda Dutra, Alessandra Leal, Carlos Sobrinho, Mayara Cardoso e Carol Trigo, obrigado por tudo, me sinto honrado em apenas tê-los conhecido, sem vocês esse curso não teria sido o mesmo.

Ao Dr. Otávio de Melo Espíndola e todo o laboratório de Virologia do INI, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo de tantos anos de convívio, pelo incentivo e suporte para que eu continuasse na área, por acreditar no meu potencial na área de pesquisa e pela confiança que sempre depositou na minha pessoa e no meu trabalho. Tenham sempre em mente que eu serei para sempre grato por tudo, Muito Obrigado.

Aos amigos adquiridos durante o curso de Ciências Biológicas da Fundação Técnico Educacional Souza Marques. Saibam que nossa amizade durará para sempre, especialmente Priscila Moniz, Raphael Rodrigues, Victor Tatagiba, Gabriela Castro, Marcela Oliveira, Bruno Dias e Beth Araújo.

Aos amigos do Serviço de Micologia, setor de Diagnóstico Micológico: Maria Helena, Fábio Britto, Rowena Alves, Ingrid Ludmila Rodrigues, Raissa Vieira, Jean Oliveira, Rebeca Almeida, Daniele Albernaz, Evelyn Campos, Daiane Vieira e Amile Alves, pelas sempre agradáveis horas de café e almoço, pelo suporte indispensável com algumas atividades do projeto, desde preparo de meios de cultura a identificações.

Ao Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira, por toda a ajuda com o desenho de *primers* para isolamento parcial da sequência de urease de *Sporothrix* e análise de resultados.

À amiga Priscila Marques de Macedo pelas agradabilíssimas horas de convivência e a disposição em ajudar no que fosse, sempre que pudesse, nem que fosse um sorriso e um abraço que já muda o dia completamente, ou às vezes um chocolate, ou um chope no Outback. Muito Obrigado.

Aos sempre amigos e companheiros de laboratório, Mauro de Medeiros Muniz, Claudia Vera Pizzini, Marcos de Abreu Almeida, Lisandra Serra Damasceno (minha médica particular), Leonardo Barbedo, Fernando Almeida da Silva, Gabriela Costa, Vanessa Brito, Rosangela Alves e Stefani Favorette vocês foram indispensáveis a esse trabalho sob todos os aspectos, tanto científicos, quanto na amizade e apoio incondicional dado a mim. Muito Obrigado por tudo.

Aos Amigos do setor de lavagem e esterilização do INI por sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse preciso, sem vocês o trabalho não teria sido realizado, Muito Obrigado.

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, pela oportunidade fornecida aos alunos de um curso de pós graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Ao programa de Pós Graduação Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, seu coordenador Dr Armando Schubach e todos seus componentes .

Aos professores do curso de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, pelas aulas e conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

Às amigas Priscila, Ieda e Carol por toda ajuda e boa vontade nesse tempo de curso.

À Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio financeiro concedido.

À CAPES, pelo apoio concedido em forma de bolsa de estudos para a realização desse projeto

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho.

“If you put your mind into it, you can accomplish anything”

Dr. Emmet L. Brown



Oliveira, L. C. **Caracterização molecular e expressão fenotípica da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis***. Rio de Janeiro, 2016. 93 f. Dissertação [Mestrado em pesquisa clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

## RESUMO

Desde 1998 se observa a maior e mais duradoura epidemia de esporotricose causada principalmente por *Sporothrix brasiliensis* transmitida por felinos no Rio de Janeiro, com mais de 4.000 casos humanos diagnosticados até o presente. Amplo espectro clínico é observado em pacientes provenientes desta epidemia, e sabe-se que estes podem estar associados com o estado imunológico do hospedeiro. Entretanto, não se pode descartar que a virulência dos isolados de *S. brasiliensis* possa gerar formas mais graves da doença. Em face da vasta gama de defesas imunológicas, fungos dimórficos são bem efetivos no estabelecimento de infecção, delineando assim a necessidade de um entendimento maior dos mecanismos da patogênese e dos seus fatores de virulência. Embora se tenha demonstrado que espécies clínicas do complexo *Sporothrix* produzem urease, até o presente o gene codificador da urease neste complexo ainda não foi identificado em todas as espécies, e conseqüentemente seu papel como fator de virulência é desconhecido. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar e isolar parcialmente o gene codificador da urease (*URE*) de *S. brasiliensis* e estabelecer o modelo tridimensional preditivo desta enzima. Para tanto, foram desenhados iniciadores a partir da análise por métodos computacionais usando como molde a sequência do gene *URE* de *Sporothrix schenckii* depositadas no *European Nucleotide Archives* (ENA), no site Primer3, e o isolamento parcial do gene *SbURE* foi realizado através de sequenciamento, a partir do DNA da cepa-tipo de *S. brasiliensis* (CBS 120339) que é produtora de urease de acordo com análise fenotípica. A partir da sua sequência de aminoácidos, depositada no banco de dados do NCBI foi utilizada para a descrição do sítio catalítico, alinhamento com sequência de aminoácidos de *S. schenckii* e o desenho preditivo da proteína. Após a caracterização do gene outros três isolados provenientes de pacientes com diferentes formas clínicas da esporotricose, bem como um isolado urease negativo (*S. brasiliensis* IPEC-654-H), foram incluídos no estudo, para verificação da expressão de urease em meio de cultivo e testes moleculares. As provas fenotípicas demonstraram que todos os isolados do estudo, com exceção de um foram capazes de produzir urease em meio de cultura. Os iniciadores escolhidos foram capazes de hibridizar na sequência e isolar uma região parcial do gene codificador para urease em todos os isolados, demonstrando 98% de identidade com a mesma região parcial em *S. schenckii*, assim como a sequência de aminoácidos quando alinhadas. Através do desenho preditivo tridimensional da urease de *S. brasiliensis*, foi possível a identificação seu sítio catalítico, em comparação com outras ureases, de plantas e bactérias, estabelecendo assim sua identidade. Mais estudos, como por exemplo estudos *in vivo*, são necessários para um maior entendimento do papel dessa enzima na infecção por fungos do complexo *Sporothrix spp.*

**Palavras chave:** *Sporothrix brasiliensis*, urease, virulência, sequenciamento, modelagem molecular

Oliveira, L. C. **Phenotypic and molecular characterization of the enzyme urease of *Sporothrix brasiliensis***. Rio de Janeiro, 2016. 93 f. Master [Science dissertation in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

## ABSTRACT

Since 1998 it is observed the longest epidemic of sporotrichosis mostly caused by *Sporothrix brasiliensis*, transmitted by cats in Rio de Janeiro, where more than 4.000 human cases were diagnostic until now. A wide clinical spectrum is observed in patients with this mycosis, and it is known that this can be related with the immunological status of the patients. However, the virulence of certain *S. brasiliensis* strains can be also directly related with the generation of the most severe forms of this disease. Given the broad range of immunological defenses, dimorphic fungi are very effective in the establishment of infection, so it is necessary a better understanding of the mechanisms of the pathogenesis and virulence factor. It has been demonstrated that the clinical species of the *Sporothrix spp.* complex produce urease, however the urease coding gene has not been isolated yet. So, the main objective of this work was to characterize and isolate partially the urease (URE) coding gene of *S. brasiliensis* and the establishment of the tridimensional predictive model of this enzyme. For this reason, primers based on the *Sporothrix schenckii* sequence urease coding gene deposited at the European Nucleotide Archives (ENA) were designed using computational methods, on the website Primer3, and the partial isolation were realized through partial sequencing of the DNA of the type-strain of *S. brasiliensis* (CBS120339), which is urease positive by phenotypic methods. The amino acid sequence of urease of *S. brasiliensis* strain 5110 deposited at the NCBI GenBank was used to describe the enzymatic catalytic site, amino acid sequence, alignment with *S. schenckii* urease and the predictive design of protein. After characterizing the gene other three isolates from patients with different clinical forms of sporotrichosis as well as an isolate negative for urease production in Christensen's urea broth (*S. brasiliensis* IPEC-654-H), were included in the study in order to verify the urease expression in culture medium. The phenotypic tests had shown that all isolates, except one were able to produce urease in the culture medium. The selected primers were able of annealing to the sequence and to isolate the partial region of gene encoding urease in all isolates, demonstrating 98 % identity with the same gene partial region in *S. schenckii*, as well as in the aligned amino-acid sequences. Through the three-dimensional predictive design of *S. brasiliensis* urease, it was possible to identify its catalytic enzymatic site after comparison to other ureases, from plants and bacteria, thus establishing its identity. Further studies, such as *in vivo* and *in vitro* studies, are needed for a better understanding of the role of this enzyme in the infection caused by the *Sporothrix spp.* complex.

**Key words:** *Sporothrix brasiliensis*, urease, virulence, sequencing, molecular modelling.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Micromorfologia de *Sporothrix brasiliensis*: 1A – Forma filamentosa apresentando células conidiogênicas que surgem de hifas indiferenciadas e que formam conídios em grupos; 1B – Forma leveduriforme apresentando leveduras com brotamento em forma de charuto  
25

**Figura 2:** Representação de dois isolados de *S. brasiliensis* em meio de cultura líquido de Christensen para avaliar produção de urease. (A) Cepa urease negativa IPEC-654H, (B) possui meio de cultura sem fungo inoculado, (C) a cepa urease positiva IPEC-34190  
47

**Figura 3:** Representação de dois isolados de *S. brasiliensis* em meio de cultura líquido de Christensen para avaliar produção de urease. (A) Cepa urease negativa IPEC-654H, (B) possui meio de cultura sem fungo inoculado, (C) a cepa urease positiva IPEC-34190  
56

**Figura 4:** A – Gráfico demonstrativo da curva de crescimento do isolado IPEC-34190, produtora de urease; B - Gráfico demonstrativo da curva de crescimento do isolado IPEC-654H, negativa para produção de urease  
57

**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação da porção do gene SbURE feito a partir do DNA da cepa-tipo de *Sporothrix brasiliensis* utilizando os iniciadores URESS- F/R  
59

**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação parcial do gene da URE feito a partir do DNA dos isolados selecionados para o estudo sendo eles: A – CBS120339, B – IPEC-18782A, C – IPEC-17608, D – IPEC-34190, E – IPEC-654-H. O primeiro poço contém um padrão de peso molecular de 1kb e no segundo poço o controle negativo da reação 60

**Figura 7:** – Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do gene da urease a partir do cDNA dos isolados de *S. brasiliensis* selecionados para o estudo, sendo elas: A – CBS120339, B – IPEC-18782A, C – IPEC-17608, D – IPEC-34190, E – IPEC-654-H. O primeiro poço contém um padrão de peso molecular de 1kb e no último poço o controle negativo da reação 61

**Figura 8:** Árvore filogenética do gene URE, demonstrando que as sequencias codificadoras para URE de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* são altamente relacionadas nesta região parcial, quando comparadas com sequencias de URE provenientes de *T. rubrum*, *A. fumigatus* e *H. capsulatum*. Valor de *bootstrap* igual a 1000 63

**Figura 9:** Alinhamento entre as sequências de aminoácidos *Sporothrix brasiliensis* (SPBR) e *Sporothrix schenckii* (SPSK) com 98% de identidade (\*). Em destaque, a caixa cinza representa o centro ativo da urease, determinado a partir do ligante (ácido acetohidroxâmico) da uréase de *Bacillus pasteurii* (código PDB: 4ubp) Aminoácidos com cadeia fisicoquímica e volume molecular muito parecidos representados por ( : ) e aminoácidos sem tanta similaridade quanto sua estrutura físico química e volume molecular foram representados por ( . ) 66

**Figura 10:** Modelo computacional da urease demonstrando sua fenda catalítica que é formada de estruturas alfa-hélice (magenta), beta-pregueada (amarelo) e de alça (cinza). O centro ativo da enzima foi ressaltado pela representação de superfície (vermelho)

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Isolados de *S. brasiliensis* incluídas no estudo e classificadas de acordo com a sua origem, forma clínica e produção de urease 45

**Tabela 2:** Relação de iniciadores disponibilizado pelo *software* Primer3, para a sequência genômica codificadora para URE de *S. schenckii*. Os selecionados estão destacados em vermelho 58

**Tabela 3:** Tabela representativa dos alinhamentos entre a sequência de DNA codificante para urease de *S. schenckii* depositada no Broad Institute sob o número de acesso ERS95967.1, em comparação ao DNA e cDNA dos isolados de *S. brasiliensis*, uma positiva (CBS-12339) e outra negativa (IPEC-654-H) para urease. Os pontilhados representam que o sequenciamento não foi capaz de chegar até os nucleotídeos 64

**Tabela 4:** Identidade e similaridade da sequência de aminoácidos de *S. brasiliensis* (número de acesso KIH89566.1) com sequências de aminoácidos de *S. schenckii* (KJR81781) e outros fungos: *Histoplasma capsulatum* (A6R1T9), *Trichophyton rubrum* (F2STJ3) e *Aspergillus fumigatus* (B8N173) 65

**Tabela 5:** Aminoácidos que formam o sítio catalítico de várias espécies produtoras de urease, *S. brasiliensis*, *Bacillus pasteruii* e *Helicobacter pylori*, bem como a planta *Canavalia ensiformes*. Os aminoácidos estão destacados por cores, sendo: Histidina em vermelho, Alanina em azul claro, Lisina em azul escuro, Glicina em verde e Asparagina em laranja.

Aminoácido KCX equivale a Lisina carbamilada, porém em uma forma mais estável para cristalização

## LISTA DE ABREVIATURAS

3D – Tridimensional

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired immunodeficiency syndrome*)

APC – Ágar para Contagem em Placa (*Agar Plate Counting*)

BHI – Infusão-Cérebro-Coração (*Brain-Heart-Infusion*)

bp – Pares de Base (*Base Pair*)

BLAST – Ferramenta básica de busca de alinhamentos locais (*Basic local Allignment Search Tool*)

CAL - Calmodulina

cDNA – DNA Complementar (*complementary DNA*)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

DHN – di-hidroxi naftaleno

L-DOPA – 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

ENA – Arquivos de Nucleotídeos Europeu (*European Nucleotide Archives*)

EUA – Estados Unidos da América

HE – Hematoxilina & Eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

Kb - Kilobase

MALDI – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*)

mRNA – RNA mensageiro (*Messenger RNA*)

mtDNA – DNA mitocondrial (*Mitochondrial DNA*)

PBS – Tampão Fosfato Salina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)



PDA – Ágar Batata Dextrose (*Potato Dextrose Agar*)

qPCR – PCR quantitativo (*Quantitative PCR*)

RNA – Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

rRNA – RNA ribossomal (*Ribosomal RNA*)

*SbURE* – Gene codificante para urease de *Sporothrix brasiliensis*

SNC – Sistema Nervoso Central

TES – Tris Etilenodiamino Tetracético Sorbitol

TOF – Tempo de voo (Time of light)

UFC – Unidade Formadora de Colônias

URE - Urease

UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1 <i>SPOROTHRIX</i> E ESPOROTRICOSE	19
1.1.1. HISTÓRICO	19
1.1.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS	20
1.1.3 MORFOLOGIA E FISIOLOGIA	23
1.1.4 ECOEPIDEMIOLOGIA	25
1.1.5 QUADRO CLÍNICO DA ESPOROTRICOSE	27
1.1.5.1 ESPOROTRICOSE EM PACIENTES COM HIV/AIDS	29
1.1.6 DIAGNÓSTICO	30
1.1.7 TRATAMENTO	33
1.2 VIRULÊNCIA DE FUNGOS PATOGÊNICOS.	35
1.2.1 PROVÁVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA DO COMPLEXO <i>SPOROTHRIX</i> .	36
1.3 UREASE COMO FATOR DE VIRULÊNCIA	39
2. JUSTIFICATIVA	42
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
4.1 ISOLADOS	45
4.2 ANÁLISE FENOTÍPICA PARA PRODUÇÃO DE UREASE	46
4.3 CURVAS DE CRESCIMENTO	48
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA	49
4.5 SELEÇÃO DE INICIADORES E ISOLAMENTO DO GENE <i>SBURE</i>	50
4.6 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE <i>SBURE</i>	51
4.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA	52

4.8 SÍNTESE DE CDNA	53
4.9 MODELO COMPUTACIONAL DE UREASE DE <i>S. BRASILIENSIS</i>	53
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
5.1 ANÁLISE FENOTÍPICA	55
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO	56
5.3 SELEÇÃO DOS INICIADORES	57
5.4 PCR PARA ISOLAMENTO DO GENE <i>SBURE</i>	58
5.5 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE <i>SBURE</i>	61
5.6 ANÁLISES COMPARATIVAS DAS SEQUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE <i>S. BRASILIENSIS</i> E <i>S. SCHENCKII</i>	64
5.7 MODELO TRIDIMENSIONAL DE UREASE DE <i>S. BRASILIENSIS</i>	67
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>77</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>78</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>91</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 SPOROTHRIX E ESPOROTRICOSE

### 1.1.1. HISTÓRICO

O primeiro caso confirmado de esporotricose humana foi descrito no ano de 1898 em Baltimore, Estados Unidos da América (EUA), em um paciente de 36 anos admitido no Hospital Johns Hopkins apresentando abscesso em quirodáctilo com linfangite nodular ascendente em antebraço. O micologista Erwin F. Smith isolou e estudou o fungo da lesão deste paciente, sugerindo que o mesmo pertencesse ao gênero *Sporotrichum* (Schenck, 1898; Hektoen & Perkins, 1900).

O nome *Sporothrix schenckii* foi proposto por Hektoen e Perkins em 1900 quando relataram o segundo caso de esporotricose confirmada também nos EUA. Este caso ocorreu na cidade de Chicago, em um menino que se acredita ter contraído a micose quando feriu o dedo indicador da mão esquerda ao manusear um martelo. Segundo os médicos que atenderam o paciente, a lesão, que apareceu dez dias antes do paciente ter sido levado pelos pais aos médicos, apresentava no momento da anamnese o tamanho de uma ervilha e posteriormente apresentou regressão espontânea.

Um pouco mais tarde, segundo Kwon-Chung & Bennet (1992), que revisaram a literatura acerca do histórico da esporotricose, antes desse isolamento, em 1903, quando esta micose era endêmica na França, Sabouraud sugeriu o uso de iodeto de potássio para o tratamento da esporotricose, obtendo na época resultados bastante satisfatórios, tratamento que ainda hoje pode ser utilizado (Macedo *et al.*, 2015).

Quase uma década após o primeiro caso descrito nos EUA, em 1907, Lutz e Splendore identificaram no Brasil, uma infecção natural em ratos, sendo este, o primeiro caso de infecção natural descrita em animais. Infecção em animais experimentais demonstrou na época a suscetibilidade de outros mamíferos, como o gato, por exemplo, ao agente etiológico desta micose (Barros *et al.*, 2011). A partir do início do século XX começaram a ser descritos diversos surtos em vários países da Europa, América do Sul e África tendo sua maior prevalência, nesta época, observada nos Estados Unidos.

