

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

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

LUÃ CARDOSO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DA ENZIMA UREASE
(URE) DE *Sporothrix brasiliensis***

Rio de Janeiro
Junho 2020

LUÃ CARDOSO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DA ENZIMA UREASE (URE) DE
*Sporothrix brasiliensis***

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-Graduação Strictu-sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em ciências

Orientadores: Dra Rosely Maria Zancopé Oliveira e Dr Carlos Roberto Alves

Rio de Janeiro
Junho 2020

LUÃ CARDOSO DE OLIVEIRA

**Caracterização molecular e funcional da enzima urease (URE) de
*Sporothrix brasiliensis***

Tese apresentada ao Curso de Pós-
graduação do Instituto
Nacional de Infectologia Evandro
Chagas para obtenção do grau de
Doutor em Pesquisa Clínica em Ciências

Orientadores: Prof^a Dra Rosely Maria Zancopé Oliveira
Prof Dr Carlos Roberto Alves

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra Maria Clara Gutierrez Galhardo (Presidente)

Prof Dr Rodrigo de Almeida Paes

Prof Dr Marcos de Abreu Almeida

Prof Dr Franklin Souza da Silva

Prof^a Dra Célia Maria de Almeida Soares

Prof^a Dra Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho (Revisora e Suplente)

Dedico esta Tese a Ciência, que tanto me completa. Em tempos sombrios que estamos vivendo, espero na fé de um cientista com seu termociclador que este trabalho ajude as pessoas a ver a ciência de um modo puro e libertador, como eu a vejo em meu coração

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, Jorge Luiz, Maria Amélia, Mariana Cardoso, 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 esposa 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 vestida de anjo, e está sempre do nosso lado, independente do que aconteça, para dar suporte emocional, profissional, amoroso. Tenha certeza que sem você esse trabalho não teria sido realizado, você é meu porto seguro. Muito Obrigado por ser o anjo na minha vida que eu não fazia ideia do tanto que precisava.

Às minhas filhas Polly (velhinha ranzinza) e Diana (Selvagem), Mel (Bruta) e ao meu filho Radar (maluquinho), pelo amor incondicional que sempre me dão, sempre me recebendo com um sorriso mais que sincero na boca (as vezes com fome, as vezes com um brinquedo, mas sempre sincero). Papai ama muito vocês.

Aos meus sogrões, Celina e João Carlos, Adriana, digo, Majestade, Dona Ester, Letícia, Rafael e Gabriel que tanto me apoiam e torcem por mim. Sempre com uma ótima convivência e, obviamente, aquela pizza de sexta feira a noite depois de uma semana difícil. Me sinto muito grato pelo acolhimento que recebi de cada um de vocês.

À Profa. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela orientação a mim dedicada, pelo apoio incondicional ao meu trabalho, pelo reconhecimento de minhas capacidades, pela oportunidade de realizar uma Tese de Doutorado quando menos achei que fosse conseguir e claro pelos puxões de orelha, e olha que não foram poucos. Sinto uma gratidão enorme aos dois. Muito Obrigado.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Alves, por ter acreditado no projeto e aberto as portas não só do laboratório, mas do seu cérebro, tenha certeza que eu cresci muito trabalhando com o Sr. Muito obrigado por acreditar que tudo isso possível. Muito Obrigado.

Ao amigo Prof. Dr Franklin Souza da Silva, pelos ensinamentos, paciência e puxões de orelha e foram muitos, aprendi muito nas tardes e noites que a gente passava no laboratório trabalhando e se divertindo. Sempre que alguém tiver de “tiruliru” pode contar que vou lembrar de você. Muito obrigado.

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 essa jornada não teria sido a mesma.

Aos amigos professores do Colégio Futuro Vip, principalmente Luís (velho), Rafael, Priscila, Matheus e Flavinha, são vocês quem tornam minha semana mais agradável, que sempre dão força e torcem por mim. Muito obrigado.

Aos amigos Carol, Bruno (Pancinha), Vinicius (Sono) e Ana, por terem torcido sempre por mim, por acreditarem que tudo que eu estava fazendo ia gerar frutos, mesmo quando nem eu acreditava em mim mesmo. Amo muito vocês, saibam que parte desse trabalho é de vocês, assim como parte do meu coração e só digo uma coisa, panela só é ruim para quem está fora.

Ao Dr. Otávio de Melo Espíndola e todo o laboratório de Neuroinfecções 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, quando ouço que ninguém faz um trabalho sozinho, sempre penso em vocês. 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 Laboratório de Micologia, setor de Diagnóstico Micológico: Maria Helena Galdino (Linda Revisora), Fábio Britto, Rowena Alves, Rodrigo Paes, Ingrid Ludmila Rodrigues, Juliana Nahal, Aninha e Iara pelas sempre agradáveis horas de café e almoço, pelo suporte indispensável com algumas atividades do projeto, desde preparo de meios de cultura a identificações.

Aos amigos Priscila Marques de Macedo e Dayvison Francis 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 (Chá para ela) no Outback. Muito Obrigado.

Aos Amigos do Laboratório de Biomarcadores Paulinha, Bielzão, Pri e Raquel por cada ajuda, risada, bronca e café no Starbucks que tivemos. Muito Obrigado

Aos sempre amigos e companheiros de laboratório, Mauro de Medeiros Muniz, Claudia Vera Pizzini, Marcos de Abreu Almeida, Leonardo Barbedo, Vanessa Brito, Dra Engemann, Camilão e Rosangela Alves 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.

À Beatriz da Silva Motta, aluna de Iniciação Científica, uma farmacêutica incrível, que me ajudou muito nessa jornada, agradeço pelas conversas ao pé do *bead beater*, pelos sofrimentos de trânsito indo a real engenho. Escuta, obrigado por tudo, uma parte desse trabalho é sua!

Ao irmão mais velho que só conheci depois dos meus 20 anos, Fernando Almeida da Silva, muito obrigado por estar comigo nas minhas horas de sorriso e piadas, mas principalmente, quando eu precisava de um ombro pra chorar, você é uma das melhores

pessoas que eu conheço e pode ter certeza que uma parte muito grande desse trabalho tem seu nome.

As irmãs Procópio (arrumei um jeito de não citar nenhuma primeiro), por toda a convivência e por torcer sempre por mim, saiba as duas que têm um lugar cativo no meu coração, conhecer vocês foi uma das maiores alegrias desse curso. Muito obrigado por poder chamar vocês de amigas e irmãs. Amo muito as duas

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.

A Belindona, sabe quando um anjo bate a sua porta para trazer coisas boas e especiais? Então. Quando fui ao setor de zoonose pedir ajuda com a minha gatinha, eu conheci esse anjo. Belindona, muito obrigado pelas conversas, amizade, abraço fagocítico e tudo de melhor que você trouxe a minha vida. Te amo viu!

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, pela oportunidade fornecida aos alunos do um curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas. Ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas, sua coordenadora Dra Claudia Vallete e todos seus componentes.

Às amigas Priscila, por toda ajuda, conselho e boa vontade em todo o tempo de Fiocruz que eu tenho.

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 diretamente, contribuíram com este trabalho.

*One of the great challenges in this world is knowing enough about a subject to **think** you're right but not enough about this subject to **know** you're wrong.*

Neil deGrasse Tyson

OLIVEIRA, L. C. **Caracterização molecular e funcional da enzima urease (URE) de *Sporothrix brasiliensis***. 2020. 109 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2020.