Na África do Sul, mais precisamente na região de Gauteng são relatados casos de esporotricose desde 1914, sendo em sua maioria provenientes do garimpo em minas de ouro (Govender *et al.*, 2015). Acredita-se que essas minas oferecem ao fungo um ambiente suscetível ao seu crescimento (Govender *et al.*, 2015), Apesar de ter sido descrito há um certo tempo, até hoje é observado nessa região uma epidemia, ainda proveniente do garimpo dessas minas (Quintal, 2000; Govender *et al.*, 2015)

Já em 1952 foi relatado o primeiro caso de esporotricose humana com história de contato com gato (Singer e Munce, 1952) e posteriormente constatou-se que a esporotricose é uma micose que também pode ocorrer por transmissão zoonótica, com a participação principalmente de gatos naturalmente infectados por *Sporothrix* spp (Wanke *et al.*, 2013).

### **1.1.2 ASPECTOS TAXONÔMICOS**

Até 1962 o agente da esporotricose foi classificado como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. Após estudos mais completos de sua morfologia e fisiologia, foram

constatadas diferenças significantes quando comparado com outros fungos do gênero *Sporotrichum*, que além de não fazerem dimorfismo térmico, não são patogênicos ao homem nem, a outros animais e possuem importantes diferenças na conidiogênese (Carmichael, 1962). Desta forma, a designação *Sporothrix schenckii*, originalmente dada ao fungo por Hekton e Perkins em 1900, foi conferida ao agente da esporotricose.

Por muitos anos *S. schenckii* foi incluído na Divisão Eumycota, Subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, Ordem Moniliales e Família Moniliaceae (Lacaz, 1998). Só após uma grande e importante revisão da taxonomia dos fungos, utilizando análises fenotípicas e filogenéticas já realizadas em outros estudos, Guarro e seus colaboradores (1999) revisaram a nomenclatura fúngica, observando que, na verdade, as espécies do complexo *Sporothrix* pertencem ao reino Fungi, divisão Ascomycota, Classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales, família Ophiostomataceae.

Durante um longo período, *S. schenckii* foi considerada a única espécie causadora de esporotricose (Lacaz, 2002). Entretanto, análises filogenéticas envolvendo um grande número de cepas de diferentes regiões geográficas mostrou elevada diferença molecular neste fungo (Marimon *et al.*, 2006). Já em 2007, Marimon e seus colaboradores propuseram, com base em análises fisiológicas, fenotípicas e moleculares a divisão de *S. schenckii* em um complexo de espécies crípticas capazes de causar esporotricose e não apenas uma única espécie, como proposto até aquele momento. Neste estudo foram analisados 127 isolados, a maioria proveniente de pacientes humanos, a princípio caracterizados como *S. schenckii*. Após testes de assimilação de açúcares, sequenciamento parcial do gene codificante da calmodulina

(CAL) e, principalmente em estudos taxonômicos isolados do ambiente, sequenciamento parcial do gene codificante para  $\beta$ -tubulina (Sasaki *et al.*, 2014), características macroscópicas e microscópicas e capacidade de crescimento em diferentes temperaturas, foi sugerida a divisão em outras 3 novas espécies, além de *S. schenckii*, sendo elas:

- ***Sporothrix mexicana***, encontrada em amostras ambientais no México e em alguns casos de esporotricose na Europa e no Brasil (Dias *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013);
- ***Sporothrix brasiliensis*** principal causador da atual epidemia observada no Brasil, principalmente no Rio de Janeiro (Almeida-Paes *et al.*, 2014), espécie esta também considerada uma das mais virulentas do complexo (Arrilaga-Moncrieff *et al.*, 2009);
- ***Sporothrix globosa***, espécie considerada pouco virulenta, contudo é encontrada em todo o mundo (Madrid *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010), sobretudo na Ásia (Kano *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014) e também na Venezuela (Camacho *et al.*, 2015).

Posteriormente, foi sugerido que *S. schenckii* var. *lurieii* deveria, também, ser considerada uma nova espécie, denominada atualmente *Sporothrix luriei* (Marimon *et al.*, 2008) após estudos baseados nas mesmas metodologias de taxonomia polifásica propostas anteriormente (Marimon *et al.*, 2007).

Além destas espécies de interesse clínico, foram descritas outras espécies ambientais do gênero *Sporothrix*, como *Sporothrix stylites*, *Sporothrix humicola* que diferem das espécies do complexo por não causarem esporotricose e serem incapazes de produzir melanina. Outros isolados ambientais das espécies *Sporothrix albicans*,

*Sporothrix pallida* e *Sporothrix nivea*, foram analisadas com ferramentas filogenéticas, onde foi observado que essas três espécies eram muito parecidas entre si, sendo assim foi proposto uma única espécie, *S. pallida*, para designar este taxon (de Meyer *et al*, 2008).

Recentemente, Rodrigues e colaboradores (2015) isolaram e caracterizaram uma nova espécie, proveniente da região de Viña Del Mar, no Chile, nomeada de *S. chilensis* com características morfológicas atípicas e capaz de causar a esporotricose, porém pouco virulenta em modelo animal murino.

### **1.1.3 MORFOLOGIA E FISILOGIA**

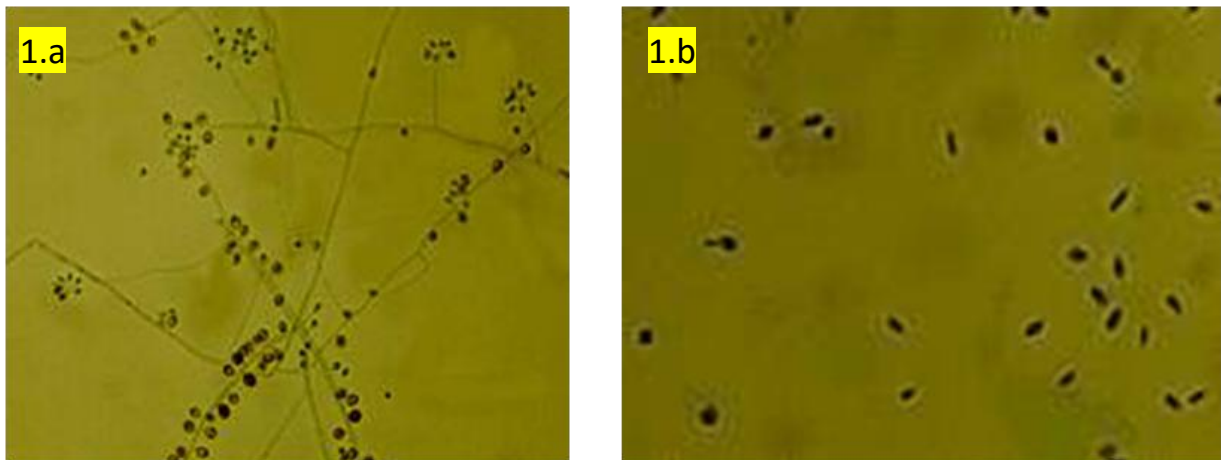
Os agentes da esporotricose são microrganismos sem mobilidade própria, eucariotos, com parede celular rígida e quitinosa, causam infecção tanto em seres humanos quanto em alguns animais, como gato e cachorro (Lacaz, 2002). Todas as demais espécies patogênicas do complexo *S. schenckii* são fungos termo-dimórficos, sapróbios que podem ser encontrados na natureza, tendo como seu habitat habitual a vegetação viva ou em decomposição e no solo, onde se encontra em sua forma filamentosa. A forma filamentosa também é observada em cultivo, por exemplo, em meio Sabouraud dextrose agar, Agar Batata Dextrose (PDA) ou Mycosel, entre 25°C e 30°C.

A forma filamentosa é composta de hifas septadas hialinas, de 1-2 µm de largura, com células conidiogênicas que surgem de hifas indiferenciadas e que formam conídios em grupos, em pequenos dentículos, em um arranjo denominado simpodial (figura 1a). Estes conídios unicelulares apresentam forma de lágrima a clavados (de Hoog &



Guarro, 1995) e não formam cadeias (Sigler, 1990). Muitas vezes, conídios de paredes hialinas ou castanhas espessas surgem ao lado das hifas. Esses conídios de parede celular escura permitem distinguir *S. schenckii* de outras espécies não patogênicas do gênero *Sporothrix* (St-Germain & Summerbell, 1996; de Meyer *et al.*, 2008). Além disso, o tamanho e a forma dos conídios demáceos podem variar dentro das espécies descritas no complexo *Sporothrix* (Marimon *et al.*, 2007). Entretanto, estas características de tamanho e forma, bem como a cor das colônias, seja a olho nu ou ao microscópio, não podem ser consideradas um critério taxonômico válido para diferenciação das espécies patogênicas ou ambientais do gênero (Oliveira *et al.*, 2011).

Em sua forma parasitária, ou seja, em tecidos animais, bem como em meios de cultivo enriquecidos incubados entre 35 a 37°C, todas as espécies do complexo *Sporothrix* apresentam-se como leveduras ovaladas unicelulares, globosas e/ou em forma de charuto, podendo apresentar um ou mais brotamentos. Esta morfologia é observada em exames teciduais processados por técnicas histológicas ou a partir de espécimes clínicos sob cultivo a 37°C em meio de cultura apropriado, como o ágar infusão-cérebro-coração (BHI), por exemplo, conforme representado na figura 1b (Zancopé-Oliveira *et al.*, 2011).



**Figura 1:** Micromorfologia de *Sporothrix brasiliensis*: 1A – Forma filamentosa apresentando células conidiogênicas que surgem de hifas indiferenciadas e que formam conídios em grupos; 1B – Forma leveduriforme apresentando leveduras com brotamento em forma de charuto

#### 1.1.4 ECOEPIDEMIOLOGIA

Por muitos anos a esporotricose foi conhecida como a “doença dos jardineiros”, pois era usualmente adquirida por inoculação traumática de espinhos de plantas ou farpas de madeira afetando aqueles que trabalhavam no cultivo de rosas.

Naturalmente o fungo é encontrado em solos, em vegetação viva ou em decomposição e excrementos animais, vivendo como sapróbios. Este material orgânico presente nos locais citados é fundamental para o desenvolvimento do micélio (Kenyon *et al.*, 1984; Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Outras atividades de lazer e ocupacionais estão associadas à aquisição da infecção, como por exemplo, floricultura, horticultura, pesca e caça. Temos como, por exemplo, o relato de transmissão no Uruguai e no sul do Brasil de pacientes que se infectaram com o fungo após caçar crocodilos, tatus ou jacarés, pois essas atividades

facilitam a inoculação traumática e conseqüentemente a introdução do fungo na pele (Miller *et al.*, 2002). Também foram descritos métodos de transmissão por profissionais de laboratório que contraem a doença manipulando culturas do fungo (Wanke *et al.*, 2013).

A infecção também pode ocorrer através de arranhadura e mordedura de felinos, sendo estas as formas mais comuns de transmissão do fungo na esporotricose zoonótica (Cruz, 2013). Os gatos apresentam uma enorme carga fúngica nas lesões, diferentemente das lesões vistas em humanos e cães, por exemplo, o que faz desses animais uma grande fonte de infecção na transmissão zoonótica deste fungo (Barros *et al.*, 2011; Pereira, 2011). Entretanto, alguns autores sugerem que a infecção também possa ser adquirida, de forma mais incomum, por picadas de inseto e mordeduras de roedores e cães (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Outros animais relacionados com a transmissão de *S. schenckii* são esquilos, cavalos e aves (Saravanakumar *et al.*, 1996). Também já foi possível isolar *S. schenckii* de animais aquáticos, especialmente peixes e golfinhos (Haddad *et al.*, 2002; Migaki *et al.*, 1978), bem como de insetos que tiveram contato direto com o fungo (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Entretanto, a hipótese de que esta possa ser uma possível via de transmissão não foi confirmada (Barros *et al.*, 2011).

A esporotricose é a micose subcutânea mais frequente na América Latina, onde desde 1998 se observa a maior e mais duradoura epidemia de transmissão zoonótica, principalmente no estado do Rio de Janeiro, onde mais de 4.000 casos de esporotricose humana e 3.800 casos de esporotricose felina já foram diagnosticados entre os anos de 1998 e 2012 somente no Instituto de Nacional de Infectologia Evandro Chagas –

Fundação Oswaldo Cruz (INI-FIOCRUZ), número este que cresce a cada ano (Barros *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014). Segundo Cruz (2013), este alto número de casos pode ser explicado pelo método de transmissão em constante ocorrência no Rio de Janeiro, o que não acontece em alguns outros lugares do Brasil, em que a forma de transmissão se dá após a manipulação de matéria orgânica vegetal infectada pelo fungo (Barros *et al.*, 2001, Freitas, 2014). Temos como exemplo o estado do Espírito Santo, onde de Araújo e seus colaboradores (2015) mostraram que, neste estado a epidemia ocorre através da transmissão clássica, sendo *S. schenckii* a principal espécie isolada, diferente do que é observado no Rio de Janeiro, onde a principal espécie encontrada é *S. brasiliensis* (Almeida-Paes *et al.*, 2014).

### **1.1.5 QUADRO CLÍNICO DA ESPOROTRICOSE**

Geralmente a esporotricose se apresenta de forma benigna e restrita à pele, ao tecido subcutâneo e aos vasos linfáticos adjacentes, porém um amplo espectro clínico é observado em pacientes com esporotricose, que pode afetar indiscriminadamente indivíduos de qualquer idade e de ambos os sexos. São descritas várias formas clínicas desta micose, sendo as mais importantes às formas linfocutânea, cutânea fixa, extracutânea e cutânea disseminada (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007). Cada uma dessas formas pode ser desenvolvida de acordo com o mecanismo de transmissão da doença, o tamanho do inóculo, a virulência da cepa infectante, a profundidade da inoculação traumática e a resposta imunológica do hospedeiro (Carlos *et al.*, 2009).

- Forma linfocutânea: É observada na maioria dos casos de esporotricose (75%). Por ser a mais típica, esta forma clínica é a de diagnóstico mais fácil. Geralmente, a lesão primária começa nas extremidades superiores, inferiores ou face, locais que são mais expostos à inoculação traumática, surgindo assim lesão eritematosa que evolui em tamanho formando ulceração. Em consequência desse quadro surgem lesões secundárias ao longo do caminho dos vasos linfáticos que estendem-se ao linfonodo mais próximo da lesão (Freitas, 2014).
- Forma cutânea fixa: Segunda forma clínica mais frequente, a lesão se mantém limitada ao sítio de inoculação, não havendo assim acometimento linfático ou disseminação para órgãos internos (Freitas, 2014).
- Forma cutânea disseminada: De acordo com Moreira e colaboradores (2015) essa forma clínica é mais comum em pacientes coinfetados com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) juntamente com a forma extracutânea. Apresenta-se com lesões disseminadas na pele. Sabe-se que fatores associados à deficiência de linfócitos T CD4+ desencadeada pelo HIV contribuem para a apresentação clínica observada nestes pacientes (Moreira *et al.*, 2015; Paixão *et al.*, 2015). Após a inoculação na pele, assim como na forma extracutânea, a disseminação ocorre por via hematogênica, aparecendo primariamente lesões subcutâneas (Freitas, 2014). Em pacientes imunocompetentes esta forma clínica está geralmente ligada com a transmissão por gatos domésticos, provavelmente pelas múltiplas inoculações no tegumento em decorrência de um contato mais próximo entre o animal doente e o paciente humano (Barros *et al.*, 2004).

- Forma extracutânea: Aparece em menos de 5% dos casos e é a mais difícil de ser diagnosticada. Essa forma, um pouco mais excepcional, surge principalmente após a disseminação hematogênica do fungo ou inalação de conídios. Quaisquer órgãos ou tecidos podem ser afetados e os sintomas são específicos para o órgão envolvido e acompanhados de febre e comprometimento geral em alguns casos (Zancopé-Oliveira *et al.*, 2011). O envolvimento pode ser unifocal ou multifocal. As formas pulmonar e do sistema nervoso central (SNC) são comumente associadas à imunossupressão causada por doenças como diabetes, alcoolismo, câncer, corticoterapia, doença pulmonar obstrutiva crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) (Barros *et al.*, 2011). Outras formas clínicas menos frequentes também são observadas nesta micose, como formas osteoarticular, ocular e mucosa. A forma disseminada da doença aparece como a principal forma clínica no caso de internações por essa micose, juntamente com infecção bacteriana secundária e reações de hipersensibilidade (Freitas *et al.*, 2014).

### **1.1.5.1 ESPOROTRICOSE EM PACIENTES COM HIV/AIDS**

Em pessoas que possuem HIV/aids, deve-se ter um cuidado especial com esta micose, pois este grupo de pacientes com esporotricose apresenta uma taxa de mortalidade em torno de 30%, além de demonstrar uma correlação estatística entre o envolvimento do SNC e o óbito dos pacientes (Moreira *et al.*, 2015), assim como os pacientes apresentando formas muito mais graves da doença (Paixão *et al.*, 2015). Entretanto a forma clínica apresentada por pacientes com coinfeção esporotricose/HIV depende do *status* imunológico desses pacientes (Freitas, 2014).

### 1.1.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da esporotricose é feito pela identificação e isolamento do fungo em meios de cultura, em geral Sabouraud dextrose e Mycosel, em sua forma filamentosa de 22°C à 25°C, e sua posterior conversão para a forma de levedura em meio infusão de cérebro e coração (BHI) a 35°C - 37°C. As amostras para diagnóstico são usualmente coletadas a partir de raspado da lesão, *swab*, aspirado de lesão ou biópsia dos pacientes. Nas formas extracutâneas, ou em formas disseminadas, a coleta é mais difícil, sobretudo quando não existe evidência de acometimento cutâneo, sendo dependente de procedimentos invasivos, tais como biópsias profundas e/ou hemocultura para o isolamento do fungo. Em outros quadros clínicos, como por exemplo, em alguns casos oculares, o material para coleta é muito escasso, dificultando o cultivo do agente (Wanke *et al.*, 2013). Um dos pontos fundamentais no diagnóstico micológico dessa infecção é que, independente do tipo de lesão, deve-se ter o máximo de atenção no momento da semeadura do material nos meios de cultura por conta de contaminações que possam ocorrer.

Outro fator limitante na cultura dos agentes da esporotricose é que o isolamento e a identificação do fungo em meio de cultivo podem demorar de três a quatro semanas, por conta do crescimento do isolado a partir do espécime clínico e o tempo que o fungo demanda para conversão à forma leveduriforme, o que, em casos de pacientes coinfectados com HIV ou com formas graves de acometimento da doença, pode representar um tempo demasiadamente longo (Zancopé-Oliveira *et al.*, 2011). Além disso, em alguns casos de pacientes com lesão fechada ou com difícil obtenção de

amostra clínica, se faz o uso do diagnóstico sorológico por ensaio imunoenzimático (ELISA) (Bernardes-Engemann *et al.*, 2005). Contudo este método também apresenta algumas limitações como casos de falso-positivo, reação cruzada com alguns outros agentes infecciosos, e o tempo de janela imunológica, onde o paciente, embora infectado, ainda não foi capaz de desencadear uma resposta imune humoral completa e produzir anticorpos para serem detectados pela técnica (Martinez-Alvarez *et al.*, 2012). Algumas outras técnicas são muito pouco usadas hoje em dia, porém tem sua relevância, como a intradermorreação com esporotriquina, que é constantemente positiva sem doença ativa, sendo utilizada apenas em alguns casos como, por exemplo, em inquéritos epidemiológicos (Cruz, 2013).