RESUMO

No Rio de Janeiro observa-se uma hiperendemia de esporotricose, causada principalmente por *Sporothrix brasiliensis*. Espécies clínicas de *S. brasiliensis*, produzem urease, porém pouco se avançou no conhecimento desta. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a urease, verificar a expressão de seu gene e começar a entender seu possível papel na virulência. Foram utilizadas 2 cepas de *S. brasiliensis*, uma delas considerada produtora de urease e outra considerada não produtora de urease. Fenotipicamente, foi observado que apenas a cepa considerada urease positiva foi capaz de crescer em meio de cultivo cujo a ureia era a única fonte de nitrogênio, e quando esta foi cultivada em meio com inibidor tioureia apresentou pouco crescimento. Após, o extrato proteico foi submetido a ressonância plasmônica de superfície (SPR) e *western blot* para caracterizar a enzima bioquimicamente. A expressão gênica da urease foi verificada por qPCR e a comparação, *in silico*, entre a urease de *S. brasiliensis*, a de outros 20 fungos e de *Canavalia ensiformis*. A técnica de *western blot* não demonstrou reatividade na cepa negativa, já na SPR esta foi evidenciada nas duas cepas. A partir disto, foram realizadas reações de qPCR para verificar a expressão gênica do gene codificador da urease nas duas cepas, e em ambas o RNA mensageiro para urease está presente. Foi comparada, através de ferramentas de bioinformática, as sequências de urease de 21 fungos e de *C. ensiformis*, e a urease se mostrou uma enzima bem conservada entre as espécies analisadas, e parece ser, corroborando com os achados *in vitro* uma enzima que se localiza no citoplasma celular. Os achados nesta tese, indicam que a urease provavelmente é um gene constitutivo neste modelo fúngico, e muito importante para o crescimento celular do *S. brasiliensis*, pois em condições inibitórias da enzima o fungo foi incapaz de crescer normalmente. Esses dados, juntamente com a demonstração da alta preservação desta enzima nos fungos, sugerem que a urease é importante para a fisiologia do *S. brasiliensis* em parasitismo.

Palavras-Chave: *Sporothrix brasiliensis*, urease, caracterização bioquímica

OLIVEIRA, LC. **Molecular and functional characterization of the urease enzyme (URE) of *Sporothrix brasiliensis***. 2020. 109 p. Thesis (Doctorate in Clinical Research in Infectious Diseases) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2020.

ABSTRACT

In Rio de Janeiro there is a hyperendemia of sporotrichosis, caused mainly by *Sporothrix brasiliensis*. Clinical species of *S. brasiliensis*, produce urease, but slight progress has been made in its field. The aim of this work was to characterize urease, to verify the expression of its gene and begin to understand its possible role in virulence. Two strains of *S. brasiliensis* were used, one of them considered a producer of urease and the other considered non-producer of urease. Phenotypically, it was observed that only the strain considered urease positive was able to grow in a culture medium which urea was the only source of nitrogen, and when it was cultivated in a medium with a thiourea inhibitor it showed little growth. Afterwards, the protein extract was submitted to surface plasmon resonance (SPR) and western blot to characterize the enzyme biochemically. The urease gene expression was verified by qPCR and the comparison, *in silico*, between the urease of *S. brasiliensis*, that of other 20 fungi and of *Canavalia ensiformis*. The western blot technique showed no reactivity in the negative strain, whereas in SPR it was found in both strains. From this, qPCR reactions were performed to check the gene expression of the urease encoding gene in both strains, and in both the messenger RNA for urease is present. The urease sequences of 21 fungi and *C. ensiformis* were compared using bioinformatics tools, and urease proved to be a well-preserved enzyme among the analyzed species, and it appears to be, corroborating with the *in vitro* findings an enzyme that locates in the cell cytoplasm. The findings in this thesis indicate that urease is probably a constitutive gene in this fungal model, and very important for the cellular growth of *S. brasiliensis*, because under enzyme inhibitory conditions the fungus was unable to grow normally. These data, together with the demonstration of the high preservation of this enzyme in fungi, suggest that urease is important for the physiology of *S. brasiliensis* in parasitism.

Key Words: *Sporothrix brasiliensis*, urease, biochemical characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Macromorfologia e Micromorfologia de *Sporothrix brasiliensis*.

Figura 2: Cadeia epidemiológica da esporotricose observada no estado do Rio de Janeiro.

Figura 3: Reação de decomposição da ureia pela enzima urease.

Figura 4: Fluxograma demonstrativo de como foi proposto o crescimento fúngico.

Figura 5: Representação das cepas de *C. albicans* e *C. neoformans* (controles) e de *S. brasiliensis* em meio de cultura líquido de Christensen para avaliar produção de urease.

Figura 6: Curvas de crescimento das cepas *Sporothrix brasiliensis* IPEC-45308 (A) e IPEC-34910 (B).

Figura 7: Curvas de crescimento da cepa de *Sporothrix brasiliensis* IPEC-34910.

Figura 8: *Western blot* do extrato total das cepas do estudo e da urease comercial e purificada de *C. ensiformis*.

Figura 9: Análise dos homólogos da urease de *Sporothrix brasiliensis* por ressonância plasmônica de superfície.

Figura 10: Reações da PCR quantitativa em tempo real com as cepas do estudo.

Figura 11: Árvore filogenética das ureases de fungos patogênicos e não patogênicos e de *C. ensiformis*.

Figura 12: Previsão da localização subcelular da urease de *Sporothrix brasiliensis*.

Figura 13: Previsão da localização subcelular de proteínas *Sporothrix brasiliensis*.

Figura 14: Previsão da localização subcelular da urease de *Canavalia ensiformis*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela do conjunto dos iniciadores usados na reação qPCR.

Tabela 2: Análise quantitativa da detecção de urease de *Sporothrix brasiliensis* por reatividade cruzada com anticorpo policlonal anti-urease.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Aids – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- BHI – *Brain Heart Infusion* – Infusão Cérebro Coração
- Cal – Gene da Calmodulina
- cDNA – *Complementary Desoxiribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico Complementar
- DAB - Diaminobenzidina
- DNA – *Desoxiribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico
- DO – Densidade Ótica
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- EF1A – *Elongation Factor 1 A* – Fator de Elongação 1 A
- ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático
- EUA - Estados Unidos da América
- Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
- HE – Hematoxilina e Eosina
- HIV – *Human Immunodeficiency Virus* – Vírus da Imunodeficiência Humana
- IgG – Imunoglobulina G
- INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- KDa – Kilo Dalton
- LAPCLIN-DERMOZOO/INI-FIOCRUZ - Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
- MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* – Análise Genética de Evolução Molecular
- mRNA – *messenger Ribonucleic Acid* – Ácido Ribonucleico mensageiro
- NCBI – *National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
- NETs - *neutrophil extracellular traps* – Armadilha Extracelular de Neutrófilo
- PBS - *Phosphate Buffered Saline* – Salina tamponada com fosfato
- PBST - PBS - *Phosphate Buffered Saline Tween* – Salina tamponada com fosfato acrescido de Tween

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

PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* – Reação em Cadeia da Polimerase para análise do polimorfismo de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição

PI – Ponto Isoelétrico

qPCR – *Quantitative Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

R2 – Coeficiente de Determinação

RNA – Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico

rRNA – *Ribosomal Ribonucleic Acid* – Ácido Ribonucleico Ribossomal

RU – *Resonance Unit* – Unidade de Ressonância

RUd – *Resonance Unit Dissociation* – Unidade de Ressonância da fase de dissociação

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* – Gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato

SNC – Sistema Nervoso Central

SPR – *Surface Plasmon Resonance* – Ressonância Plasmônica de Superfície

URE – Enzima Urease

ure – Gene da Urease

YCB – *Yeast Carbon Base* – Base de Carbono para Leveduras

YCBCN – *Yeast Carbon Base* – Base de Carbono para Leveduras Controle Negativo

YCBCP – *Yeast Carbon Base* – Base de Carbono para Leveduras Controle Positivo

YCBT – *Yeast Carbon Base Test* – Base de Carbono para Leveduras Teste

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Esporotricose, breve histórico.....	17
1.2 Agente etiológico.....	19
1.3 Epidemiologia e transmissão.....	23
1.4 Quadro Clínico.....	27
1.5 Diagnóstico.....	29
1.6 Tratamento.....	31
1.7 Virulência de <i>Sporothrix</i>	32
1.8 Urease como fator de virulência.....	34
2 JUSTIFICATIVA.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1. Objetivos Gerais:.....	40
3.2 Objetivos específicos:.....	40
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Cepas estudadas.....	41
4.2 Análise fenotípica para produção de urease.....	41
4.3. Detecção de crescimento das cepas de <i>S. brasiliensis</i>	42
4.4. Curva de crescimento de <i>S. brasiliensis</i> em presença do inibidor da urease.....	42
4.5 Isolamento e caracterização da urease.....	43
4.5.1. Obtenção de extratos proteicos.....	43
4.5.2. Eletroforese de proteínas.....	43
4.5.3 Immunoblotting (<i>Western blot</i>).....	44
4.5.4 Ressonância plasmônica de superfície.....	45
4.5.5 Análise de dados do SPR.....	46
4.6 Ensaio de expressão do gene de UREASE.....	46
4.6.1 Extração e quantificação de RNA.....	46
4.6.2 Síntese de cDNA.....	47
4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	48
4.7 Análises <i>in silico</i> da enzima urease de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	52
4.7.1 Busca das sequências de aminoácidos das ureases.....	52
4.7.2 Análise de estruturas primárias e secundárias das ureases.....	52
4.7.3 Alinhamento de sequência linear da ureases.....	53

4.7.4 Análise <i>in silico</i> da localização subcelular da urease de <i>S. brasiliensis</i>	53
5 RESULTADOS	55
5.1. Crescimento das cepas de <i>Sporothrix brasiliensis</i> urease negativa e urease positiva em caldo ureia de Christensen	55
5.2 Perfil de crescimento das cepas IPEC-34910, urease positiva e IPEC-45308 urease negativa, ambas de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	57
5.3. Curva de crescimento da <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910 em meio YCB com tiourea	59
5.4. Caracterização bioquímica e estrutural da urease de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	61
5.5. Ressonância plasmônica de superfície.....	63
5.6. Caracterização da expressão gênica da urease de <i>Sporothrix brasiliensis</i> (IPEC-34910 e IPEC-45308)	66
5.7 Aspectos estruturais e funcionais da enzima urease de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	68
6 DISCUSSÃO.....	74
7 CONCLUSÕES.....	83
PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS AO LONGO DO DOUTORAMENTO.....	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esporotricose – Breve histórico

A esporotricose é uma micose subcutânea, que pode ser subaguda ou crônica, de implantação, cosmopolita e a mais prevalente na América Latina, causada por fungos dimórficos pertencentes ao gênero *Sporothrix*, que compreendem as espécies patogênicas *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix schenckii* (MARIMON et al., 2007) e mais recentemente houve a inclusão de *Sporothrix pallida* (MORRISON et al., 2013) e *Sporothrix chilensis* (RODRIGUES et al., 2016).

Em 1898 em Baltimore, Estados Unidos da América (EUA), foi publicado o primeiro caso de esporotricose humana em um paciente do Hospital Johns Hopkins, o qual apresentava abscesso em dedo com linfangite nodular no antebraço do paciente (SCHENCK, 1898). Deste paciente foi isolado pelo pesquisador Benjamin Schenck um fungo reconhecido como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. Posteriormente, em 1900, Hektoen e Perkins (1900) descreveram um segundo caso na cidade de Chicago, também nos Estados Unidos da América, em que verificaram lesão no dedo de um menino após manuseio e acidente com martelo. Cabe ressaltar que os médicos que atenderam o menino na época, observaram que a lesão apareceu dez dias antes do paciente ter sido levado pelos pais ao hospital e que apresentava no momento da anamnese o tamanho de uma ervilha e posteriormente apresentou regressão espontânea. Os pesquisadores então isolaram o fungo e o nomearam *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN; PERKINS, 1900).

Por volta de sete anos após o primeiro caso de esporotricose ter sido descrito nos EUA, em 1907 Lutz e Splendore identificaram no Brasil o fungo em ratos, sendo esta, a primeira observação de infecção natural descrita em animais (LUTZ e SPLENDORE, 1907). Posteriormente, infecções em animais experimentais demonstraram, na época, a suscetibilidade de outros mamíferos, como o gato, por

exemplo, ao agente etiológico desta micose (BARROS et al, 2011). Já em 1952 foi relatado um caso de esporotricose humana com história de manuseio de gato (SINGER; MUNCIE, 1952), depois desse caso foi constatado que esta micose também pode ser de transmissão zoonótica, principalmente por arranhaduras e mordeduras de gatos infectados (BARROS et al, 2011).

O Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), desenvolve atividades de pesquisa clínica, ensino e assistência especializada em doenças infecciosas e parasitárias. Neste instituto também há a atuação do Laboratório de Micologia como Laboratório de Referência Nacional em Micoses Sistêmicas. Até 1997, o INI diagnosticava de um a três casos de esporotricose por ano. Neste mesmo ano, foi criado no INI o Serviço de Zoonoses, atual Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO/INI-Fiocruz) com o objetivo de estudar as leishmanioses e as micoses em animais domésticos de propriedade de pacientes assistidos no Serviço de Dermatologia Infecciosa do INI/Fiocruz.

Já em 1998, foi atendido o primeiro caso de esporotricose felina proveniente de um gato doméstico de um paciente. A equipe LAPCLIN-DERMZOO/INI-Fiocruz diagnosticou a esporotricose no gato do paciente e em outros gatos que residiam na mesma casa e nas habitações no entorno. Através da visita domiciliar houve uma busca ativa de casos felinos e caninos. Todos os proprietários recebiam informações sobre a doença e os casos suspeitos eram encaminhados para o LAPCLIN-DERMZOO/INI-Fiocruz (BARROS et al., 2010).

Também a partir 1998, foi observado um sensível aumento no número de diagnóstico de esporotricose, com nove casos em seres humanos, sendo destes, seis com história epidemiológica relatada pelos pacientes de contato com gatos com lesão cutânea. Entre estes últimos, todos eram provenientes dos municípios de Duque de Caxias, Queimados, Rio de Janeiro e São João de Meriti. Já os casos restantes não foram considerados esporotricose zoonótica, já que não foi evidenciado nenhum contato com animal, sendo a micose adquirida através da forma clássica de

transmissão, ou seja, por implantação traumática após contato com plantas e solo (BARROS et al., 2010).

Em 1999, o número de pacientes atendidos com esporotricose aumentou para 29. Desses, 27 haviam tido contato com gatos doentes (15 tendo sido arranhados ou mordidos pelo animal). Paralelamente, o número de municípios com casos da doença aumentou para nove. Em 2000, 43 casos humanos foram diagnosticados. Até aquele ano, o Município de Duque de Caxias era o mais acometido (CRUZ, 2013).

Desde esses casos diagnosticados em 1998 e 1999, observa-se a maior e mais duradoura epidemia, atualmente sendo utilizado o conceito de hiperendemia de esporotricose, causada por fungos patogênicos do gênero *Sporothrix*, na América Latina. Pode-se citar, como exemplo, a região sudeste do Brasil, onde apenas no Estado do Rio de Janeiro mais de 4.000 casos de esporotricose com transmissão por arranhaduras e/ou mordedura de gatos foram diagnosticados somente no INI-FIOCRUZ até 2015. Há vários relatos de que este número cresce a cada ano (SILVA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; CHAKRABARTI et al., 2015; ALZUGUIR et al., 2020). Segundo Orofino-Costa, 2017, este aumento no número de casos pode ser explicado pelo método de transmissão mais ocorrente atualmente no Brasil, que é a arranhadura e mordedura de gatos domésticos infectados pelo fungo e, possivelmente, por *S. brasiliensis* ser um dos agentes etiológicos mais virulentos associados a esta micose (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al. 2009; LECCA et al., 2020; NAKASU et al., 2020).

1.2 Agente etiológico

Os fungos do gênero *Sporothrix* pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Ophiostomatales, Família Ophiostomataceae (RODRIGUES et al., 2016).

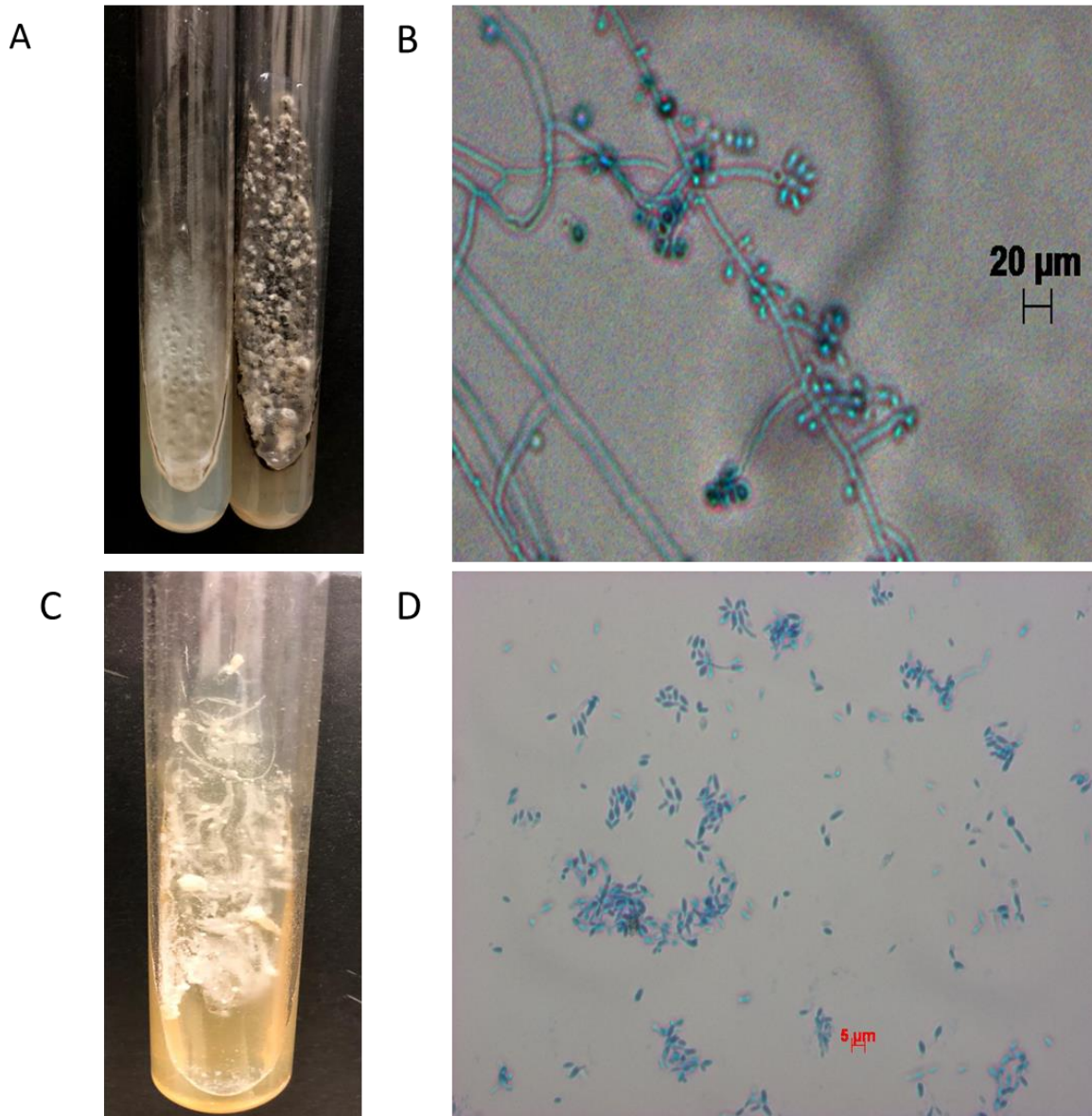
Os agentes da esporotricose são microrganismos sem mobilidade própria, eucariotos, com parede celular rígida e constituída de quitina, pertencentes ao gênero

Sporothrix. Estes fungos são sapróbios, ou seja, dependem da decomposição da matéria orgânica na natureza e podem ser encontrados amplamente na sua forma filamentosa no meio ambiente, sendo seu habitat de preferência, nesta forma, a vegetação viva ou em decomposição e no solo. *In vitro* principalmente nos meios de cultivo Sabouraud ou Mycosel tem seu crescimento preferencialmente entre 25°C e 30°C e também se apresentam como uma trama miceliana, com hifas e conídios, apresentam colônias inicialmente com cor branca que assumem gradativamente uma coloração marrom a preta, ao formar conídios escuros (Figura 1A) (Kwon-Chung; Bennett, 1992). Algumas cepas, no entanto, têm a capacidade de formar colônias escuras desde o início do crescimento (RIPPON, 1988). Microscopicamente, a forma filamentosa é composta de hifas septadas hialinas, de 1-2 µm de largura, os conídios formam-se em grupos, aparecendo a partir de hifas indiferenciadas. Estes conídios unicelulares apresentam forma de lágrima a clavados e não formam cadeias, conforme demonstrado na Figura 1C. Muitas vezes, conídios de paredes hialinas ou castanhas espessas surgem ao lado das hifas (DE HOOG; GUARRO, 1995).

Já em sua forma parasitária, e também em meio de cultura apropriado tal como em meio de cultivo BHI (*brain heart infusion* – infusão cérebro coração) a 35 – 37°C se apresentam, macroscopicamente como colônias lisas, de cor bege ou creme (Figura 1B) e microscopicamente como leveduras unicelulares ovaladas, *globosas* e em forma de charuto, podendo apresentar um ou mais brotamentos (Figura 1D) (RAMOS-E-SILVA, 1972; RIPPON, 1988).

Cabe o destaque que estas características macroscópicas e microscópicas de tamanho e forma e a cor das colônias, não podem ser consideradas um critério taxonômico válido para diferenciação das espécies patogênicas ou ambientais do gênero *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007).

Figura 1: Macromorfologia e Micromorfologia de *Sporothrix brasiliensis*:



A – Macromorfologia da forma filamentosa de *S. brasiliensis* em cultivo a 25°C; B – Micromorfologia da forma filamentosa de *S. brasiliensis* em cultivo a 25°C; C – Macromorfologia da forma leveduriforme de *S. brasiliensis* em cultivo a 37°C; D – Micromorfologia da forma leveduriforme de *S. brasiliensis* em cultivo a 37°C. Fonte: Elaboração própria

As dificuldades na classificação taxônomica baseada somente em morfologia levou Marimon e colaboradores (2006), a questionar ser *S. schenckii* a única espécie do gênero apontada como agente causador da esporotricose. Com isso, desenvolveram análises filogenéticas envolvendo um grande número de cepas de diferentes regiões geográficas e demonstraram elevada variabilidade genética nestes fungos (MARIMON et al., 2006). Já em 2007, corroborando com os dados moleculares, Marimon e seus colaboradores, lançaram mão de análises fisiológicas e fenotípicas para propor o desmembramento de *S. schenckii* em um complexo de espécies capazes de causar esporotricose e não apenas uma única espécie como proposto até aquele momento. Foram analisados neste último trabalho 127 isolados sendo a maioria proveniente de pacientes humanos caracterizadas como *S. schenckii*. Após testes bioquímicos de assimilação de açúcares, sequenciamento parcial dos genes codificadores para calmodulina (CAL) e β -tubulina, características macroscópicas e microscópicas e capacidade de crescimento em diferentes temperaturas foi sugerida a divisão em outras diferentes espécies sendo elas: *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* além de *S. schenckii stricto sensu*, sendo agrupadas em um complexo de espécies crípticas causadoras da esporotricose (MARIMON et al., 2007).