O exame histopatológico, utilizando um fragmento de tecido fixado em formol, é bastante útil para o diagnóstico da esporotricose. Embora células leveduriformes de *S. schenckii* (e das demais espécies do complexo) possam ser observadas em biópsias de pele com a coloração de rotina hematoxilina e eosina (HE), outras técnicas, tais como a prata de Gomori ou ácido periódico-Schiff, podem ser usadas para confirmar a identificação de elementos fúngicos. Células parasitárias das espécies de *Sporothrix*, que podem ser encontradas dentro das células fagocíticas ou no espaço extracelular, são difíceis de serem visualizadas devido à escassez destas células em lesões de pacientes humanos (Larone, 2011; Quintella *et al.*, 2011). Podem ser observados também, por algumas vezes, os corpos asteróides, estrutura composta de fungo envolvido por material eosinofílico, correspondente ao material proteico que é depositado após a reação antígeno-anticorpo (Ramos-e-Silva *et al.*, 2007).



Até o presente, poucos métodos moleculares têm sido aplicados na detecção de ácido desoxiribonucleico (DNA) de fungos pertencentes ao complexo a partir de amostras clínicas e identificar *Sporothrix* spp. em cultura. A reação da polimerase em cadeia (PCR) baseada na amplificação de sequências de genes de fungos é uma ótima ferramenta para a identificação de agentes de micoses. Uma das metodologias pioneiras com base na detecção de DNA utilizada para o diagnóstico de infecções fúngicas foi relatada por Sandhu e colaboradores (1995) que desenvolveram 21 sondas de ácido nucléico direcionadas à pequena subunidade (18S) do gene de ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) de vários fungos patogênicos, incluindo *S. schenckii*. Os resultados mostraram um alto nível de especificidade. Outros métodos moleculares vêm sendo descritos para identificação e genotipagem do complexo, como por exemplo, análises de *fingerprinting* com o iniciador T3B, que é um iniciador universal no qual amplifica uma região do RNA transportador, já que cada fungo do complexo *Sporothrix* tem essa região de tamanho diferente, um perfil de bandas de cada espécie do complexo é visto em um gel de agarose (Oliveira *et al.*, 2014). Outro método molecular aplicado a *Sporothrix* spp. é o baseado no polimorfismo dos fragmentos gerados por endonucleases de restrição (PCR-RFLP) do gene da calmodulina, em que cada fungo do complexo também possui um perfil de banda específico em um gel de agarose, porém este método se mostrou mais rápido e barato do que o T3B. Os dois métodos citados se mostraram eficientes como método alternativo para diferenciar todas as espécies de importância clínica do complexo (Rodrigues *et al.*, 2014). Outros métodos mais eficazes precisam ser desenvolvidos, com busca de genes alvo melhores, porém o genoma de *S. brasiliensis* foi descrito apenas em 2014 (Teixeira *et al.*, 2014), assim como o de *S. schenckii*

(Cuomo *et al.*, 2014), o que representou um grande passo para que outros métodos moleculares sejam desenvolvidos ou aperfeiçoados.

Outra técnica que recentemente foi descrita para auxiliar na distinção de espécies do complexo *Sporothrix* foi a técnica de espectrometria de massas por MALDI TOF, onde Oliveira e colaboradores (2015) analisaram a técnica com 64 isolados do complexo *S. schenckii*, incluindo *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. pallida*. Ao final deste estudo, os autores validaram um novo protocolo para a técnica de espectrometria de massas para diferenciar espécies clínicas e ambientais do complexo, tendo no estudo, 100% de correlação com os resultados de identificação obtidos por técnica de sequenciamento do gene da calmodulina.

### **1.1.7 TRATAMENTO**

As principais alternativas terapêuticas na esporotricose são os fármacos antifúngicos. O itraconazol, que é o fármaco de primeira escolha, tem como mecanismo de ação a inibição da síntese do ergosterol, um componente vital da membrana das células fúngicas. A anfotericina B, que age ligando-se aos esteróis da membrana celular do fungo sensível, alterando a permeabilidade da mesma e provocando extravasamento dos componentes intracelulares, é a droga de escolha para as formas mais graves e disseminadas (Kauffman *et al.*, 2007)

Hoje em dia o itraconazol tem sido o medicamento de escolha pela grande eficácia imposta e com baixo risco, sendo a terbinafina a principal alternativa para os

casos onde houver contraindições (principalmente insuficiência cardíaca e gravidez) dentre outras (Francesconi *et al.*, 2009).

Outros antifúngicos que podem ser usados como terapia alternativa no caso de contra indicação do itraconazol e da terbinafina é o fluconazol, que apesar de ter uma menor eficácia nesta micose em relação ao itraconazol, é usado quando o paciente é intolerante ao itraconazol ou quando este faz interação medicamentosa com outro medicamento (Kauffman *et al*, 2007). Dentro desta mesma linha outros azólicos também podem ser utilizados como o posaconazol (Silveira *et al*, 2009, Paixão *et al*, 2015) e o cetaconazol (Pereira *et al*, 2010) sendo este último não indicados para humanos, apenas para felinos. Ambos precisam de mais estudos para que possam realmente ser definidos como terapias eficazes.

O iodeto de potássio é um fármaco amplamente utilizado hoje em dia e, apesar de ter sido descrito há muito tempo atrás, em 1903, seu mecanismo de ação continua desconhecido (Macedo *et al*, 2015). Este é um tratamento de menor custo do que o tratamento com antifúngicos (Reis *et al*, 2012; Gremião *et al*, 2014, de Macedo *et al*, 2015).

Em mulheres gestantes o iodeto de potássio e o itraconazol, bem como a maioria dos medicamentos farmacológicos, são contra-indicados. Essas pacientes podem usar a termoterapia com aplicação diária de calor local (42-43°C) através de uma bolsa de água quente ou uma fonte de infravermelho até a cicatrização das lesões (Kauffman *et al.*, 2007). Porém esse tipo de tratamento requer máximo cuidado da paciente, para que não se tenha efeitos adversos como queimaduras por conta do calor (Ferreira *et al.*, 2012). Apesar de existirem formas de tratamento não farmacológicas, como excisão

cirúrgica e crioterapia (Hiruma *et al.*, 1987; Ferreira *et al.*, 2011), a admissão de fármacos antifúngicos é a estratégia terapêutica mais utilizada

## 1.2 VIRULÊNCIA DE FUNGOS PATOGÊNICOS.

A virulência de um determinado patógeno resulta da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção, como aguda, subaguda e crônica, sendo assim, então associados ao estabelecimento da doença (Fernandes, 2009). Acredita-se que a virulência de um microrganismo se origina de intensas e variadas interações que esse microrganismo faz tanto com o meio ambiente como com sua própria espécie e com outros seres vivos. Essas interações fazem com que os seres vivos adquiram estratégias e mecanismos de sobrevivência, por meio de constantes adaptações com a própria espécie e com o meio ambiente em que vivem. Estratégias de sobrevivência mais eficazes criam, acidentalmente, fatores de virulência mais eficazes quando esses patógenos encontram hospedeiros animais (Casadevall *et al.*, 2012).

Seguindo a hipótese anteriormente descrita (Casadevall *et al.*, 2012) sugere-se que algumas cepas virulentas de *Sporothrix* evoluíram através da interação com outros microrganismos no meio ambiente, como foi demonstrado no trabalho de Steenbergen e colaboradores (2004) onde leveduras de *S. schenckii* uma vez fagocitadas por *Acanthamoeba castellanii*, uma ameba que vive no solo, são capazes de sobreviver dentro do protozoário, matar e usá-lo como nutriente. Almeida-Paes (2012) demonstrou que na interação de *Sporothrix spp* com bactérias, como *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosa*, 70% isolados de *Sporothrix*, na presença dessas bactérias

foram capazes de produzir melanina, outro fator de virulência de fungos, em quantidades maiores do que em cultura pura.

As fases de adesão, entrada e sobrevivência de determinado parasita no hospedeiro parecem ser essenciais para o estabelecimento e desenvolvimento da patogênese (Rappleye & Goldman, 2006). Vários fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência de fungos em parasitismo estão descritos, como componentes da parede celular, moléculas responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, produção de diferentes tipos de melaninas, a expressão de fosfolipases, proteases e elastases capazes de causar dano tecidual e quebrar as defesas do hospedeiro; a produção de catalases, enzimas que atuam contra os mecanismos oxidativos (Brummer & Stevens, 1984; Almeida-Paes *et al*, 2015). Além disso, a termotolerância é fundamental para a adaptação do fungo ao hospedeiro (Lacaz, 2002).

### **1.2.1 PROVÁVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA DO COMPLEXO *SPOROTHRIX*.**

Em face da vasta gama de defesas imunológicas, fungos dimórficos são bem efetivos no estabelecimento de infecção, delineando assim a necessidade de um entendimento maior dos mecanismos da patogênese e dos seus fatores de virulência (Barros *et al*, 2011). Fungos dimórficos, entre eles os do complexo *Sporothrix* spp., fazem morfogênese conforme o ambiente em que se encontram, onde na temperatura ambiente se apresentam na forma filamentosa e na temperatura corpórea do

hospedeiro, ou seja aproximadamente a 37°C, se apresentam como leveduras, sendo este dimorfismo um dos principais fatores de virulência.

A virulência de certos isolados do complexo é vista como uma importante peça na geração de formas mais graves da doença. Como informações disponíveis sobre os fatores de virulência dos isolados de *Sporothrix* spp. da área endêmica de esporotricose no Rio de Janeiro são escassas, Almeida-Paes (2012) estudou 63 isolados obtidos de pacientes desta área endêmica e nove controles de outras localidades, em que a produção de melanina em diferentes condições, termotolerância, produção de protease e urease foram analisados. Também foi estudada a composição antigênica de oito isolados, sendo sete da área endêmica de esporotricose no Rio de Janeiro e um controle, externo à área endêmica. Os isolados do estudo compreenderam as espécies *S. brasiliensis* (n=59), *S. schenckii* (n=12) e *S. globosa* (n=1). A análise de produção de melanina mostrou que, além da já conhecida melanina di-hidroxi naftaleno (DHN), as três espécies estudadas do complexo *Sporothrix* spp são capazes de produzir outros dois tipos de melanina, utilizando 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) ou L-tirosina como substrato (Almeida-Paes *et al.*, 2009; Almeida-Paes *et al.* 2012). A produção destes três tipos de melanina foi bastante variada entre os diferentes isolados, sendo influenciada pelo meio de cultivo, temperatura, pH, fonte de carbono e tempo de incubação, sugerindo um controle multifatorial da melanogênese no complexo *Sporothrix*. A melanina é produzida principalmente nos conídios e nas leveduras, mas quando L-DOPA é adicionado ao meio de cultivo, hifas também podem produzir melanina (Almeida-Paes *et al.*, 2009). Além disso, a melanina formada a partir de L-tirosina, piomelanina, um composto solúvel que pode recobrir as células fúngicas, sem

polimerizar na parede celular ao contrário dos outros dois tipos de melanina, conferindo proteção contra luz ultravioleta (UV), fármacos antifúngicos, reativos de oxigênio e de nitrogênio (Almeida-Paes, 2012). Neste mesmo estudo (Almeida-Paes, 2012) não foi possível correlacionar nenhum fator de virulência, termotolerância ou antígenos de *Sporothrix* spp. com as manifestações clínicas da esporotricose, sugerindo que estas sejam fruto de uma combinação de fatores envolvendo a virulência do fungo e o status imunológico do hospedeiro. Também não se tem conhecimento se cepas menos virulentas, que a princípio não causariam doença em imunocompetentes, possam desencadear a micose em imunocomprometidos.

Alguns outros fatores de virulência também são muito importantes no complexo *Sporothrix*, como peróxido de ergosterol, já demonstrado na fase leveduriforme de *S. schenckii*, e associado com a fagocitose dessa forma pelas células polimorfonucleares do hospedeiro (Carlos *et al*, 2009). As adesinas também são conhecidas como um importante fator de virulência, sendo responsáveis pela adesão desse fungo nas células endoteliais e epiteliais após a inoculação na pele (Lima *et al*, 1999).

Em alguns estudos, foram observadas diferenças, tanto no perfil de secreção quanto na produção em si, de algumas de enzimas como proteinases, DNase, caseinase entre outras, entre *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, provável razão pela qual são fungos semelhantes, mas com perfil de virulência e patogenicidade diferentes (Fernandes *et al.*, 2013; Romeo & Criseo, 2013; Almeida-Paes *et al.*, 2015). A produção de urease também foi diferenciada entre os isolados de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, sendo a maior produção desta enzima associada a última espécie, o que pode estar relacionado ao elevado número de casos de regressão espontânea desta micose no Rio

de Janeiro, visto que cepas isoladas de pacientes com regressão espontânea expressavam mais urease do que cepas de pacientes submetidos à terapia antifúngica (Almeida-Paes *et al.*, 2015).

### 1.3 UREASE COMO FATOR DE VIRULÊNCIA

A urease do feijão (*Canavalia ensiformis*) foi a primeira enzima a ser purificada e cristalizada, em 1926 por James Batcheller Sumner (Simoni *et al.*, 2002). Essa enzima, pertencente à família das hidrolases, possui quatro domínios, sendo três domínios estruturais e um catalítico, no qual se liga o íon metal, no caso da urease o níquel, e dependendo do microrganismo produtor de urease, esses três domínios poderão ser modificados, evidenciando assim os diferentes papéis dessa enzima. A hidrólise do seu substrato, a uréia, produz amônia e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), internalizado pela célula e posteriormente convertido em bicarbonato (Moblely *et al.* 1995).

Em vários microrganismos, a urease tem sido demonstrada como uma proteína com vários domínios funcionais, cujo papel fisiológico mais relevante é possibilitar que estes utilizem a ureia como fonte de nitrogênio. Além disso, também tem sido descrito que a urease possui atividade tóxica em insetos e protetora em algumas plantas, assim como atividade de agregação plaquetária em alguns mamíferos, demonstrando assim a diversidade de papéis que esta enzima exerce na natureza (Carlini *et al.*, 2016; Follmer 2008). Em muitos microrganismos a urease é tida como um importante fator de virulência, como por exemplo, nas bactérias *Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis*, a liberação de amônia é benéfica para o microrganismo, pois ocasiona o aumento parcial



do pH ácido do trato gastrointestinal, no caso de *H. pylori* (Dubreuil *et al.* 2002), e do trato urinário, no caso de *P. mirabilis* (Moblely *et al.* 1995), melhorando assim as condições para a reprodução bacteriana.

O gene *URE*, codificador da urease, foi primeiramente clonado em fungos na espécie *Coccidioides immitis* (Yu *et al.*, 1997), e tem sido mostrada sua expressão *in vivo*, sugerindo, portanto que o mesmo participe no processo de esporulação e patogênese deste fungo (Feder *et al.*, 2015).

Em muitas espécies de fungos patogênicos, já foi demonstrada importante atividade de urease, o que caracteriza a enzima como importante fator de virulência no mecanismo de infecção, entre eles, o próprio fungo dimórfico *Coccidioides spp.*, no qual a urease apresenta uma importante atividade de alcalinização do meio. Alguns estudos feitos com este fungo demonstraram que essa alcalinização proveniente da amônia gerada intracelular e liberada no meio extracelular, é fundamental para a conversão deste fungo que ficaria muito dificultada em um meio ácido, como por exemplo, no interior da célula dos hospedeiros (Moblely *et al.*, 1995). Estudos realizados em *Coccidioides spp.* demonstraram que a urease produzida dentro da célula infectada se revelou como principal produtor de amônia intracelular, com posterior secreção deste composto para o ambiente extracelular e elevação do pH para aproximadamente 8, tornando este ambiente mais alcalino, contribuindo assim para a morfogênese destes fungos da fase saprofítica para a fase parasitária (Mirbod-Donovan *et al.*, 2006; Feder *et al.*, 2015).

Outro fungo que possui atividade produtora de urease e já a tem como importante fator de virulência caracterizado é *Cryptococcus neoformans*. Cox e colaboradores

(2000) demonstraram que cepas selvagens deste fungo foram capazes de sobreviver em modelos murinos, e que cepas modificadas geneticamente, urease negativas, não foram capazes de sobreviver depois de inoculadas em camundongos exceto na presença da cepa selvagem. O papel da urease de *C. neoformans* como fator de virulência também foi demonstrado na invasão e manutenção do fungo no SNC de modelos murinos, onde Olszewsk e colaboradores (2004) demonstraram que quando infectados com uma cepa mutante de *C. neoformans*, não produtora de urease, após 4 semanas sobreviveram à infecção e somente apresentaram sintomas neurológicos bem brandos, enquanto que os infectados com cepa selvagem, apresentaram uma mortalidade de 75% e nesse mesmo período, houve também o aparecimento de granulomas tanto nos pulmões quanto no cérebro do grupo infectado com a cepa produtora de urease, demonstrando um importante papel desta enzima na disseminação do fungo para o SNC.

A produção de urease também é verificada em outros fungos como *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* (Hiruma *et al*, 2013) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Rocha *et al*, 2009).

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido ao escasso conhecimento dos fatores de virulência no complexo *Sporothrix spp.*, aliado aos importantes papéis que a urease representa em vários outros microrganismos, inclusive vários fungos de grande importância clínica, faz-se necessário caracterizar esta enzima em *S. brasiliensis*, uma vez que, até o presente, não está claro a sua importância na infecção por este fungo, (seja na aquisição ou na manutenção da infecção), que vem aumentando a cada dia em número de casos humanos e animais.

A enzima urease é importante fator de virulência em vários fungos, entre estes *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides spp* (Cox *et al*, 2000) e bactérias tais como *Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis* (Dubreuil *et al*, 2002), e embora se tenha demonstrado que espécies clínicas do complexo *Sporothrix* produzam urease, seu papel como fator de virulência permanece desconhecido.

Nos fungos do complexo *Sporothrix spp.* foi possível observar apenas em meio de cultivo específico, por meio de análises fenotípicas que cepas consideradas mais virulentas produzem mais urease do que as consideradas menos virulentas (Almeida-Paes *et al*, 2015). Contudo, o gene codificador para urease nesses fungos ainda não foi descrito, bem como as características funcionais dessa enzima, como modelo tridimensional (3D), e descrição do seu sítio catalítico, para a caracterização molecular dessa enzima.

A técnica de modelagem molecular de proteínas tem a função de predizer a estrutura ou função de determinada proteína com a utilização de *softwares* específicos. Os métodos de modelagem molecular são técnicas relativamente novas, que tiveram

uma maior inserção a partir da década de 80, com o advento dos computadores bem como isolamento de sequências de aminoácidos e cristalização de proteínas. A reprodução experimental de uma proteína, assim como informações sobre sítio catalítico de enzimas, possíveis interações e informações físico-químicas da proteína se fazem absolutamente necessárias em diversos estudos, como por exemplo, estudos relacionados a novos fármacos, onde o primeiro passo é a verificação se esta substância é um bom alvo (candidato) a produção de novo fármaco, partir de informações preditivas como interações, definição do sítio catalítico e outras informações previamente citadas. A partir destas informações podemos agregar potenciais químicos medicinais para testes mais minuciosos tanto *in vitro* quanto *in vivo* e descartar substâncias que não possuem perfil necessário para tal, economizando tempo e recursos nesse processo. Essas técnicas possibilitarão um maior entendimento de aspectos estruturais dessa enzima, proporcionando, informações sobre papel funcional e possível virulência dessa enzima nos fungos do complexo *Sporothrix*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente e isolar parcialmente o gene codificador da urease (URE) de *Sporothrix brasiliensis* e estabelecer o modelo tridimensional preditivo desta enzima.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Caracterizar fenotipicamente isolados de *S. brasiliensis* produtores e não produtores de urease;
2. Identificar ferramentas moleculares (iniciadores) para amplificação parcial do gene codificador para URE de *S. brasiliensis*;
3. Identificar e isolar o gene codificante para URE de *S. brasiliensis*, agente mais isolado nesta epidemia;
4. Comparar as sequencias parciais do gene codificante para URE de *S. brasiliensis* com *S. schenckii* e com a sequencia de urease de outros fungos patogênicos;
5. Analisar *in silico* a estrutura molecular da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis*;
6. Comparar a homologia entre as sequencias de aminoácidos de URE *S. brasiliensis* com a sequencia de *S. schenckii*;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS

Foram selecionados cinco diferentes isolados de *S. brasiliensis* provenientes do estado do Rio de Janeiro previamente isolados de pacientes humanos com esporotricose e armazenadas no Setor de Diagnóstico Micológico do Laboratório de Micologia do INI/ Fiocruz, das quais uma é cepa-tipo caracterizada anteriormente como urease positiva, outras três como urease positiva e outras uma negativa para urease. O levantamento da origem dos isolamentos dos fungos e a forma clínica da esporotricose que os pacientes apresentaram (tabela 1) e a utilização desses isolados foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INI/Fiocruz registrado sob o número: CAAE: 36933814.6-0000.5262, preservando a identidade dos pacientes (Anexo A)

**Tabela 1:** Isolados de *S. brasiliensis* incluídas no estudo e classificadas de acordo com a sua origem, forma clínica e produção de urease.

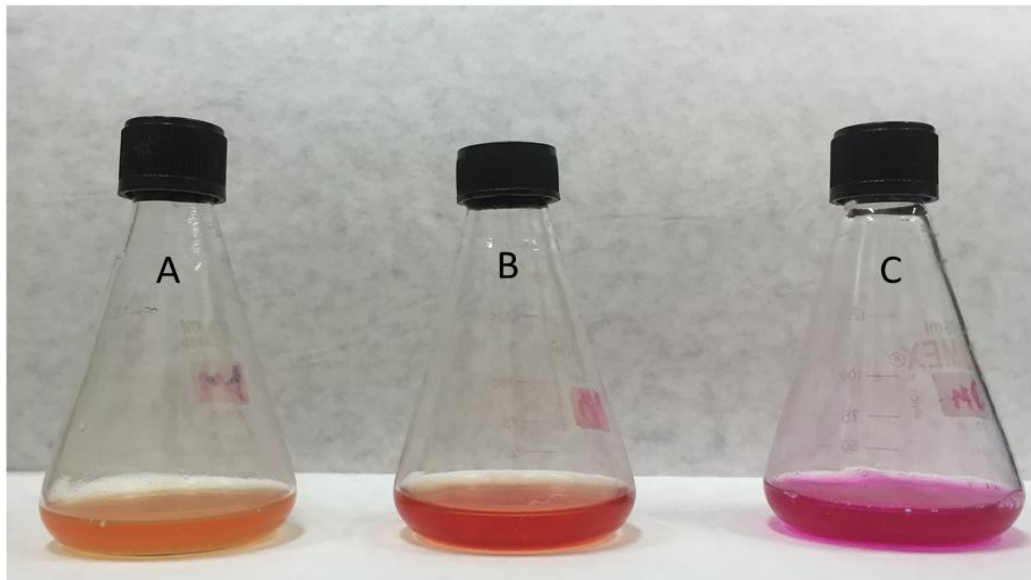
<b>Isolados</b>	<b>Origem</b>	<b>Forma Clínica</b>	<b>Produção de Urease</b>
<b>CBS 120339</b>	Pele	Linfocutânea	Positiva
<b>IPEC-18782A</b>	Pele	Cutânea Disseminada	Positiva
<b>IPEC-17608</b>	Pele	Cutânea Disseminada	Positiva
<b>IPEC-34190</b>	Pele	Cutânea Fixa	Positiva
<b>IPEC-654-H</b>	Sangue	Extracutânea	Negativa

Os isolados selecionados para o estudo foram mantidos em sua forma leveduriforme em meio BHI sólido em estufa a 35,5°C

## 4.2 ANALISE FENOTÍPICA PARA PRODUÇÃO DE UREASE:

Todos os isolados selecionados para o estudo apresentaram micromorfologia e macromorfologia compatíveis com *Sporothrix spp.* e foram submetidos a análise fenotípica para verificar a produção de urease. Para tanto, 0,5 mL de uma suspensão em equivalência à escala 2,0 de McFarland de células leveduriformes com solução salina na concentração de 0,85%, de cada amostra foram inoculadas em caldo ureia de Christensen, sendo o meio de cultivo produzido no próprio laboratório em duas etapas: **a)** um meio de cultivo básico composto de 1g de peptona de carne, 5g de cloreto de sódio, 2g de fosfato de potássio monobásico, 0,016g de fenol vermelho diluído em 8mL de álcool na concentração de 70% e 1000mL de água destilada. O pH deste meio básico foi ajustado para 6.9 e posteriormente autoclavado; **b)** a solução de ureia composta de: 20 g de ureia, 1g de glicose e 100mL de água destilada, esterilizada por filtração. O meio de cultivo básico e a solução de ureia foram misturados, formando assim o meio de cultivo de Christensen (Christensen, 1946; Kane & Fisher, 1971). Após esse processo, esta suspensão celular em meio de cultivo foi incubada à 37°C, durante 7 dias. Uma das avaliações desta prova foi visual observando a alteração da cor do meio de cultivo, ou seja, as amostras que não produzem e não secretam urease, acidificam o pH do meio de cultivo, tornando-o laranja e as amostras que produzem e secretam alcalinizam o meio de cultivo, tornando-o roxo, conforme representado na figura 2. Isolados de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045) foram utilizados como controles negativo e positivo respectivamente, sendo inoculados e incubados como descrito para as amostras de *Sporothrix*. Ao final de quatro e sete dias

os cultivos foram centrifugados a 10.000 g e 100µL do sobrenadante foram transferidos, em triplicata, para uma placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Corning, Tewksbury, EUA). A absorbância tanto das amostras quanto dos controles foram obtidas pelo espectrofotômetro de microplacas Biotek modelo Epoch em comprimento de onda de 559nm. Todo o processo, tanto as amostras, bem como os controles foram feitos em triplicatas e a média aritmética da densidade ótica das amostras foi calculada.



**Figura 2:** Representação de dois isolados de *S. brasiliensis* em meio de cultura líquido de Christensen para avaliar produção de urease. (A) Cepa urease negativa IPEC-654H, (B) possui meio de cultura sem fungo inoculado, (C) a cepa urease positiva IPEC-34190.

Para análise dos resultados foi calculado um ponto de corte positivo e um negativo para a produção de urease dos isolados incluídos no estudo. Para determinação desses pontos de corte, foram utilizadas cepas controles de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045), *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990) e *Trichosporon asahii* (ATCC 90039) para o estabelecimento do ponto de corte positivo. *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258) para estabelecimento do ponto de corte negativo. A média desses controles, mais 3 vezes o



desvio padrão para as positivas e menos 3 vezes o desvio padrão para a negativa, foram utilizados para a determinação do ponto corte. O protocolo usado para esses controles foi o mesmo descrito anteriormente.

### **4.3 CURVAS DE CRESCIMENTO:**

Para analisar o crescimento de *S. brasiliensis* no caldo uréia de Christensen foram elaboradas curvas de crescimento microbiano através da determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Para isso, foram eleitos dois isolados: o isolado urease negativo (IPEC-654-H), e outro isolado forte produtor de urease (IPEC-34190). As culturas foram preparadas como descrito anteriormente e diariamente foi retirada uma alíquota de 100 µL das culturas. Diluições decimais seriadas (diluições na base 10) das alíquotas foram realizadas como descrito por Madigan (2014) e plaqueadas com auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri contendo Agar para contagem em placa (ACP), as quais foram incubadas por 7 dias a 30°C. Após o período de incubação, as colônias formadas a partir de cada diluição foram quantificadas para determinação do número de UFC. Também foram medidas as densidades óticas a 559nm do sobrenadante das amostras, diariamente no espectrofotômetro de microplacas Biotek modelo Epoch.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE DNA:

Técnicas convencionais utilizadas para a extração e purificação de DNA genômico de fungos filamentosos e/ou leveduras foram utilizadas de acordo com protocolo desenvolvido por Woods e colaboradores (1993) e com pequenas modificações realizadas previamente em nosso laboratório (de Oliveira, *et al.*, 2012). A extração de DNA seguiu o protocolo descrito abaixo:

Foi realizada lise mecânica de uma massa de células equivalente a aproximadamente 300 µL em um tubo de 1,5 mL com o auxílio de nitrogênio líquido e 600 µL tampão TES (Tris (40mM) EDTA (1mM) Sorbitol (20mM)). Essa mistura foi aquecida em banho-maria a 90°C e centrifugada (1000 g) por 10 minutos. Após esses passos o sobrenadante foi recuperado, o sedimento descartado e realizada a precipitação das proteínas três vezes com clorofórmio-álcool isoamílico na concentração 24:1 (Invitrogen) na mesma quantidade de sobrenadante recuperado do passo anterior, com centrifugações (22000 g) por 10 minutos. Após a coleta desse sobrenadante foram adicionados, 10% do volume recuperado, de acetato de Sódio 3 mol/L com 2,5 vezes também deste volume recuperado de álcool etílico absoluto. Após esse passo, as amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas (22000 g) por 30 minutos. Posteriormente à precipitação o DNA foi lavado com álcool etílico 70% por três vezes com centrifugações (22000 g) por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado após cada lavagem. O DNA então foi hidratado com 30 µL de água Miliq estéril e quantificado no espectrofotômetro *NanoVue Plus Spectrophotometer* – GE Healthcare e estocado em *freezer* a -20° C.

#### 4.5 SELEÇÃO DE INICIADORES E ISOLAMENTO DO GENE *SBURE*:

Em uma tentativa da caracterização molecular do gene da URE de *S. brasiliensis* (*SbURE*) um par de iniciadores foi desenhado a partir da sequência nucleotídica de urease de *S. schenckii* (ATCC 58251) (*SsURE*) depositado no *European Nucleotide Archives* (ENA) sob o número ERS95967.1. Os iniciadores foram selecionados a partir do *site* Primer3 disponível no endereço eletrônico [www.bioinformatics.nl/Primer3plu](http://www.bioinformatics.nl/Primer3plu). Foram utilizados os parâmetros básicos disponíveis no *site* para o desenho, que são: tamanho dos iniciadores entre 18bp e 22bp, temperatura de *melting* dos iniciadores entre 57°C e 63°C e a porcentagem de guanina e citosina entre 20% e 80%. A sequência citada acima foi utilizada como molde para a seleção dos pares de iniciadores.

Posteriormente, uma PCR *In-silico* utilizando os iniciadores desenhados, foi realizada a partir do programa *Fast PCR*, com o intuito de analisar sua capacidade de hibridização com a sequência e temperaturas de hibridização. A partir dos resultados obtidos a partir da PCR *In-silico* foi utilizado para padronização da PCR convencional um gradiente de temperatura variando de 57,0 a 60,0°C, para estabelecer a melhor temperatura de hibridização. (60,0°C, 59,8 °C, 59,4 °C, 58,5 °C, 58,2 °C, 57,6 °C, 57,2 °C e 57,0 °C)

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 100 ng de DNA, 1X tampão de reação [160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl

pH 8,8, 0,1% Tween-20], 0,2 mM de dNTP, 2,5 U de *Taq*DNA polimerase (Invitrogen), 2 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) e 10  $\mu$ M de cada par de iniciadores. A reação ocorreu com o seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e mais 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento nas temperaturas citadas acima por 50 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,05%), sob luz UV (Hoefer Pharmacia BioTech UV-20 UV), tendo o peso molecular calculado a partir de uma comparação com um marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

#### **4.6 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE *SBURE*:**

Após a obtenção dos iniciadores, o gene *SbURE* dos isolados selecionados para o estudo foram amplificados, os produtos da PCR e purificados, utilizando QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Vallencia, CA, USA) e enviado para sequenciamento na plataforma PDTIS/Fiocruz, que utiliza o princípio de sequenciamento desenvolvido por Sanger e colaboradores (1977), seguindo protocolo sugerido pela plataforma, que consiste em 7,5  $\mu$ L total de reação, no qual 3,5 pmol de cada iniciador, em tubos diferentes, e DNAs dos isolados em concentrações que variaram entre 100ng/ $\mu$ L e 120ng/ $\mu$ L em cada tubo, mensurados pelo LOW MASS DNA LADDER (Invitrogen, California, CA, USA). Este protocolo foi realizado para confirmação da identidade da sequencia codificadora de *URE*.

## 4.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA:

A extração e a purificação de ácido ribonucleico (RNA) foram realizadas utilizando o método do TRIZOL (Invitrogen), que consiste de uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato que deriva da melhoria do método descrito por Chomczynski & Sacchi (1987) de extração do RNA em único passo. A concentração de RNA extraído foi quantificada no aparelho *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* – Thermo Scientific, utilizando 1 µL de água Miliq para calibrar o aparelho e depois mais 1 µL de cada amostra para a quantificação.

Foi realizada a lavagem da massa total de células leveduriformes cultivadas por 5 dias em caldo BHI a 37°C por três vezes com 20 mL de tampão salina-fosfato (PBS) e lise mecânica por agitação com o auxílio de 700 µL de trizol (Invitrogen) e o equivalente a aproximadamente 300 µL de pérolas de zircônia (0,5mm). Essa mistura foi agitada em *mini beadbeater* (biospect products) a 2800 g por 30 segundos durante três vezes com intervalos de 1 minuto no gelo. Após esse processo, essa mistura foi centrifugada por 10 minutos a 1008 g, a fase aquosa foi coletada e 200 µL de clorofórmio foi adicionado para cada 750 µL de sobrenadante recuperado. Esta solução foi agitada e centrifugada por 15 minutos a 1008 g. O sobrenadante foi coletado e a mesma quantidade da solução fenol-clorofórmio- álcool isoamílico (25:24:1 – *Invitrogen*) foi adicionada, passo repetido duas vezes com centrifugações de 15 min a 1008 g intercaladas. O sobrenadante desta última centrifugação foi coletado e adicionado 125 µL da solução de Citrato de Sódio (0,2M): Cloreto de Sódio (0,4M) mais 250 µL de Isopropanol (*Invitrogen*) para cada 750 µL de sobrenadante recuperado. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas a

11200 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi lavado com 1 mL de álcool etílico 70%, centrifugado por 5 minutos a 11200 g, hidratado com 30 µL de água miliq autoclavada, quantificado no espectrofotômetro *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* – Thermo Scientific e estocado em *freezer* -80° C. Todo este processo foi feito em banho de gelo.

Para extração de RNA os fungos foram cultivados em meio de Christensen e como controle da extração todas as amostras foram tratadas com DNase (*Invitrogen*), enzima que degrada DNA genômico, seguindo recomendações e protocolo do fabricante, e após a extração foram feitas PCRs com o RNA puro, utilizando os iniciadores UREASS-F e UREASS-R no propósito de verificar algum contaminante

#### **4.8 SÍNTESE DE cDNA:**

Para a síntese de cDNA uma massa de 2 µg de RNA total foi submetida a uma reação de transcrição reversa utilizando o *kit* High Capacity RNA-to-DNA (*Life Technology, part number 4387406*) para obtenção do DNA complementar (cDNA) em um volume de 20µL, segundo as instruções do fabricante.

#### **4.9 MODELO COMPUTACIONAL DE UREASE DE *S. BRASILIENSIS*.**

A sequência de aminoácido da urease de *Sporothrix brasiliensis* (SPBR) (número de acesso NCBI: KIH89566) foi submetida ao banco de dados do PDB (*Protein DataBase*) (Berman *et. al*, 2000) a partir do BLAST (Altschul *et. al*, 1990) e ao servidor Hhpred (Söding *et. al*, 2005) para detectar estruturas tridimensionais de proteínas

homólogas. Esta sequência também foi submetida, juntamente com a sequência de *Sporothrix schenckii* (SPSK) (número de acesso NCBI: KJR81781) ao servidor Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para realizar o alinhamento entre as sequências.

O modelo estrutural de SPBR foi determinado pelo programa MODELER v.9.4 (Sali, *et. al*, 1993) usando alinhamento múltiplo das sequências de ureases das bactérias *Bacillus pasteurii* (código PDB: 4ubp), *Helicobacter pylori* (código PDB: 1E9Y), *Klebsiella aerogenes* (código PDB: 1FWE) e do feijão, *Canavalia ensiformis* (código PDB: 4gy7), como molde. Não foram usados como molde sequencias cristalizadas de urease de espécies de fungos, devido a não existência de sequencias de urease de fungos cristalizadas no banco de dados utilizados. Além disso, submetemos a sequência ao portal de bioinformática do Expasy (<http://www.expasy.org/>) a fim de analisar a presença de domínios de alfa hélice, âncora GPI, peptídeo sinal, massa molecular e ponto isoelétrico em *softwares* específicos.

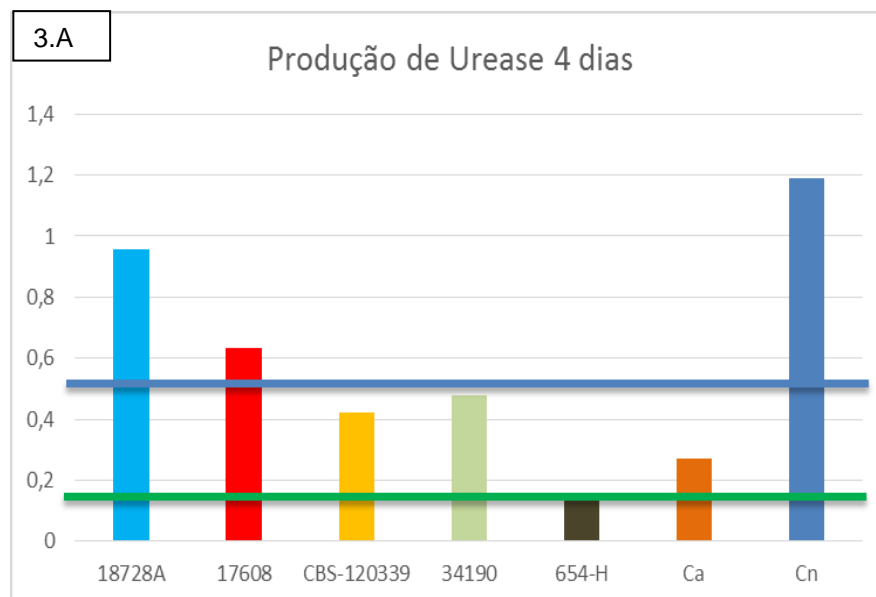
O modelo gerado pelo MODELER foi validado no servidor SAVES (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/>, acessado em 10/01/2016) utilizando o VERIFY\_3D, ERRAT e Verify Protein (Profiles-3D) (Eisenberg *et. al*, 1997). Em seguida, utilizamos o banco de dados do PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) para identificar proteínas idênticas a urease de SPBR, com sitio ativo já estabelecido (ligantes cristalizados). A visualização e a identificação do sitio ativo da estrutura da urease modelada foi realizada pelo *software* Pymol (Schrödinger, 2002) através do alinhamento estrutural da urease modelada de *S. brasiliensis* com as ureases cristalizadas.