Um ano mais tarde foi sugerido a partir do trabalho de Marimon e colaboradores (2008) que *S. schenckii var. luriei* deveria também ser considerada uma nova espécie capaz de causar a esporotricose, sendo esta denominada atualmente *Sporothrix luriei*, após estudos baseados em metodologias semelhantes às anteriores de taxonomia polifásica. Outras duas espécies ambientais do gênero *Sporothrix* também foram relacionadas a esporotricose alguns anos mais tarde: *S. pallida*, que em 2013, foi identificada como causa da queratite infecciosa em um receptor de transplante de córnea (MORRISON et al 2013); *S. chilensis* que foi identificada como uma espécie potencialmente causadora de esporotricose em mamíferos (RODRIGUES et al., 2016). Vale salientar, que devido serem espécies ambientais, possuem dimorfismo deficiente e sua virulência é baixa. Com isso, a taxa de infecção é pouco descrita, sendo até o

presente associada somente a pacientes imunocomprometidos (OROFINO-COSTA et al., 2017).

1.3 Epidemiologia e transmissão

Durante 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, ou seja, por inoculação traumática de alguma das espécies nos hospedeiros, geralmente mamíferos, entre os quais destaca-se homens, cães e gatos, através de ferimentos com espinhos de plantas, farpas de madeira. Atividades de lazer e ocupacionais tais como floricultura, horticultura e pesca estão associadas com a aquisição da infecção, pela via clássica de transmissão (RIPPON, 1988; KAUFFMAN, 1999). Além de ser uma doença completamente ocupacional à época, não eram registrados muitos casos no mundo. Atualmente, sabe-se que a transmissão zoonótica, através de arranhadura e/ou mordedura de felinos também é muito comum (WANKE et al., 2013).

A esporotricose não é uma micose de notificação compulsória na maioria dos continentes, sendo assim sua prevalência mundial é incerta. Entretanto, no século 20 mais precisamente no fim dos anos 70, alguns surtos de esporotricose foram descritos, como o que envolveu pessoas que trabalhavam no reflorestamento de pinheiros e mudas de musgo (POWELL et al 1978), assim como uma pequena epidemia em que pessoas foram infectadas após contato com o feno contaminado em uma casa abandonada em que foram realizadas festas de *halloween*, ambos os casos nos EUA (CDC, 1988). Foram observadas também epidemias maiores, citando como exemplo a que ocorreu em meados da década de 40, quando aproximadamente três mil trabalhadores que mineravam na África do Sul foram infectados pelo contato com vigas de madeira contaminadas, sendo esta considerada a maior epidemia do século XX (MINES, 1947). Entre 2007 e 2009 foram registrados 457 casos em uma província no nordeste da China, onde a doença até hoje é endêmica (SONG et al., 2013).

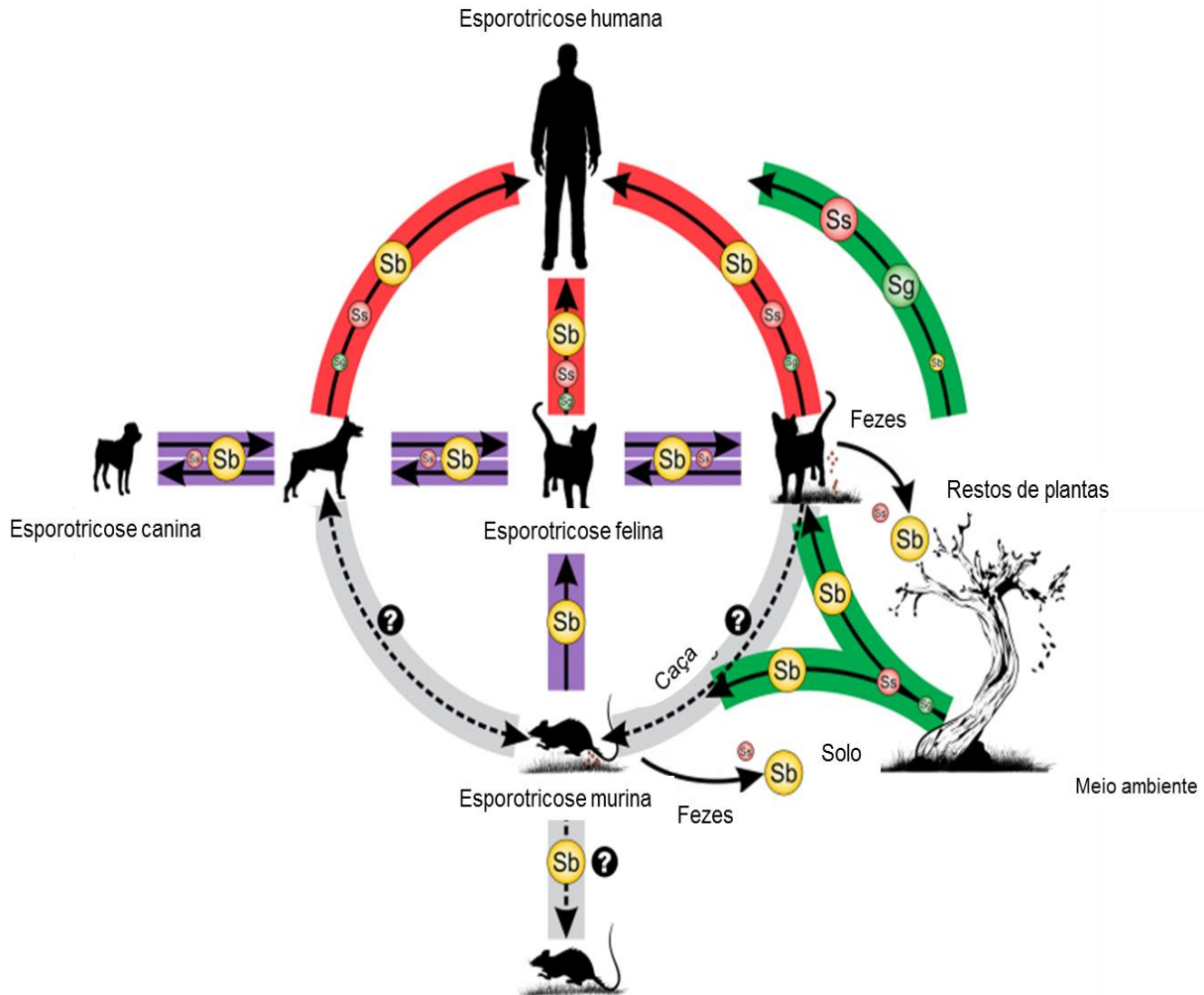
Cabe destacar que somente em 2013 a doença passou a ser de notificação compulsória no Estado do Rio de Janeiro segundo a Resolução SES-RJ Nº 674 de 12/07/2013. Após a liberação desta resolução foi atualizado no Rio de Janeiro os números gerais da esporotricose no Estado. Entre os anos de 2015 e 2018 foram notificados 1.416 casos suspeitos de esporotricose, sendo aproximadamente 70% desses casos confirmados. Entretanto, os números atuais indicam uma grave subnotificação e até certa negligência por parte das autoridades de saúde, já que os números que são observados tanto em hospitalizações (FALCÃO et al., 2019) quanto em número de casos desde o começo da hiperendemia em 1998 são maiores, o que revela um cenário muito mais grave no Estado do Rio de Janeiro (PEREIRA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016; GREMIÃO et al., 2017).

Os diferentes métodos de transmissão, espécie causadora e a localidade de ocorrência podem estar influenciando na hiperendemia que observamos no Rio de Janeiro e na disseminação pelo Brasil, tendo em vista que *S. brasiliensis* é a espécie mais circulante (ALMEIDA-PAES et al., 2015; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2020). Sabe-se que os felinos possuem uma carga fúngica bem elevada, atuando como potenciais reservatórios e disseminadores da doença, os felinos adquirem o fungo que está no solo e adoecem. Esses felinos doentes então, podem transmitir para outros gatos, humanos e cães, basicamente através de traumas subcutâneos causados pela arranhadura e mordedura. Além disso a migração dos gatos infectados com seus proprietários para outros estados brasileiros tem aumentado a disseminação pelo país (GREMIÃO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020). Já a espécie *S. schenckii* demonstra ser cosmopolita, ocorrendo em países da América do Norte, Ásia e Europa, além da América do Sul e a espécie *S. globosa* sendo a principal espécie causadora de esporotricose nos países asiáticos (CHAKRABARTI et al., 2015; TOVIKKAI et al., 2020), já sendo, inclusive, demonstrado casos de esporotricose felina nos países asiáticos (HAN; KANO, 2020).

Apesar de já ter se achado infecção natural em ratos (LUTZ e SPLENDORE, 1907), até o presente, o papel dos ratos nessa cadeia epidemiológica não está completamente elucidado, já que os gatos que saem para a rua mantêm contato direto com ratos, mas não se sabe exatamente se estes roedores adoecem ou se são

reservatórios e capazes de transmitir a esporotricose (Figura 2). Salientamos que também foram descritos métodos de transmissão que não foram completamente elucidados como infecção de profissionais de laboratório que podem contrair o fungo manipulando culturas de *Sporothrix* (COOPER et al, 1992).

Figura 2: Cadeia epidemiológica da esporotricose observada no estado do Rio de Janeiro:



Cadeia epidemiológica da esporotricose entre as principais espécies clínicas do gênero *Sporothrix*. O caminho roxo demonstra maior associação de *Sporothrix brasiliensis* (Sb) à transmissão zoonótica. Associação esta que não é exclusiva, pois *Sporothrix schenckii* (Ss), com menor frequência, também infecta gatos. A esporotricose felina pode ser transmitida aos seres humanos (zoonose) por arranhaduras e mordeduras (caminho vermelho). *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix globosa* (Sg) são associados à via clássica de transmissão (caminho verde), enquanto *S. brasiliensis* é menos frequente. O tamanho da circunferência designada a cada espécie está ligado à probabilidade de envolvimento (alto, médio ou baixo) em cada caminho de transmissão. Observa-se ainda o desconhecimento sobre o papel dos ratos nessa cadeia epidemiológica (caminho cinza). Fonte: RODRIGUES et al., 2016

1.4 Quadro Clínico

Amplio espectro clínico é observado em pacientes provenientes desta hiperendemia de esporotricose no estado do Rio de Janeiro. Essas formas, tal qual a sua severidade, estão associadas a alguns fatores como o tamanho do inóculo, a virulência da cepa infectante, profundidade da inoculação traumática e da resposta imunológica do hospedeiro (PAPAIORDANOU et al., 2015; CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016), como citado a seguir:

Forma linfocutânea – mais fácil de diagnosticar, por ser a forma mais comum, aparecendo em até 75% dos casos. Desenvolvem-se lesões mais localizadas, principalmente nas extremidades superiores. Primeiramente aparece uma lesão no local da inoculação após duas ou três semanas. A partir desta lesão inicial, forma-se uma cadeia de nódulos percorrendo o trajeto para os linfonodos mais próximos (SAMPAIO et al., 1954; WANKE, 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; 2015; OROFINO-COSTA et al. 2017). Eritema e infecção secundária podem estar presentes, mas a dor é geralmente leve (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2002, 2005; ZANCOPÉ-OLIVEIRA ET AL., 2011).

Forma cutâneo-fixa – segunda forma clínica mais comum correspondente 20% dos casos, aproximadamente. Nesta forma, a lesão conserva-se confinada ao sítio de inoculação sem envolvimento dos linfonodos. Geralmente as lesões aparecem ulceradas com bordas eritematosas e os locais mais afetados são as extremidades tanto superiores quanto inferiores (SAMPAIO et al., 1954; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; 2015; OROFINO-COSTA et al. 2017). Em alguns casos pode ocorrer regressão espontânea, no entanto, sem o tratamento devido, as lesões podem seguir para um curso crônico (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; 2015).

Forma cutâneo-disseminada – Marcada pelo aparecimento de múltiplas lesões na pele em locais distintos. Geralmente aparece após a múltipla inoculação traumática da pele geralmente no contexto de transmissão zoonótica. Raramente, pode haver, uma disseminação hematogênica (SAMPAIO et al., 1954; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011, 2015; OROFINO-COSTA et al. 2017).

Forma extracutânea – desenvolve-se em menos de 5% dos casos, portanto é a de diagnóstico mais complicado. Surge após a disseminação hematogênica do fungo e o sistema osteoarticular é o mais acometido (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; FREITAS et al., 2015a; COSTA et al. 2017). Mais raramente pode ser apresentado como esporotricose pulmonar, que ocorre devido à inalação do fungo, a apresentação clínica é semelhante à da tuberculose (SINGHAI et al., 2012; COSTA et al. 2013; SILVA et al., 2013). Também já foi descrito meningite causada por espécies do gênero *Sporothrix* (GUTIERREZ GALHARDO et al., 2010; FREITAS et al., 2015b; HESSLER, KAUFFMAN e CHOW, 2017; MIALSKI et al., 2018). Esta forma clínica está intimamente ligada a pacientes imunossuprimidos, geralmente por conta de doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), diabetes, alcoolismo, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e também pelo uso prolongado de corticoides (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; FREITAS et al., 2014; COSTA et al. 2017). No entanto existem relatos de casos de esporotricose extracutânea em pacientes imunocompetentes (HESSLER, KAUFFMAN; CHOW, 2017; MIALSKI et al., 2018). Algumas formas devem ser destacadas como a osteoarticular, pulmonar, ocular, mucosa e nervosa (FREITAS, 2014).

Condições clínicas associadas não são infrequentes no curso da esporotricose. Além dos sintomas gerais como febre, mal-estar, cefaleia, astenia, e outros já citados aqui, sinais e sintomas de hipersensibilidade ao fungo no organismo são apresentados por alguns pacientes (BARROS et al., 2004, FREITAS et al., 2010). As reações de hipersensibilidade descritas até o momento, atribuídas à esporotricose incluem eritema nodoso (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2002), eritema multiforme (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2005) e artrite reativa (OROFINO-COSTA et al., 2010). Nas lesões de eritema, as alterações histopatológicas são a de um infiltrado reativo e a procura do agente causador é sempre negativa (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2002, 2005). Nos casos de artrite reativa, os exames de imagem não são compatíveis com lesão articular infecciosa e resolvem com o tratamento do foco da micose (OROFINO-COSTA et al., 2010).