## 5. RESULTADOS

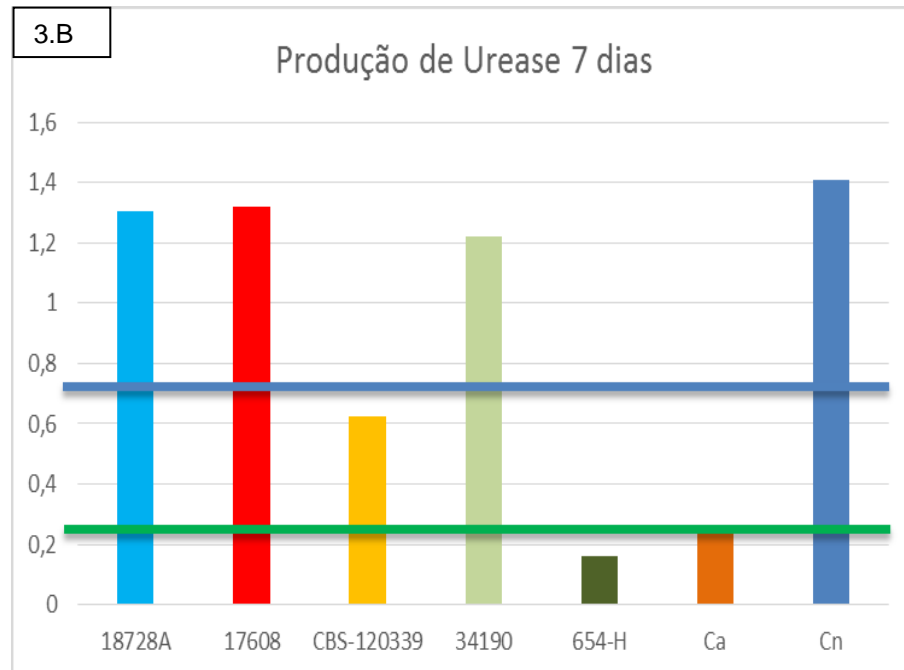
### 5.1 ANÁLISE FENOTÍPICA

Consideramos isolados forte produtores de urease as que apresentaram densidade ótica (DO) acima de 0,551 em 4 dias e 0,746 em 7 dias em 559nM. Isolados não produtores apresentaram DO abaixo de 0,175 em 4 dias e 0,214 em 7 dias de acordo com o ponto de corte estabelecido a partir das médias das cepas controles, também em 559nM.

Entre as amostras selecionadas para o estudo, os isolados IPEC-18782A, IPEC-17608 e IPEC-34190 se mostraram forte produtores de urease após o período de 7 dias, a cepa-tipo (CBS-120339) foi considerada fraca produtora e o isolado IPEC-654-H foi classificada como não produtor. As figuras 3A e 3B representam as médias de D.O de cada isolado selecionado para o estudo:



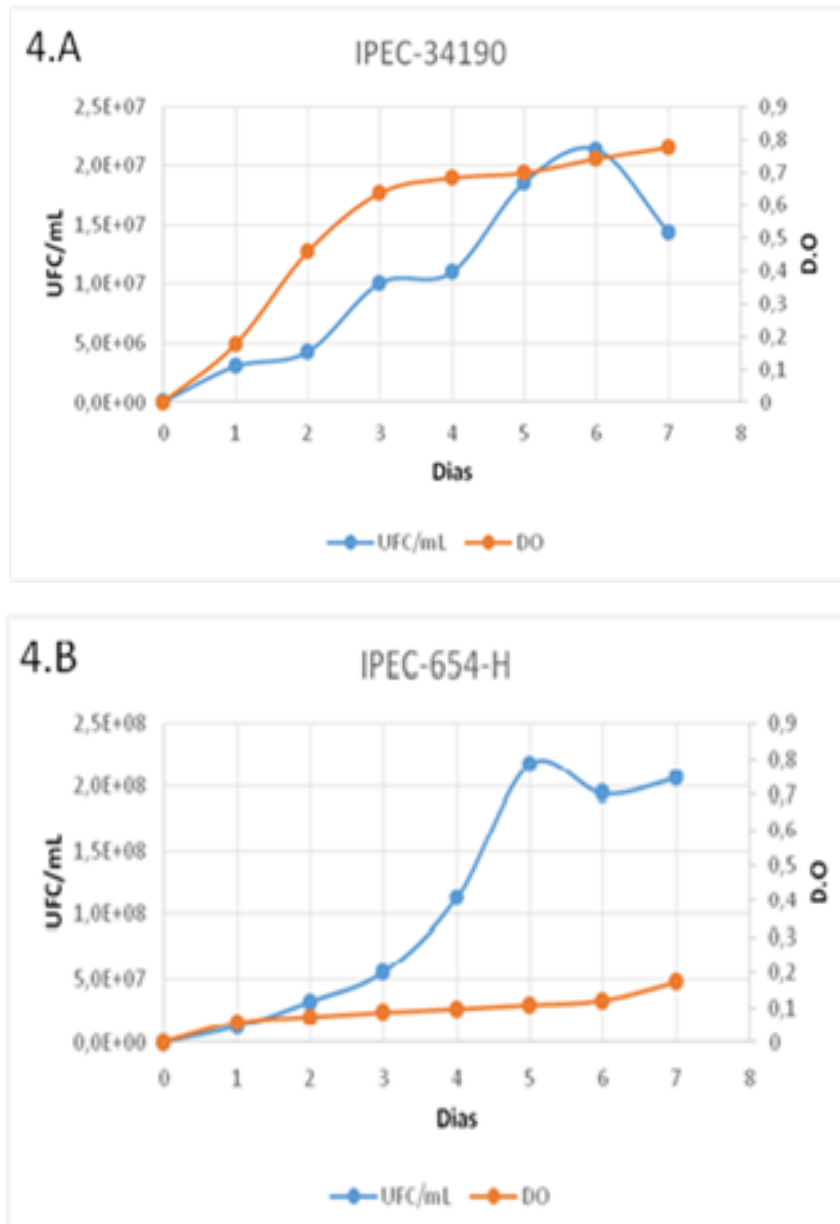




**Figura 3:** Produção de urease em todos os isolados do estudo lidas por espectrometria em filtro 559nm. As linhas verticais, azul e verde representam os pontos de corte positivo e negativo respectivamente. (A) produção em 4 dias e (B) produção em 7 dias.

## 5.2 CURVA DE CRESCIMENTO

Os resultados das curvas de crescimento em caldo ureia de Christensen foram expressos D.O de cada amostra escolhida durante 7 dias (figura 4) bem como na forma de UFCs (figura 4 A e B):



**Figura 4:** A – Gráfico demonstrativo da curva de crescimento do isolado IPEC-34190, produtora de urease; B - Gráfico demonstrativo da curva de crescimento do isolado IPEC-654H, negativa para produção de urease.

### 5.3 SELEÇÃO DOS INICIADORES

O *software* Primer3 disponibilizou uma lista de iniciadores, citada na tabela 2:

**Tabela 2:** Relação de iniciadores disponibilizado pelo *software* Primer3, para a sequência genômica codificadora para URE de *S. schenckii*. Os selecionados estão destacados em vermelho

Iniciadores Senso	5'GGTGCCAAAAGAGCTTGACA3'
	5' <b>GTGGTGGGCGAGAGCAAC</b> 3'
	5'ATCAAGAGCGGCATGATTG3'
Iniciadores Anti-senso	5'CGGGTTCGTTTCGATAAAGT3'
	5'CGGGTTGATGGTGTACTTGG3'
	5' <b>CAAAGAATTGCTGCGACAAC</b> 3'

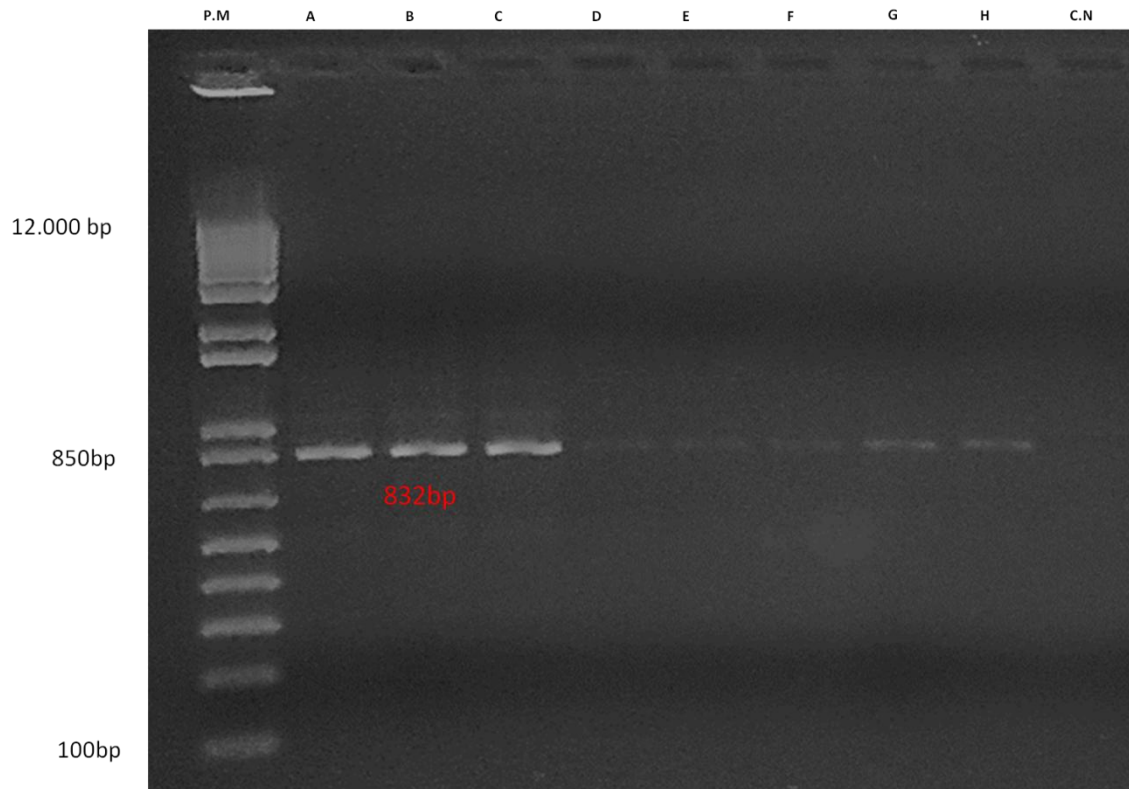
De acordo com o *software* *Fast PCR* os iniciadores hibridizaram completamente com a sequência e a temperatura de *melting* do iniciador senso foi 58,9°C e do iniciador anti-senso foi 52,2°C. O par de iniciador escolhido amplificava um produto de 832 bp entre as posições 1894 até 2726 da sequência, que segundo o próprio *site* no qual a sequência foi depositada, corresponde ao éxon 2 descrito abaixo:

*Sense* UREASS-F: 5' GTG-GTG-GGC-GAG-AGC-AAC 3'

*Anti-sense* UREASS-R: 5' CAA-AGA-ATT-GCT-GCG-ACA-AC 3'

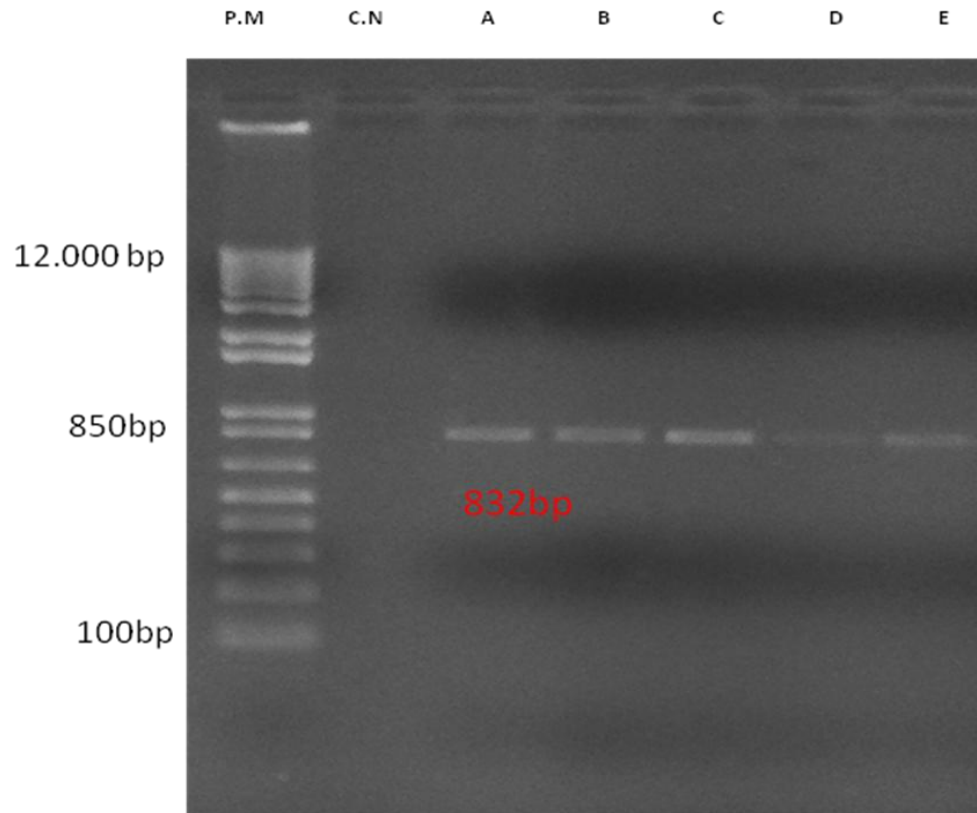
## 5.4 PCR PARA ISOLAMENTO DO GENE SBURE

A sequência parcial do gene *SBURE* foi amplificado e purificado a partir da cepa-tipo de *Sporothrix brasiliensis*. A PCR gerou um produto amplificado esperado de 832 pb, sendo 60°C a temperatura de hibridização de escolha para esta reação, conforme registrado na figura 5.



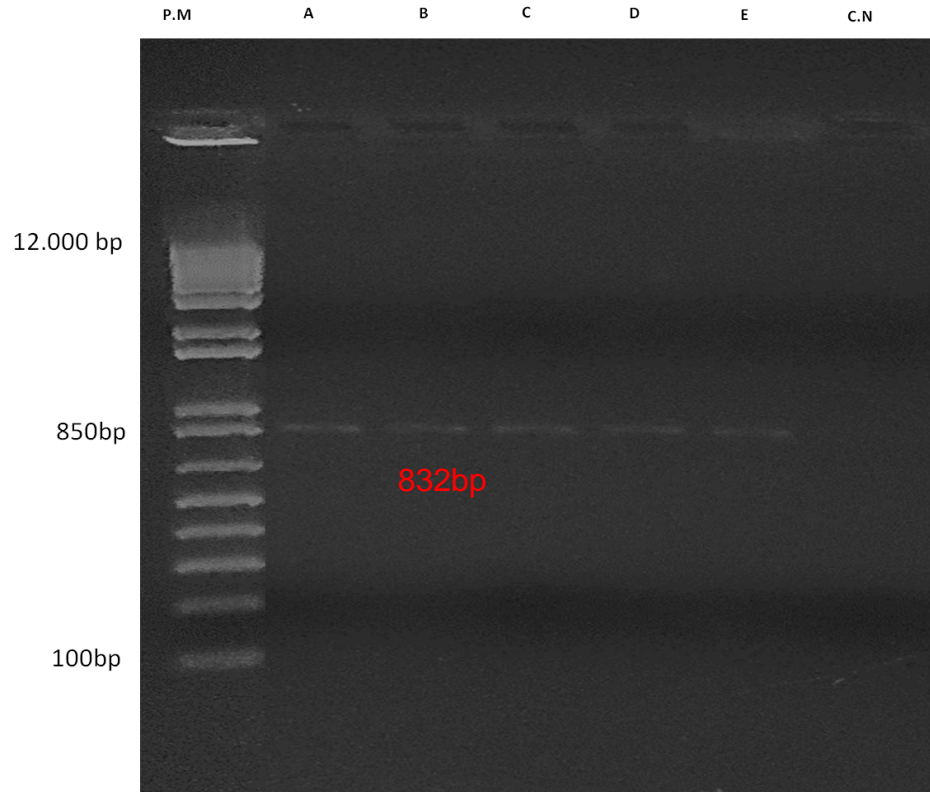
**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação da porção do gene SbURE feito a partir do DNA da cepa-tipo de *Sporothrix brasiliensis* utilizando os iniciadores URESS- FR. Bandas representativas das temperaturas de hibridização escolhidas para o teste, são elas: A – 60,0 °C, B – 59,9 °C, C – 59,8 °C, D – 58,5 °C, E – 58,2 °C, F – 57,6 °C, G – 57,2 °C, H – 57,0 °C que amplificou no tamanho esperado de 832 pares de base.

Posteriormente os DNAs dos 5 isolados foram submetidos a PCR com os mesmos iniciadores, no qual também foi observado produto de PCR de 832bp (figura 6).



**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação parcial do gene da URE feito a partir do DNA dos isolados selecionados para o estudo sendo eles: A – CBS120339, B – IPEC-18782A, C – IPEC-17608, D – IPEC-34190, E – IPEC-654-H. O primeiro poço contém um padrão de peso molecular de 1kb e no segundo poço o controle negativo da reação.

Este par de iniciadores foi utilizado também para amplificação do cDNA dos isolados selecionados para o estudo, produtores de urease: CBS120339, IPEC-18782A, IPEC-17608 e IPEC-34190 e do isolado que não produz urease em meio de cultivo, IPEC-654-H, figura 7.