1.5 Diagnóstico

O padrão-ouro de diagnóstico da esporotricose é feito pelo isolamento e identificação do fungo em meio de cultivo, principalmente em Agar Sabouraud Dextrose e Mycosel, em sua forma filamentosa a 25°C, a partir de raspado da lesão, *swab*, aspirado ou biópsia. Nas formas extracutâneas, ou em formas disseminadas, a coleta se torna mais complicada, principalmente quando não existe evidência de acometimento cutâneo, e dependerá de procedimentos mais invasivos, e também hemocultura para o isolamento do fungo. Em alguns casos como os oculares, o material para coleta é muito escasso, dificultando a cultura do agente (WANKE et al., 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2015).

Independentemente do tipo de lesão deve-se ter o máximo de atenção no momento do cultivo nos meios por conta de contaminações eventuais que podem ocorrer. O isolamento e a identificação do fungo em meio de cultivo podem demorar até três semanas, que em casos de pacientes co-infectados com HIV ou com outras doenças de base pode representar um tempo demasiado longo (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019).

Com isso, métodos alternativos, como o diagnóstico sorológico pelo método de ELISA (ensaio imunoenzimático) devem ser utilizados. Entretanto, estes métodos são presuntivos uma vez que resultados falso-positivos podem ocorrer devido a reações cruzadas com alguns outros agentes infecciosos (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2019).

O exame histopatológico em amostras teciduais também é bastante útil para o diagnóstico da esporotricose. Embora células leveduriformes do gênero *Sporothrix* 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 (QUINTELLA et al., 2011). Também tem se demonstrado na literatura especializada a utilização da intradermorreação com esporotriquina como método diagnóstico. Entretanto, esse método não é usado em rotina hoje em dia, por constantemente ser positiva em

indivíduos sem doença ativa e frequentemente negativa nas formas extracutâneas e disseminadas (CRUZ, 2013).

Já que se observam benefícios e limitações em cada um dos testes, sobretudo no ensaio imunoenzimático e no diagnóstico micológico, sustenta-se a necessidade de complementação de um com o outro (OLIVEIRA et al., 2019).

Existem na literatura alguns métodos moleculares descritos para a detecção de ácido desoxiribonucleico (DNA) de fungos patogênicos pertencentes ao gênero *Sporothrix* a partir de amostras clínicas, porém as grandes vantagens dessas técnicas são a sensibilidade e o poder de distinção entre as espécies.

A reação da polimerase em cadeia (PCR) baseada na amplificação de sequências de genes de fungos se mostra ferramenta muito boa para a identificação desses agentes. 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, dentre os quais o *S. schenckii* estava incluso. Os resultados mostraram um alto nível de especificidade.

Outros métodos moleculares vêm sendo descritos para identificação e genotipagem do gênero, como por exemplo, análises de *fingerprinting* com o iniciador T3B que é um iniciador universal capaz de amplificar uma região do RNA transportador, já que cada fungo do gênero *Sporothrix* tem essa região de tamanho diferente gerando um perfil de bandas específico para cada espécie do gênero (OLIVEIRA et al., 2015). Ainda nos métodos moleculares, aplicados a *Sporothrix*, vale ressaltar o método baseado no polimorfismo dos fragmentos gerados por endonucleases de restrição (PCR-RFLP) do gene da calmodulina, em que cada fungo do gênero também possui um perfil de banda específico em um gel de agarose, sendo este método mais rápido, eficiente e barato do que o T3B (RODRIGUES et al., 2014).

Os dois métodos citados se mostraram eficientes como método alternativo para diferenciar todas as espécies de importância clínica (RODRIGUES et al, 2014). Em 2015

foi desenvolvido uma PCR com iniciadores específicos para cada uma das espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida*, e *Ophiostoma stenoceras*, como controle (RODRIGUES et al.,2015). 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 recentemente descrita para auxiliar na distinção de espécies patogênicas do gênero *Sporothrix* foi a técnica de espectrometria de massas por MALDI TOF, onde Oliveira e colaboradores (2015) analisaram a técnica com 64 isolados do gênero, incluindo as espécies de *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, tendo no estudo, 100% de correlação com os resultados de identificação obtidos por técnica de sequenciamento do gene da calmodulina. Mais recentemente foi desenvolvida um método de diagnóstico molecular rápido para esporotricose causada por *S. schenckii*, *S. globosa* ou *S. brasiliensis*, baseada na técnica de PCR em tempo real, em que os iniciadores para o gene da calmodulina dessas três espécies eram colocados na reação ao mesmo tempo com sondas (ZHANG et al., 2019)

1.6 Tratamento

Os fármacos itraconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B (MAHAJAN, 2014) podem ser utilizados no tratamento da esporotricose. Além disso o iodeto de potássio também tem sido bem aceito uma vez que foi utilizado como tratamento de escolha desde o início do século XX, porém seu completo mecanismo de ação não foi completamente elucidado e seus efeitos adversos geralmente relatados são: diarreia, anorexia, gosto metálico, náusea e vômito, que podem ser reduzidos pela diminuição da dose ou suspensão temporária (MACEDO et al., 2015).

Hoje em dia o itraconazol tem sido o medicamento de escolha pela grande eficácia imposta e com baixos efeitos adversos, tendo apenas entre 1 a 4% da população com infecção fúngica relatado náusea, vômito, diarreia, entre outros (MAHAJAN, 2014). Estes tratamentos são, geralmente contra-indicados em gestantes, sendo a termoterapia mais indicada, com aplicação de calor no local da lesão, por meio de bolsa de água quente, a mais ou menos 40°C, fonte infravermelho, ou meio similar (FREITAS, 2014).

1.7 Virulência de *Sporothrix*

A virulência de um determinado patógeno resulta da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção, associados ao estabelecimento da doença. É provável que os mecanismos de virulência de um organismo se originam a partir de intensas e variadas interações que esse microrganismo faz tanto com o meio ambiente como com sua própria espécie e com outros seres vivos. O meio ambiente e as relações ecológicas que qualquer ser vivo fazem se tornam um aprendizado em como lidar com situações variadas, sejam essas situações estressantes ou não para esses seres vivos. Tendo isso em mente, acredita-se que a arquitetura proteica, lipídica e metabólica desses seres seja constantemente evoluída, formando assim fatores de virulência mais intensos em algumas cepas do que em outra, dado que a espécie é a mesma, mas o nicho ecológico que ocupam pode variar (CASADEVALL, 2012).

Alguns fatores de virulência, responsáveis pela sobrevivência de fungos em parasitismo, estão descritos na literatura como a parede celular e estruturas complementares responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, produção de diferentes 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 et al., 1985). Além disso, a termotolerância é fator fundamental para a patogenia da esporotricose (ALMEIDA-PAES et al., 2015).

A virulência de certos isolados de *Sporothrix* é visto como uma importante peça para gerar formas mais graves da doença, entretanto poucas informações estão disponíveis sobre os fatores de virulência dos isolados de *Sporothrix* da área endêmica de esporotricose no Rio de Janeiro. Almeida-Paes e colaboradores (2015) estudaram isolados obtidos de pacientes, onde a produção de melanina em diferentes condições, termotolerância, produção de protease e urease foram analisadas.

A melanina é um composto solúvel que pode recobrir as células fúngicas, possivelmente conferindo proteção ao fungo (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000). A análise de produção de melanina mostrou que, além da já conhecida melanina DHN, três espécies de fungos patogênicos do gênero *Sporothrix* estudadas são capazes de produzir outros dois tipos de melanina, utilizando L-DOPA, eumelanina, ou L-tirosina, piomelanina, como substrato. 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 em *Sporothrix* (ALMEIDA-PAES et al., 2016; MARIO et al., 2016; CRUZ et al., 2018).