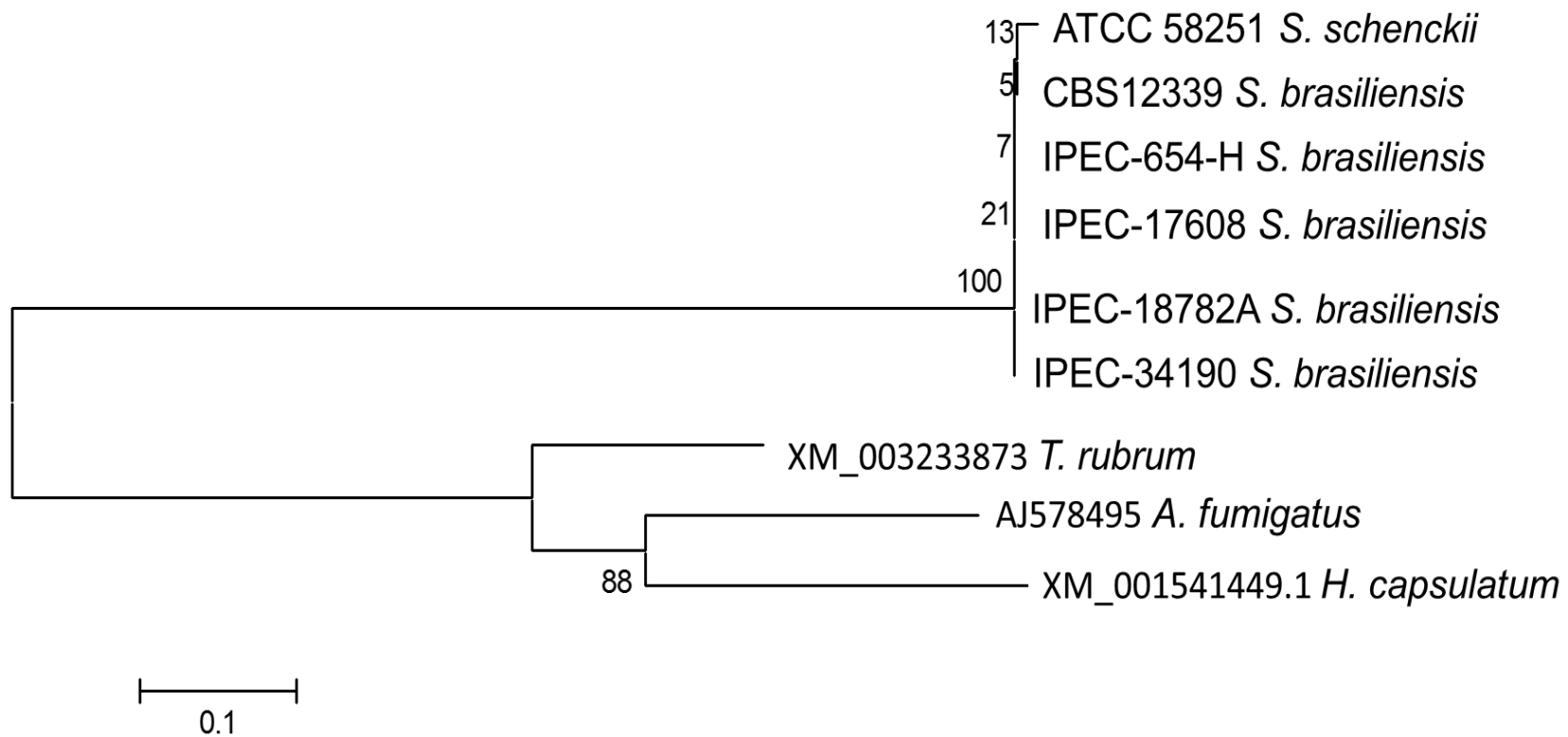
**Figura 7:** – Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do gene da urease a partir do cDNA dos isolados de *S. brasiliensis* selecionados para o estudo, sendo elas: A – CBS120339, B – IPEC-18782A, C – IPEC-17608, D – IPEC-34190, E – IPEC-654-H. O primeiro poço contém um padrão de peso molecular de 1kb e no último poço o controle negativo da reação.

## 5.5 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE SBURE

O gene codificador para urease proveniente de isolados de *S. brasiliensis* foi sequenciado parcialmente conforme metodologia descrita anteriormente. Tanto DNA quanto cDNA da cepa de referência e produtora de urease, CBS 120339, bem como dos outros isolados selecionados para o estudo foram sequenciados. As sequências obtidas foram confrontadas com a sequência do gene codificador da urease de *S. schenckii* depositado banco de DNA no *Broad Institute* e feita uma busca local através da

ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, em português – Ferramenta básica de busca de alinhamentos locais) (Altschul *et. al*, 1990) no próprio site do Broad Institute. Foi encontrada nas três sequências uma homologia de 98% com a sequência de *s. schenckii* depositada (número de acesso ERS95967.1) nos 724 nucleotídeos que compõem esta porção sequenciada. O alinhamento das sequências, realizado com o auxílio do *software* MEGA 4, demonstrou 12 variações entre o DNA do gene codificador de urease de *S. schenckii* com o DNA e o cDNA de isolados de *S. brasiliensis* nas posições 38, 50, 68, 107, 185, 586, 644, 688, 698, 701, 704 e 715, como demonstrado na tabela 3 e gerou uma árvore filogenética conforme visto na figura 8 (valor de *bootstrap* 1000). Resultados semelhantes foram obtidos nos outros isolados incluídos no estudo com sequência de SbURE idênticas as visualizadas em CBS12339 e IPEC-654-H.

A história evolutiva foi inferida usando o método de *Neighbor-Joining*. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,01298559 é mostrada. A percentagem de árvores idênticas, em que cada isolado/cepa foi associado no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) mostrados ao lado dos ramos. Essas análises filogenéticas foram conduzidas no *software* MEGA4.



**Figura 8:** Árvore filogenética do gene URE, demonstrando que as sequencias codificadoras para URE de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* são altamente relacionadas nesta região parcial, quando comparadas com sequencias de URE provenientes de *T. rubrum*, *A. fumigatus* e *H. capsulatum*. Valor de *bootstrap* igual a 1000.



**Tabela 3:** Tabela representativa dos alinhamentos entre a sequência de DNA codificante para urease de *S. schenckii* depositada no Broad Institute sob o número de acesso ERS95967.1, em comparação ao DNA e cDNA dos isolados de *S. brasiliensis*, uma positiva (CBS-12339) e outra negativa (IPEC-654-H) para urease. Os pontilhados representam que o sequenciamento não foi capaz de chegar até os respectivos nucleotídeos.

Sequências	Nucleotídeos											
	38	50	68	107	185	576	644	688	698	701	704	715
Sequência urease <i>S. schenckii</i> ERS 95967.1 (URE positivo)	C	G	C	C	G	G	A	C	C	C	A	G
Sequência urease CBS-12339 DNA (URE positivo)	T	C	G	G	A	A	G	T	A	A	G	T
Sequência urease CBS-12339 cDNA (URE positivo)	T	C	G	G	A	A	G	T	A	A	G	T
Sequência urease IPEC-654-H DNA (URE negativo)	T	C	G	G	A	A	G	T	A	A	G	T
Sequência urease IPEC-654-H cDNA (URE negativo)	T	C	G	G	A	A	G	T	A	-	-	-

## 5.6 ANÁLISES COMPARATIVAS DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE *S. BRASILIENSIS* E *S. SCHENCKII*

A sequência da SPBR apresenta 98 % de identidade e 99% de similaridade com a sequência de SPSK, mostrando apenas uma pequena diferença entre essas duas sequências. Essas diferenças não estão localizadas no sítio ativo, representado em

destaque no alinhamento (figura 9). Nesta análise, através do servidor Expasy, não foi identificada a presença de estruturas transmembranar, peptídeo sinal e âncora GPI possível. Já a composição físico-química teórica indica o ponto isoelétrico 5,89 e a massa molecular de 90,0 kDa.

Adicionalmente a esses resultados, foi alinhada a sequência de *S. brasiliensis* com outros fungos também para avaliar a identidade e similaridade, descrito na tabela 4:

**Tabela 4:** Identidade e similaridade da sequência de aminoácidos de *S.brasiliensis* (número de acesso KIH89566.1) com sequências de aminoácidos de *S. schenkii* (KJR81781) e outros fungos: *Histoplasma capsulatum* (A6R1T9), *Trichophyton rubrum* (F2STJ3) e *Aspergillus fumigatus* (B8N173)[

	<i>Sporothrix schenkii</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Identidade	98%	69,6%	67,3%	71,7%
Similaridade	99%	81,7%	81,6%	83,3%

```

SPBR      -MKTLPLDKLVISQLGTIAQRRLARGVKLNHSEAVALISHNIQELIRDGNHKVADLMAL
SPSK      MHLVPEKELDKLVISQLGTIAQRRLARGVKLNHSEAVALISHNIQELIRDGNHKVADLMAL
          .
          *****

SPBR      GSTMLGRRHVLPSVCTTLHEIQVEGTFPNGTYLVTVHEPVKTDDGDLARALYGSFLPVPD
SPSK      GSTMLGRRHVLPSVCTTLHEIQVEGTFPNGTYLVTVHEPVKTDDGDLARALYGSFLPVPD
          *****

SPBR      NSLFLPEAAAAAYEAAAQPGAVVVVKQTKDNMIRLNEGRERTRLSVTNKGDRPVQVGSYH
SPSK      NSLFLPEAAAAAYEAAAQPGAVVVVKQTKDNMIRLNEGRERTRLSVTNKGDRPVQVGSYH
          *****

SPBR      FIETNPQLLFDRKRAYGFRLDIPAGTSIRFEPGDTKTVPPLVAIGGHRVIRGGNNLASGPV
SPSK      FIETNPQLLFDRKRAYGFRLDIAAGTSIRFEPGDTKTVPPLVAIGGHRVIRGGNNLASGPV
          *****

SPBR      DLSRVDDILARLQKAGFGHAPEPLTDAPLDRAAFEMTRQAYQTMFGPTTGDVVRLGATDL
SPSK      DLSRVDDILARLQKAGFGHAPEPLADAPLDRAAFEMTRQAYQTMFGPTTGDVVRLGATDL
          *****

SPBR      WIEVEKDYTVRGDECKFGGGKTLREGMGQASGRADKDCLDLVIIVNALVLDWTGIYKADIG
SPSK      WIEVEKDYTVRGDECKFGGGKTLREGMGQASGRADKDCLDLVIIVNALVLDWTGIYKADIG
          *****

SPBR      VKEGIIVGIGKAGNPDVMDGVHPANMIVGSCTEVVAGENKIIITAGGIDTHIHYICPQQAY
SPSK      VKEGIIVGIGKAGNPDVMDGVHPANMIVGSCTEVVAGENKIIITAGGIDTHIHYICPQQAY
          *****

SPBR      EALASGVTTLLGGGTGPTAGTAATTCTPGAHYMKQMLQAVDTPVNLGITGKGNDSDPKA
SPSK      EALASGVTTLLGGGTGPTAGTAATTCTPGAHYIKQMLQAVDALPVNLGVTGKGNDSDPKA
          *****

SPBR      LREQVVAGACGLKLHEDWGSTPAAIDACLTVCELDVQCLIHDTLNEGSFVESTIAAFK
SPSK      LREQVVAGACGLKLHEDWGSTPAAIDACLTVCELDVQCLIHDTLNEGSFVESTIAAFK
          *****

SPBR      GRTIHTYHTEGAGGGHAPDIIISVVGESNVLPSSTNPNTRPYTVNTLDEHLDMLMVCHHLSK
SPSK      GRTIHTYHTEGAGGGHAPDIIISVVGESNVLPSSTNPNTRPYTVNTLDEHLDMLMVCHHLSK
          *****

SPBR      DIPEDIAFAESRIIRAETIAAEDVMHDLGAI SMLSSDSQAMGRCGEVVLRTWNTAHKNKVQ
SPSK      DIPEDIAFAESRIIRAETIAAEDVMHDLGAI SMLSSDSQAMGRCGEVVLRTWNTAHKNKVQ
          *****

SPBR      RGKLPEDKGT PADNFRAKRYVSKYTINPALAQGMAHLIGSIEVGKLADLVVWDPAWFGTK
SPSK      RGKLPEDKGT PADNFRAKRYVSKYTINPALAQGMAHLIGSIEVGKLADLVVWDPAWFGTK
          *****

SPBR      PTSVIKSGMIACAQMGPNASIPTVQPIIARPMFAPLVPATSVLFLVSEASIAQGVVQTYG
SPSK      PTSVIKSGMIACAQMGPNASIPTVQPIIARPMFAPLVPATSVLFLVSEASIAQGVVQTYG
          *****

SPBR      LRKRVEAVRGCRSVSKKDMRFNDATPAVQVDPEAYTVLADGVPCTAEPSELLPLSQQFFV
SPSK      LRKRVEAVRGCRSVSKKDMRFNDATPAVQVDPEAYTVLADGAPCTAEPSERLPLSQQFFV
          *****

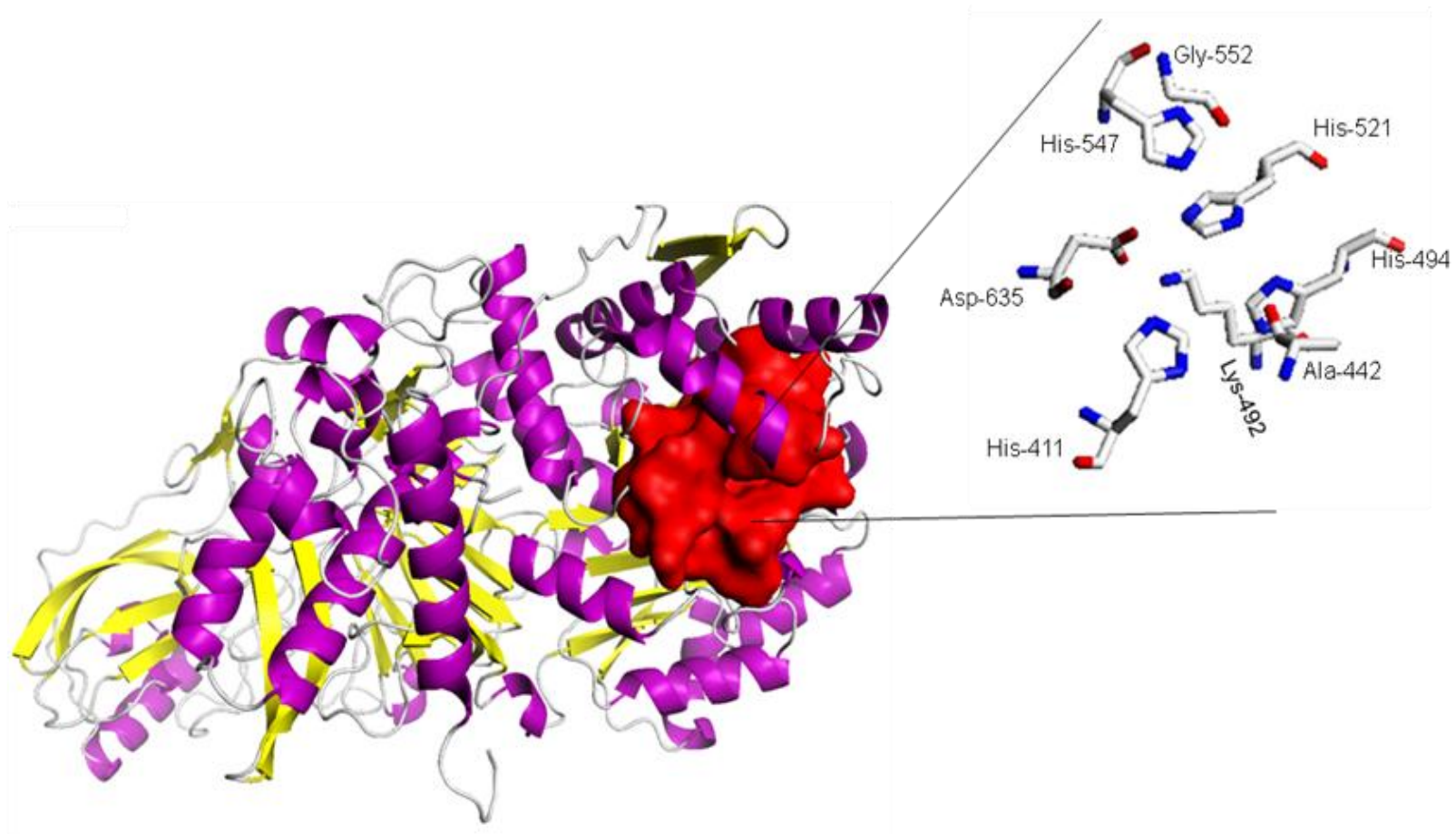
SPBR      Y
SPSK      Y
          *

```

**Figura 9:** Alinhamento entre as sequências de aminoácidos *Sporothrix brasiliensis* (SPBR) e *Sporothrix schenckii* (SPSK) com 98% de identidade (\*). Em destaque, a caixa cinza representa o centro ativo da urease, determinado a partir do ligante (ácido acetohidroxâmico) da uréase de *Bacillus pasteurii* (código PDB: 4ubp). Aminoácidos com cadeia físico-química e volume molecular muito parecidos representados por ( : ) e aminoácidos de menor similaridade quanto sua estrutura físico química e volume molecular foram representados por ( . )

## 5.7 MODELO TRIDIMENSIONAL DE UREASE DE *S. BRASILIENSIS*

O modelo tridimensional da SPBR revelou uma composição estrutural de 20 %  $\alpha$ -hélice, 17 %  $\beta$ -pregueada e 63 % alça (figura 10) e a identificação do sítio ativo revelou os aminoácidos que o compõem, a partir da possível ligação de hidrogênio (His-411, Ala-442, Lys-492, His-494, His-521, His-547, Gly-552, Asp-635), os mesmos aminoácidos observados nas ureases de *Klebsiella aerogenes*, *Helicobacter pylori*, *Canavalia ensiformis* e *Bacillus pasteurii* complexado com o ligante ácido acetohidroxâmico. O centro ativo da enzima foi ressaltado pela representação de superfície (vermelho), determinado a partir do ligante (ácido acetohidroxâmico) da urease de *Bacillus pasteurii* (código PDB: 4ubp). Os resíduos de aminoácidos representados em bastões seguem a padrão de cores cinza, vermelho e azul para os átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio, respectivamente. Esses aminoácidos atuam na coordenação dos íons e na catálise da ureia. (tabela 5).



**Figura 10:** Modelo computacional da urease demonstrando sua fenda catalítica que é formada de estruturas  $\alpha$ -hélice (magenta),  $\beta$ -pregueada (amarelo) e de alça (cinza). O centro ativo da enzima foi ressaltado pela representação de superfície (vermelho).

**Tabela 5:** Aminoácidos que formam o sítio catalítico de várias espécies produtoras de urease, *S. brasiliensis*, *Bacillus pasteurii* e *Helicobacter pylori*, bem como a planta *Canavalia ensiformes*. Os aminoácidos estão destacados por cores, sendo: Histidina em vermelho, Alanina em azul claro, Lisina em azul escuro, Glicina em verde e Asparagina em laranja. Aminoácido KCX equivale a Lisina carbamilada, porém em uma forma mais estável para cristalização.

	Espécies				
	<i>S. brasiliensis</i>	<i>B. pasteurii</i>	<i>H. pylori</i>	<i>K. aerogenis</i>	<i>C. ensiformis</i>
Aminoácidos	HIS-411	HIS-137	HIS-221	HIS-134	HIS-407
	ALA-442	KCX-220	ASP-362	KCX-217	KCX-490
	LSY-492	HIS-222	KCX-219	HIS-219	HIS-492
	HIS-494	HIS-249	ALA-365	HIS-246	HIS-519
	HIS-521	HIS-275	ALA-169	ASP-360	HIS-545
	HIS-547	ASP-363	HIS-248	ALA-363	ASP-633
	GLY-552	ALA-170	HIST-274	HIS-136	HIS-136
	ASP-635	GLY-280	GLY-279	ALA-167	ALA-167
			ALA-365	GLY-277	GLY-277
					GLY-550

## 6. DISCUSSÃO

Desde o fim do século passado vem sendo observada uma mudança nas áreas endêmicas de esporotricose, principalmente na América Latina, onde só no estado do Rio de Janeiro, Brasil, mais de 4.000 casos desta micose foram diagnosticados em humanos desde 1998 (Barros *et al.*, 2011) onde o fungo vem sendo transmitido aos humanos não pela forma clássica de contaminação desta doença, ou seja, através de plantas, madeira ou solo contaminado (Rippon, 1988), mas através da arranhadura, mordedura ou contato com gatos domésticos infectados por fungos do complexo *Sporothrix spp.* (Barros *et al.*, 2011). Esta forma de veiculação da doença tem acarretado em manifestações clínicas pouco comuns da esporotricose (Almeida-Paes *et al.*, 2014; Gutierrez-Galhardo *et al.*, 2010).

Na literatura descreve-se que o desenvolvimento da esporotricose zoonótica depende de uma série de fatores, tais como o tamanho do inóculo, *status* imunológico do hospedeiro, virulência da cepa de *Sporothrix* infectante, profundidade da inoculação traumática e termotolerância do fungo (Carlos *et al.*, 2009). Entretanto, até o presente poucos estudos foram realizados abordando esses aspectos (Alba-Fierro *et al.*, 2016; Almeida-Paes *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Por conta desses dados, os conhecimentos básicos acerca do complexo *Sporothrix*, causador desta micose, e da própria micose em si, se fazem necessários. Tendo este pensamento em vista, neste trabalho foram descritos alguns aspectos relacionados à expressão da urease, um possível fator de virulência, no principal fungo causador da esporotricose no Rio de Janeiro, *Sporothrix brasiliensis*.

Até o presente, a virulência dos isolados da área endêmica de esporotricose zoonótica não foi devidamente avaliada. Assim sendo, nosso grupo iniciou um estudo de determinados fatores de virulência nos isolados provenientes dessa área, numa tentativa de elucidar tantos aspectos ainda obscuros da patogenia da esporotricose no Rio de Janeiro (Almeida-Paes, 2012). Entre estes fatores a termotolerância, a melanização e a produção de algumas enzimas como protease e urease foram avaliadas (Almeida-Paes, 2012). Entretanto a expressão molecular e a caracterização do gene codificador destas enzimas não foram realizadas.

*S. brasiliensis* é um fungo produtor de urease e a expressão desta enzima nesta espécie é estatisticamente superior à de *S. schenckii*, espécie considerada menos virulenta (Almeida-Paes *et. al.*, 2015), sugerindo que alguns atributos moleculares, como a expressão de conhecidos fatores de virulência para patógenos humanos, entre estes a urease, possam ser os responsáveis pela maior patogenicidade de determinados fungos do complexo *Sporothrix*. Neste trabalho foi visto que a expressão de urease em meio de cultivo específico é isolado-dependente já que entre os isolados estudados, demonstramos alguns produtores de urease (CBS 120339, IPEC-18782A, IPEC-17608, IPEC-3419). Também foi demonstrado que o isolado de *S. brasiliensis* IPEC-654-H foi incapaz de produzir urease em meio de cultivo apropriado, assim como demonstrado no estudo realizado por Almeida-Paes e colaboradores (2015). Gosh e colaboradores (2002) demonstraram que 49 isolados estudados na Índia não são capazes de metabolizar ureia em sua forma leveduriforme, porém são capazes de metabolizar em sua forma filamentosa, encontrada na natureza. Apesar de não estar claramente elucidado, acredita-se que a não produção desta enzima esteja relacionado às



adaptações ambientais que algumas cepas tiveram ao longo do tempo, porém não perdendo a sua capacidade infectante (Gosh *et al.*, 2002), o que explicaria a razão de algumas das cepas/isolados provenientes da epidemia aqui do Rio de Janeiro não produzirem esta enzima, apesar de que a verificada neste estudo não produz nem em sua forma filamentosa nem na leveduriforme. No estudo onde novas espécies foram descritas como agente causador de esporotricose (Marimon *et al.*, 2007) também foi observado diferenças na produção de certos fatores de virulência como protease, DNase e a própria urease entre os fungos pertencentes ao complexo *Sporothrix spp.*. Entretanto Fernandes e colaboradores (2009) estudando 151 cepas brasileiras de *Sporothrix spp.* detectaram a atividade de urease em todas as cepas estudadas e Almeida-Paes e colaboradores (2015) em outro estudo envolvendo 71 outras cepas observaram que dentre elas, 3 cepas (uma de *S. brasiliensis* e outras duas de *S. schenckii*) não foram capazes de secretar urease em meio de cultivo apropriados, obtendo assim resultados mais próximos aos de Marimon e colaboradores (2007).

Também tem se sugerido que a distribuição geográfica dos isolados de *Sporothrix spp.* possa interferir com a capacidade de produzir ou não urease em meio de cultivo (Almeida-Paes *et al.*, 2015). No presente essa associação não pode ser demonstrada, já que poucos isolados e somente os da espécie de *S. brasiliensis* e provenientes de pacientes do Estado do Rio de Janeiro foram incluídos em nossas avaliações.

Até o presente, a caracterização molecular do gene codificador da urease no complexo *Sporothrix spp.* tem sido pouco abordada, e a expressão heteróloga ainda não realizada. Neste estudo, algumas abordagens moleculares foram realizadas, permitindo que estudos posteriores sejam realizados para a completa caracterização molecular e

funcional deste importante fator de virulência de microrganismo. Todos os isolados incluídos nesse estudo foram avaliados quanto à expressão molecular da enzima urease através da amplificação da sequência parcial do gene codificador para *SbURE* e posterior transcrição de seu cDNA. Para tanto, iniciadores foram desenhados utilizando como modelo a sequência nucleotídica de urease obtida de *S. schenckii* depositada no *European Nucleotides Archives* (ENA) sob o número ERS95967.1, uma vez que somente o genoma do mesmo estava anotado e disponível (Whole Genome Shotgun AXCR00000000.1 GenBank). A sequência parcial codificante para URE de *S. brasiliensis* (*SbURE*) foi obtida em todos os isolados que expressaram urease na prova fenotípica, inclusive no isolado IPEC-654-H, incapaz de expressar urease em meio de cultivo. Têm-se demonstrado que modificações nos padrões de expressão gênica podem ocorrer ao longo de sucessivas divisões mitóticas ou meióticas, não envolvendo alterações na sequência de bases do DNA, através de mecanismos epigenéticos envolvendo a ubiquitinação de histonas, provocando remodelação da cromatina, tornando-a mais acessível ou refratária a transcrição (Holliday, 2006). Possivelmente, alguns destes mecanismos ocorreram em isolados urease-negativo de *S. brasiliensis*, fenômeno já demonstrado no mecanismo de regulação da transcrição (*switching*) de tipos celulares brancos-opacos em *Candida albicans* (Zordan *et al.*, 2007), bem como o padrão da expressão gênica hereditária de DNA mitocondrial (mtDNA) de *Cryptococcus gatti* (Wang *et al.*, 2015).

A confirmação da identidade das sequências parciais codificantes para URE de *S. brasiliensis* foram confirmadas através do alinhamento e comparação com urease proveniente de *S. schenckii*, originando uma árvore filogenética onde foi observado dois

clados separados com valores de *bootstrap* 1000, respectivamente, indicando a confiabilidade na formação dos grupos. Estes resultados indicam o agrupamento das ureases de pelo menos duas espécies do complexo *Sporothrix spp.* baseada na classificação filogenética sugerindo que esta enzima evoluiu similarmente dentro das espécies do complexo, porém aparece, nesta porção, mais distante de ureases de outros fungos sugerindo que os fungos do complexo *Sporothrix* possam utilizar a urease de forma diferente que esses fungos, porém o gene completo da urease dos outros fungos do complexo precisam ser isolados para melhor comparação.

Posteriormente a estas análises, a sequência de aminoácidos de urease de *S. brasiliensis* (*SbURE*) proveniente da cepa 5110, foi disponibilizada na íntegra pelo GenBank (número de acesso KIH89566.1), favorecendo o alinhamento entre *SbURE* e *SsURE* (urease de *S. schenckii* cepa 1099-18 número de acesso KJ81787.1), onde foi verificado 98% de identidade entre ambas, nos permitindo realizar a modelagem molecular computacional desta enzima.

A técnica de modelagem molecular, que neste trabalho predisse a estrutura tridimensional da urease é muito usada na área de doenças infecciosas, como por exemplo, na pesquisa e descoberta de inibidores de hidrolases na infecção por *Leishmania donovani* (Reverbero, *et. al* 2008) e o uso dessas técnicas em pesquisas oncológicas onde Teschi e seus colaboradores (2015) usaram a técnica de modelagem molecular e conseguiram identificar inibidores de TBK1, uma quinase citosólica que está relacionada a migração e progressão de tumores, via sinalizações. Apesar de estudos com modelagem molecular serem relativamente novos, alguns já foram desenvolvidos em micologia, focando, geralmente em proteínas ou enzimas e outras diferentes

substâncias que possam ser considerados fatores de virulência. Guimarães e colaboradores (2008) demonstraram o modelo molecular do antígeno M de *Histoplasma capsulatum*, caracterizando-o como uma catalase e demonstrando um modelo estrutural hipotético da proteína como um tetrâmero, além da localização do sítio de assinatura, confirmando a natureza biológica da proteína M como catalase. Em 2014, Tyagi e colaboradores descreveram as medidas molares, medidas de susceptibilidade magnética, massa, assim como complexos geométricos de manganês e cobre e segundo essas previsões chegaram a conclusão que são ótimos ligantes de proteínas do gênero *Fusarium*. Já Vorapreeda e colaboradores em 2013 que estudaram com a utilização de técnicas de modelagem molecular o repertório de enzimas málicas em leveduras de fungos e sua função na produção de ácidos graxos e esteróis.

Com relação ao transporte de urease em microrganismos, é feito por proteínas acessórias e em espécies do gênero *Aspergillus*, há um estudo descrevendo a função de uma proteína reguladora, UreA, que auxilia no transporte da ureia. Com a previsão da estrutura dessa proteína auxiliar e o isolamento da sua sequência de aminoácidos, foi possível descrever também a estrutura funcional e o sítio catalítico. Com a obtenção dessas informações, foi possível estabelecer os resíduos que fazem parte nesse transporte, bem como estabelecer possíveis mutações e seu funcionamento nessas mutações (Sanguinetti, 2014).

Conforme foi demonstrado acima a urease é uma enzima importante para o metabolismo da ureia em vários seres vivos, desde bactérias, fungos e até mesmo plantas e em alguns desses microrganismos, além desse papel metabólico no ambiente, a urease também possui um papel importantíssimo de virulência, no qual a sua

expressão se faz necessária. No caso dos fungos do complexo *Sporothrix spp.*, sabe-se que produzem esta enzima em meio de cultivo apropriado e que nesse meio a produção é variável, contudo a sua expressão a nível molecular e em modelos *in vivo*, bem como seu papel funcional e cristalização da enzima ainda não foram estudados. Esses estudos se fazem necessários para que questões como diferença na expressão a nível molecular dos fungos do complexo, sobrevivência de modelos animais quando infectados com mutantes destes fungos com o gene codificador para urease silenciado e aspectos fisicoquímicos da enzima, que permanecem obscuros, porém neste estudo demos o primeiro passo para que estas questões sejam resolvidas, já que conseguimos, além de confirmar a identidade de urease através do modelo tridimensional da *SbURE* já que foi demonstrado o mesmo sítio catalítico da enzima que o observado em outras ureases, porém com algumas diferenças como a posição dos aminoácidos e suas quantidades o que pode refletir no modo que a ureia é metabolizada, bem como na velocidade, aspectos que ainda precisam ser explorados, bem como também isolar parcialmente o gene codificador para URE de *S. Brasiliensis*, que até o presente momento ainda não havia sido isolado. Outro importante aspecto, que precisa ser elucidado são as razões pela qual alguns isolados não são capazes de metabolizar ureia em meio de cultivo, já que possuem, como visto neste trabalho, cDNA detectável para codificação desta enzima.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ A expressão de urease *in vitro* é variável dentre os isolados de *Sporothrix brasiliensis*, fato que, auxilia na hipótese de a urease ser um fator de virulência para este fungo;
- ✓ A não produção de urease em meio de cultivo apropriado de certos isolados, pode estar relacionada com mecanismos pós transcricionais nos padrões de expressão gênica, já que foi detectada a presença do cDNA codificador para URE;
- ✓ As sequencias de aminoácidos da urease de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, possuem 98% de identidade e 99% de similaridade, logo a diferença no metabolismo da ureia por parte dessas duas espécies provavelmente está relacionado com as proteínas acessórias da urease;
- ✓ A modelagem molecular da urease de *S. brasiliensis* demonstrou que, o sítio catalítico dessa enzima neste fungo é formado pelos mesmos aminoácidos que em bactérias e plantas, demonstrando que o metabolismo da ureia é realizado de forma similar a outros microrganismos que utilizam essa enzima como fator de virulência;
- ✓ Outros testes *in vitro* e também *in vivo* se fazem necessários para um maior entendimento do papel funcional da urease neste fungo e verificar sua função enquanto fator de virulência, já que poucas informações estão disponíveis acerca do funcionamento desta enzima em fungos do complexo *Sporothrix spp.*.

## 8. PERSPECTIVAS

O isolamento parcial do gene, bem como a exposição de suas características físicas é o começo para outros estudos mais aprofundados acerca do papel da urease na patogênese e virulência desse fungo e em todos os outros do complexo, já que estudos como este, no complexo *Sporothrix* são escassos.

Como perspectivas futuras a clonagem deste gene, bem como a verificação de sua expressão frente às outras espécies do complexo, se faz necessárias para estabelecer a produção desta enzima como fator de virulência para este fungo. Como complementação destas técnicas, estabelecer nessas espécies o papel funcional da urease, bem como testes *in vivo*, possibilitando apontar essa enzima como fator de virulência para estas espécies de fungo, bem como o estudo de mecanismos epigenéticos para um melhor entendimento da não produção de urease *in vitro* por alguns isolados.

## 9. REFERÊNCIAS

Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, Toriello C, Pulido-Camarillo E, López-Romero E, Romo-Lozano Y, et al. Immune Response Induced by an Immunodominant 60 kDa Glycoprotein of the Cell Wall of *Sporothrix schenckii* in Two Mice Strains with Experimental Sporotrichosis. *J Immunol Res*. 2016;2016:6525831.

Almeida-Paes R, de Oliveira LC, Oliveira MM, Gutierrez-Galhardo MC, Nosanchuk JD, Zancoppe-Oliveira RM. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. *BioMed research international*. 2015;2015:212308.

Almeida-Paes R, de Oliveira MM, Freitas DF, do Valle AC, Zancoppe-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014 Sep;8(9):e3094.

Almeida-Paes R, Frases S, Araujo Gde S, de Oliveira MM, Gerfen GJ, Nosanchuk JD, et al. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the sporothrix complex in the presence of L-tyrosine. *Applied and environmental microbiology*. 2012 Dec;78(24):8623–30.

Almeida-Paes R, Frases S, Fialho Monteiro PC, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2009 Apr;11(5):554–62.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403–10.

Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Marine M, Gene J, et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2009 Jul;15(7):651–5.

Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical microbiology reviews*. 2011 Oct;24(4):633–54.

Barros MB, Schubach Ade O, do Valle AC, Gutierrez Galhardo MC, Conceicao-Silva F, Schubach TM, et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004 Feb 15;38(4):529–35.

Barros MBL, Schubach TM, Galhardo MC, de Oliviera Schubach A, Monteiro PC, Reis RS, et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001 Aug;96(6):777–9.



Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):235–42.

Bernardes-Engemann AR, Costa RC, Miguens BR, Penha CV, Neves E, Pereira BA, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. *Medical mycology.* 2005 Sep;43(6):487–93.

Bernardes-Engemann AR, de Lima Barros M, Zeitune T, Russi DC, Orofino-Costa R, Lopes-Bezerra LM. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. *Medical mycology.* 2015 Jan;53(1):28–33.

Brummer E, Stevens DA. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity with supernatants from antigen-stimulated immune spleen cell cultures. *Infection and immunity.* 1984 Aug;45(2):447–52.

Camacho E, Leon-Navarro I, Rodriguez-Brito S, Mendoza M, Nino-Vega GA. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. *BMC infectious diseases.* 2015;15:94.

Carlini CR, Ligabue-Braun R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology.* 2016 Feb;110:90–109.

Carlos IZ, Sassa MF, da Graca Sgarbi DB, Placeres MC, Maia DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2009 Jul;168(1):1–10.

Carmichael JW. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic hyphomycetes. *Canadian Journal of Botany.* 1962 Aug;40(8):1137–73.

Casadevall A. Amoeba provide insight into the origin of virulence in pathogenic fungi. *Advances in experimental medicine and biology.* 2012;710:1–10.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry.* 1987 Apr;162(1):156–9.

Christensen WB. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal of bacteriology.* 1946 Oct;52(4):461–6.

Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and immunity.* 2000 Feb;68(2):443–8.

Cruz D, Hygino LC. COMPLEXO *Sporothrix schenckii*. REVISÃO DE PARTE DA LITERATURA E CONSIDERAÇÕES SOBRE O DIAGNÓSTICO E A

EPIDEMIOLOGIA. Veterinária e Zootecnia. 2013 Mar 22;20(0):08–28.

Cunningham KM, Bulmer GS, Rhoades ER. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. The Journal of infectious diseases. 1979 Nov;140(5):815–7.

Cuomo CA, Rodriguez-Del Valle N, Perez-Sanchez L, Abouelleil A, Goldberg J, Young S, et al. Genome Sequence of the Pathogenic Fungus *Sporothrix schenckii* (ATCC 58251). Genome announcements [Internet]. 2014;2(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855299>

de Araujo ML, Rodrigues AM, Fernandes GF, de Camargo ZP, de Hoog GS. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. Mycoses. 2015 Aug;58(8):485–90.

de Macedo PM, Sztajn bok DC, Camargo ZP, Rodrigues AM, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, et al. Dacryocystitis due to *Sporothrix brasiliensis*: a case report of a successful clinical and serological outcome with low-dose potassium iodide treatment and oculoplastic surgery. The British journal of dermatology. 2015 Apr;172(4):1116–9.

de Meyer EM, de Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM, de Hoog GS, Vismer HF, et al. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. Mycologia. 2008 Jul;100(4):647–61.

de Oliveira MM, de Almeida-Paes R, de Medeiros Muniz M, de Lima Barros MB, Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: case report. Mycopathologia. 2010 May;169(5):359–63.

de Oliveira MM, Sampaio P, Almeida-Paes R, Pais C, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. Journal of clinical microbiology. 2012 Jun;50(6):2159–62.

Dias NM, Oliveira MM, Santos C, Zancoppe-Oliveira RM, Lima N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix Mexicana*, Portugal. Emerging infectious diseases. 2011 Oct;17(10):1975–6.

Dubreuil JD, Giudice GD, Rappuoli R. Helicobacter pylori interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2002 Dec;66(4):617–29, table of contents.

Eisenberg D, Lüthy R, Bowie JU. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. Meth Enzymol. 1997;277:396–404.

Estrada-Barcenas DA, Vite-Garin T, Navarro-Barranco H, de la Torre-Arciniega R, Perez-Mejia A, Rodriguez-Arellanes G, et al. Genetic diversity of *Histoplasma* and *Sporothrix* complexes based on sequences of their ITS1-5.8S-ITS2 regions from the

- BOLD System. *Revista iberoamericana de micologia*. 2014 Jan;31(1):90–4.
- Feder V, Kmetzsch L, Staats CC, Vidal-Figueiredo N, Ligabue-Braun R, Carlini CR, et al. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *The FEBS journal*. 2015 Apr;282(8):1406–18.
- Fernandes GF, dos Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E, de Camargo ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*. 2013 Apr 1;4(3):241–9.
- Fernandes MR de A. *Caracterização Molecular e Funcional da Urease de Paracoccidioides brasiliensis* [Internet] [Dissertação de Mestrado]. [Goiás]: Universidade Federal de Goiás; 2009 [cited 2016 Feb 18]. Available from: <http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/8447>
- Ferreira CP, Galhardo MCG, Valle ACF do. Cryosurgery as adjuvant therapy in cutaneous sporotrichosis. *Braz J Infect Dis*. 2011 Apr;15(2):181–3.
- Ferreira CP, do Valle AC, Freitas DF, Reis R, Galhardo MC. Pregnancy during a sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2012 Jun;117(3):294–5.
- Follmer C. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*. 2008 Jan;69(1):18–28.
- França TCC, Rocha M do RM, Reboredo BM, Rennó MN, Tinoco LW, Figueroa-Villar JD. Design of inhibitors for nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani* using molecular dynamics studies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2008;19(1):64–73.
- Francesconi G, Valle AC, Passos S, Reis R, Galhardo MC. Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Nov;23(11):1273–6.
- Freitas DFS. *Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos associados à esporotricose* [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz; 2014 [cited 2016 Feb 18].
- Freitas DF, de Siqueira Hoagland B, do Valle AC, Fraga BB, de Barros MB, de Oliveira Schubach A, et al. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Medical mycology*. 2012 Feb;50(2):170–8.
- Freitas DF, do Valle AC, de Almeida Paes R, Bastos FI, Galhardo MC. Zoonotic Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed.

Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010 Feb 1;50(3):453.

Freitas DF, Valle AC, da Silva MB, Campos DP, Lyra MR, de Souza RV, et al. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS neglected tropical diseases. 2014 Aug;8(8):e3110.

Geisa Ferreira Fernandes PO dos S. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* Isolates from 5 Different Geographic Regions of Brazil: A Forgotten and Re-Emergent Pathogen. The Open Mycology Journal. 2009;3(1):48–58.

Ghosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. Mycoses. 2002 Dec;45(11-12):449–54.

Ghosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. Mycoses. 2002 Dec 1;45(11-12):449–54.

Govender NP, Maphanga TG, Zulu TG, Patel J, Walaza S, Jacobs C, et al. An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. PLoS neglected tropical diseases. 2015 Sep;9(9):e0004096.

Gremiao ID, Menezes RC, Schubach TM, Figueiredo AB, Cavalcanti MC, Pereira SA. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. Medical mycology. 2015 Jan;53(1):15–21.

Guarro J, GeneJ, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clinical microbiology reviews. 1999 Jul;12(3):454–500.

Guimarães AJ, Hamilton AJ, de M Guedes HL, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. PLoS ONE. 2008;3(10):e3449.

Gutierrez-Galhardo MC, do Valle ACF, Fraga BLB, Schubach AO, Hoagland BR de S, Monteiro PCF, et al. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. Mycoses. 2010 Jan;53(1):78–80.

Haddad VJ, Miot HA, Bartoli LD, Cardoso Ade C, de Camargo RM. Localized lymphatic sporotrichosis after fish-induced injury (*Tilapia* sp.). Medical mycology. 2002 Aug;40(4):425–7.

Hektoen L, Perkins CF. Refractory Subcutaneous Abscesses Caused by *Sporothrix Schenckii*. A New Pathogenic Fungus. The Journal of experimental medicine. 1900 Oct 1;5(1):77–89.

Hektoen L. A New Pathogenic Fungus-the *Sporothrix* of Schenck. Journal Boston Society of Medical Sciences. 1900 Mar 20;4(7):179.

- Hiruma M, Kano R, Sugita T, Mochizuki T, Hasegawa A, Hiruma M. Urease gene of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii*. *The Journal of dermatology*. 2013 Feb;40(2):111–3.
- Hiruma M, Katoh T, Yamamoto I, Kagawa S. Local hyperthermia in the treatment of sporotrichosis. *Mykosen*. 1987 Jul;30(7):315–21.
- Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006 Jun;1(2):76–80.
- Hoog GS de, Guarro J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. 2 edition. Utrecht: ASM Press; 2001. 1160 p.
- Kane J, Fischer JB. The differentiation of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by use of Christensen's urea broth. *Canadian journal of microbiology*. 1971 Jul;17(7):911–3.
- Kano R, Anzawa K, Mochizuki T, Nishimoto K, Hiruma M, Kamata H, et al. *Sporothrix schenckii* (sensu strict *S. globosa*) mating type 1-2 (MAT1-2) gene. *The Journal of dermatology*. 2013 Sep;40(9):726–30.
- Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG, Infectious Diseases Society of A. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007 Nov 15;45(10):1255–65.
- Kenyon EM, Russell LH, McMurray DN. Isolation of *Sporothrix schenckii* from potting soil. *Mycopathologia*. 1984 Aug 30;87(1-2):128.
- Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen HD. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006 Nov;12(11):1077–81.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Lea & Febiger; 1992. 894 p.
- Lacaz C da S. *Guia para identificação: fungos actinomicetos algas de interesse médico*. Sarvier; 2002. 445 p.
- Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. ASM Press; 2011. 485 p.
- Liu TT, Zhang K, Zhou X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2014 Jan;15(1):100–8.
- Lutz A, Splendore A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. *Rev. Med. São Paulo*. 1907; 21:433-450.

- Macedo PM, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, Orofino-Costa R. New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* : JEADV. 2015 Apr;29(4):719–24.
- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Stahl DA, Buckley DH, Brock T, editors. *Microbial Growth and Control*. In: *Brock Biology of Microorganisms*, Books a la Carte Edition. 14th ed. Pearson College Division; 2014.
- Madrid H, Cano J, Gene J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Revista iberoamericana de micologia*. 2009 Sep 30;26(3):218–22.
- Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *Journal of clinical microbiology*. 2007 Oct;45(10):3198–206.
- Marimon R, Gene J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Medical mycology*. 2008 Sep;46(6):621–5.
- Marimon R, Gene J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazera M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Sep;44(9):3251–6.
- Martínez-Álvarez JA, Pérez-García LA, Flores-Carreón A, Mora-Montes HM. The immune response against *Candida* spp. and *Sporothrix schenckii*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2014 Jan;31(1):62–6.
- Migaki G, Font RL, Kaplan W, Asper ED. Sporotrichosis in a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *American journal of veterinary research*. 1978 Dec;39(12):1916–9.
- Miller SD, Keeling JH. Ant sting sporotrichosis. *Cutis*. 2002 Jun;69(6):439–42.
- Mirbod-Donovan F, Schaller R, Hung CY, Xue J, Reichard U, Cole GT. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. *Infection and immunity*. 2006 Jan;74(1):504–15.
- Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological reviews*. 1995 Sep;59(3):451–80.
- Moreira JA, Freitas DF, Lamas CC. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. *Infection*. 2015 Jun;43(3):267–76.
- Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Phenotypic and Molecular Identification of *Sporothrix* Isolates from an Epidemic Area of Sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*. 2011 Jun 24;172(4):257–

67.

Oliveira MM, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Revista iberoamericana de micologia*. 2014 Jan;31(1):2–6.

Oliveira MM, Franco-Duarte R, Romeo O, Pais C, Criseo G, Sampaio P, et al. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. *FEMS microbiology letters* [Internet]. 2015 Mar;362(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714550>

Oliveira MM, Santos C, Sampaio P, Romeo O, Almeida-Paes R, Pais C, et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Research in microbiology*. 2015 Feb;166(2):102–10.

Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American journal of pathology*. 2004 May;164(5):1761–71.

Paes R de A. Fatores de virulência e antígenos de *Sporothrix* spp. relacionados à epidemia de esporotricose no estado do Rio de Janeiro [Internet]. Instituto Oswaldo Cruz; 2012 [cited 2016 Feb 18].

Paixao AG, Galhardo MC, Almeida-Paes R, Nunes EP, Goncalves ML, Chequer GL, et al. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. *AIDS research and therapy*. 2015;12:16.

Pereira SA, Gremiao ID, Kitada AA, Boechat JS, Viana PG, Schubach TM. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014 May;47(3):392–3.

Pereira SA, Menezes RC, Gremiao ID, Silva JN, Honse Cde O, Figueiredo FB, et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *Journal of feline medicine and surgery*. 2011 Apr;13(4):220–3.

Pereira SA, Passos SR, Silva JN, Gremiao ID, Figueiredo FB, Teixeira JL, et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *The Veterinary record*. 2010 Mar 6;166(10):290–4.

Quintal D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. *Journal of cutaneous medicine and surgery*. 2000 Jan;4(1):51–4.

Quintella LP, Passos SR, do Vale AC, Galhardo MC, Barros MB, Cuzzi T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *Journal of cutaneous pathology*. 2011 Jan;38(1):25–32.

- Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clinics in dermatology*. 2007 Mar;25(2):181–7.
- Rappleye CA, Goldman WE. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annual review of microbiology*. 2006;60:281–303.
- Reis EG, Gremiao ID, Kitada AA, Rocha RF, Castro VS, Barros MB, et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. *Journal of feline medicine and surgery*. 2012 Jun;14(6):399–404.
- Reverberi M, Zjalic S, Ricelli A, Punelli F, Camera E, Fabbri C, et al. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene. *Eukaryotic Cell*. 2008 Jun;7(6):988–1000.
- Richters A, Basu D, Engel J, Ercanoglu MS, Balke-Want H, Tesch R, et al. Identification and further development of potent TBK1 inhibitors. *ACS Chem Biol*. 2015 Jan 16;10(1):289–98.
- Richters A, Basu D, Engel J, Ercanoglu MS, Balke-Want H, Tesch R, et al. Identification and further development of potent TBK1 inhibitors. *ACS Chem Biol*. 2015 Jan 16;10(1):289–98.
- Rippon JW. Sporotrichosis. In: *Medical Mycology*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1988. p.325-352.
- Rocha AA, Malavazi I, Goldman GH, Puccia R. Transcription regulation of the *Pbpg43* gene by nitrogen in the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2009 Jan;46(1):85–93.
- Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal biology*. 2016 Feb;120(2):246–64.
- Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014 Apr;78(4):383–7.
- Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Medical mycology*. 2013 May;51(4):405–12.
- Romeo O, Criseo G. What lies beyond genetic diversity in *Sporothrix schenckii* species complex?: New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in *S. schenckii sensu stricto* isolates. *Virulence*. 2013 Apr 1;4(3):203–6.
- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993 Dec 5;234(3):779–815.



Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of clinical microbiology*. 1995 Nov;33(11):2913–9.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977 Dec;74(12):5463–7.

Sanguinetti M, Amillis S, Pantano S, Scazzocchio C, Ramón A. Modelling and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* UreA, a member of the subfamily of urea/H<sup>+</sup> transporters in fungi and plants. *Open Biol*. 2014 Jun;4(6):140070.

Saravanakumar PS, Eslami P, Zar FA. Lymphocutaneous sporotrichosis associated with a squirrel bite: case report and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996 Sep;23(3):647–8.

Sasaki AA, Fernandes GF, Rodrigues AM, Lima FM, Marini MM, Dos S Feitosa L, et al. Chromosomal polymorphism in the *Sporothrix schenckii* complex. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86819.

Schenck BR. On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Bull John Hoppikins Hosp*. 1898;9:286–90.

Sigler L, Harris JL, Dixon DM, Flis AL, Salkin IF, Kemna M, et al. Microbiology and potential virulence of *Sporothrix cyanescens*, a fungus rarely isolated from blood and skin. *Journal of clinical microbiology*. 1990 May;28(5):1009–15.

Silva MBT da, Costa MM de M, Torres CC da S, Galhardo MCG, Valle ACF do, Magalhães M de AFM, et al. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2012 Oct;28(10):1867–80.

Silveira CP, Torres-Rodriguez JM, Alvarado-Ramirez E, Murciano-Gonzalo F, Dolande M, Panizo M, et al. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. *Journal of medical microbiology*. 2009 Dec;58(Pt 12):1607–10.

Simoni RD, Hill RH, Vaughan M. Urease, the first crystalline enzyme and the proof that enzymes are proteins: the work of James B. Sumner. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Aug 30;277(35):23e.

Singer JI, Muncie JE. Sporotrichosis; etiologic considerations and report of additional cases from New York. *New York state journal of medicine*. 1952 Sep 1;52(17:1):2147–53.

Söding J, Biegert A, Lupas AN. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W244–8.

Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3478–88.

St-Germain G, Summerbell R. *Identifying Filamentous Fungi: A Clinical Laboratory Handbook*. 1 edition. Belmont, Calif.: Star Pub Co; 1996. 314 p.

Tapia Noriega C, Rivera Garay R, Sabanero G, Trejo Basurto R, Sabanero Lopez M. [*Sporothrix schenckii*: cultures in different soils]. *Revista latinoamericana de microbiologia*. 1993 Apr;35(2):191–4.

Teixeira MM, de Almeida LG, Kubitschek-Barreira P, Alves FL, Kioshima ES, Abadio AK, et al. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC genomics*. 2014;15:943.

Tyagi M, Chandra S, Tyagi P. Mn(II) and Cu(II) complexes of a bidentate Schiff's base ligand: spectral, thermal, molecular modelling and mycological studies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2014 Jan 3;117:1–8.

Vorapreeda T, Thammarongtham C, Cheevadhanarak S, Laoteng K. Repertoire of malic enzymes in yeast and fungi: insight into their evolutionary functional and structural significance. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2013 Dec;159(Pt 12):2548–57.

Wang Z, Wilson A, Xu J. Mitochondrial DNA inheritance in the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *Fungal Genet Biol*. 2015 Feb;75:1–10.

Wanke B, Schubach AO, Schubach TMP, Barros MBL. Esporotricose. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias - 2 Volumes*. Edição: 2. Guanabara Koogan; 2013. p. 1161–9.

Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *Journal of clinical microbiology*. 1993 Feb;31(2):463–4.

Yu JJ, Smithson SL, Thomas PW, Kirkland TN, Cole GT. Isolation and characterization of the urease gene (URE) from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Gene*. 1997 Oct 1;198(1-2):387–91.

Zancopé-Oliveira RM, de R, de Oliveira MME, Saraiva Freitas DF, Gutierrez Galhardo MC. New Diagnostic Applications in Sporotrichosis. In: Khopkar U, editor. *Skin Biopsy - Perspectives* [Internet]. InTech; 2011 [cited 2016 Feb 18]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/skin-biopsy-perspectives/new-diagnostic-applications-in-sporotrichosis>

Zhao M, Zhou X, Liu T, Yang Z. Morphological and physiological comparison of taxa

comprising the *Sporothrix schenckii* complex. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015 Nov;16(11):940–7.

Zordan RE, Miller MG, Galgoczy DJ, Tuch BB, Johnson AD. Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol*. 2007 Oct;5(10):e256.

## APÊNCICE A

### TERMO DE COMPROMISSO

**INSTITUIÇÃO:** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (INI) – Fiocruz

**COORDENADOR DA PESQUISA:** Rosely Maria Zancopé Oliveira, Pesquisador Titular do INI-FIOCRUZ

**EXECUTOR DO PROJETO:** Luã Cardoso de Oliveira, Biólogo, aluno do curso de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do INI-FIOCRUZ

**ENDEREÇO:** Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – Rio de Janeiro – CEP 21045-900 Tel.: (0xx21) 3865-9557 Fax (0xx21) 3865-9557 , e-mail:rosely.zancope@INI.fiocruz.br

**TÍTULO DO PROJETO:** **Caracterização molecular do gene urease (URE) de *Sporothrix brasiliensis***

Esporotricose é uma doença causada pelos fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, que compreendem os fungos *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriei* e *S. albicans*. Tem se observado a maior e mais duradoura epidemia de esporotricose transmitida por arranhadura ou mordedura de felinos no estado do Rio de Janeiro com mais de 4000 casos diagnosticados desde 1998 até o presente, sendo *S. brasiliensis* o principal fungo do complexo a ser isolado nesta epidemia. Como diagnóstico, o padrão-ouro utilizado é o cultivo do fungo em meio de cultura e a sua identificação por microscopia. Como método de diagnóstico auxiliar existe a detecção de anticorpos anti-*Sporothrix* pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Amplo espectro clínico é observado em pacientes provenientes desta epidemia, e sabe-se que estes podem estar associados com o modo como o fungo é adquirido, o tamanho de seu inóculo, o estado imunológico do paciente e a virulência da cepa. Portanto, não se pode descartar que a virulência de certos isolados de *S. brasiliensis* possam também gerar

formas mais graves da doença. Em face da vasta gama de defesas imunológicas, fungos dimórficos são bem efetivos no estabelecimento de infecção, delineando assim a necessidade de um entendimento maior dos mecanismos da patogênese e dos seus fatores de virulência. Embora se tenha demonstrado em meios de cultura apropriados que espécies clínicas do complexo *Sporothrix* produzem urease, até o presente o gene codificador da urease neste complexo ainda não foi isolado e caracterizado, e consequentemente seu papel como fator de virulência permanece desconhecido. Conhecer mais sobre a biologia do fungo e seus mecanismos para gerar e manter a infecção é de grande importância para que outras formas, mais eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento possam ser desenvolvidas. Assim, o objetivo geral deste trabalho será a caracterização molecular do gene codificante para urease de *S. brasiliensis* (SbURE). Para tanto, a cepa-tipo de *S. brasiliensis* (CBS 120339) e produtora de urease, será utilizada para isolamento e identificação do gene codificador da urease. Após a caracterização do gene outras cinco cepas provenientes de diferentes formas clínicas da esporotricose, bem como uma cepa urease negativa (*S. brasiliensis* INI 22493-1) serão incluídas no estudo, para a observação do nível de expressão deste gene. Todas as cepas serão submetidas à análise fenotípica para verificação da produção de urease em meio de cultura e posteriormente “iniciadores” degenerados serão desenhados a partir da análise por métodos computacionais de seqüências de diferentes genes *URE* de fungos patogênicos produtores de urease depositadas no GenBank e o isolamento do gene *SbURE* será realizado através de clonagem e verificação de sua expressão por RT-PCR. Este trabalho poderá ser o ponto de partida para posteriores trabalhos como, identificar a urease como um importante fator de virulência neste fungo, entender e relacionar a relação parasita-hospedeiro e mecanismo de ação desta enzima no fungo. Todas as cepas de *S. brasiliensis* que serão utilizadas no trabalho estão armazenadas nos setores de Diagnóstico Micológico e Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, a autorização para as cepas serem usadas foram concedidas tanto pelas chefias dos setores quanto pela chefia do Laboratório de Micologia, as chefias ficam responsáveis também pela guarda das cepas, podendo estas serem usadas em projetos posteriores.

Pelo presente documento, os pesquisadores comprometem-se a não revelar a identidade dos pacientes em qualquer publicação resultante deste estudo, protegendo sua confidencialidade de acordo com as leis e regulamentações locais.

Rio de Janeiro, .... de ..... 2014

---

Luã Cardoso de Oliveira

---

Rosely Maria Zancopé Oliveira