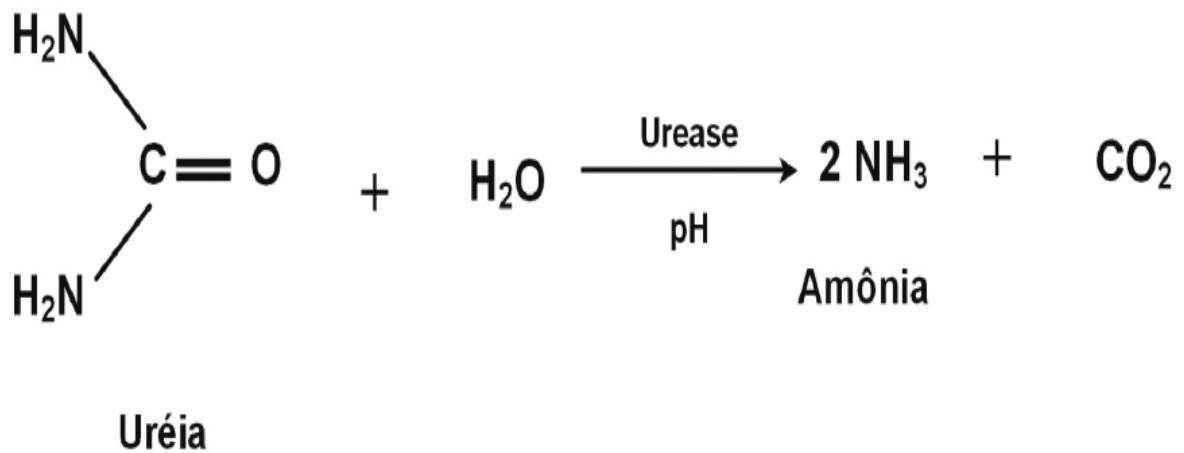
Também foi verificado que a melanização das diferentes espécies de *Sporothrix* spp. pode ser influenciada pelo contato com bactérias, principalmente as espécies *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosa*, vivendo no mesmo ambiente que o fungo. As bactérias inicialmente inibem o crescimento fúngico, porém com sua morte *Sporothrix* consegue crescer mais e produzir mais melanina do que quando cultivado isoladamente (ALMEIDA-PAES et al., 2019; CRUZ et al., 2020).

Com isso, os trabalhos supracitados destacam a importância de maiores estudos moleculares e bioquímicos acerca dos fatores de virulência dos fungos de uma maneira geral, tendo em vista que a grande parte dos estudos avalia a presença ou ausência de determinado fator e a importância para a infecção, mas o mecanismo de ação ou proteção do fungo de alguns desses fatores continuam não elucidados.

1.8 Urease como fator de virulência

Urease é uma enzima que possui três domínios estruturais e um catalítico, no qual se liga o íon níquel, e dependendo do microrganismo produtor de urease esses três domínios serão modificados, evidenciando assim os diferentes papéis dessa enzima. A hidrólise do seu substrato, ureia, produz amônia e CO_2 (Figura 3). A liberação de amônia em certos ambientes é benéfica para o microrganismo, pois ocasiona o aumento do pH ácido do meio neutralizando-o parcialmente (MOBLEY et al., 1995; SIMONI, 2002).

Figura 3: Reação de decomposição da ureia pela enzima urease:



Reação química na qual a ureia é decomposta pela ação da urease na presença de água, e como produto há liberação de amônia e gás carbônico. Muitos microrganismos utilizam essa reação para obtenção de nitrogênio para o metabolismo celular. Fonte: Elaboração própria

Em vários microrganismos, a urease tem como papel fisiológico mais relevante possibilitar a utilização da ureia como fonte de nitrogênio, entretanto também foi demonstrado em alguns modelos ter um importante papel indireto, ou seja, não correlacionado com a captação de nitrogênio, evidenciando ainda mais seu papel importante como fator de virulência em alguns desses modelos. Entre essas, a atividade tóxica em insetos (STANISÇUASKI; CARLINI, 2012) e protetora em algumas plantas (CARLINI; GROSSI DE SÁ, 2002), e atividade de agregação plaquetária em alguns mamíferos (SCOPLE-GUERRA et al., 2017) demonstrando assim a diversidade de papéis que esta enzima pode exercer na natureza (FOLLMER, 2007; CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

Em alguns microrganismos a urease desempenha um papel fundamental na infecção por microrganismos, onde a partir da quebra da ureia, liberação de amônia e posterior aumento de pH, há neutralização parcial do microambiente, favorecendo a sobrevivência, sucesso na replicação e sucesso também na infecção como no caso da *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal (DUBREUIL et al. 2002), e do trato urinário, no caso do *Proteus mirabilis* (Moblely et al. 1995) ambas bactérias patogênicas para o homem.

Alguns fungos patogênicos apresentam importante atividade de urease, o que caracteriza a enzima como fator de virulência no mecanismo de infecção destes. No fungo dimórfico *Coccidioides immitis*, a urease atua na alcalinização do meio celular, favorecendo o dimorfismo e conversão da fase sapróbia para a fase parasitária. Outro fungo que possui atividade produtiva de urease como importante fator de virulência é *Cryptococcus neoformans*, fenômeno comprovado através da inoculação de cepas selvagens, urease positiva, e de cepas geneticamente modificadas, urease negativa, em murinos, em que foi observado a sobrevivência dos fungos somente nos animais inoculados com as cepas selvagens, além do registro de invasão da barreira hematoencefálica (OLSZEWSKI et al. 2004). Já nas cepas geneticamente modificadas além de não ter sido observado morte dos murinos, não houve invasão da barreira hematoencefálica. Este trabalho nos serve como modelo da importância da presença da

urease em uma micose grave como a criptococose, porém qual o mecanismo de ação que levou com que os fungos modificados geneticamente fossem incapazes de invadir o sistema nervoso central permanece desconhecido.

Através de testes *in vitro* da detecção de urease em meio de cultivo apropriado, meio de Christensen (CHRISTENSEN, 1946; KANE; FISHER, 1971), em que ocorre a mudança de coloração, conforme a amônia produzida pela reação de degradação da ureia e liberação no meio, foi observado que cepas consideradas mais virulentas de *S. brasiliensis* produzem mais urease do que as consideradas menos virulentas. A produção de urease também foi diferenciada entre as espécies, sendo a maior produção desta enzima por *S. brasiliensis* estar relacionada com a virulência das espécies causadoras desta micose no Rio de Janeiro (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015).

Não foi possível correlacionar nenhum fator de virulência, termotolerância ou antígenos de *Sporothrix* com as manifestações clínicas da esporotricose até o presente, sugerindo que estas sejam fruto de uma combinação de fatores envolvendo a virulência do fungo e o status imunológico do hospedeiro (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015). Também não se tem conhecimento se cepas menos virulentas, que a princípio não causariam doença em imunocompetentes, possam desencadear a micose em imunodeprimidos.

Apesar da constatação, em meio de cultivo que a enzima urease pode estar ligada com o desenvolvimento de formas clínicas mais graves dessa doença, o seu papel bioquímico, fisiológico e molecular permanece desconhecido e este é o primeiro passo para elucidação da urease como fator de virulência em *S. brasiliensis* ou não.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da 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.

Em fungos, o gene *ure*, codificador da urease, foi primeiramente clonado em *Coccidioides immitis* (YU et al., 1997), e sua expressão *in vivo*, sugere que esta enzima participe no processo de esporulação e patogênese deste fungo. Neste sistema, estudos realizados demonstraram que a urease produzida dentro da célula infectada se revelou como principal produtor de amônia intracelular, com liberação extracelular propiciando a alcalinização no meio extracelular, contribuindo assim para a morfogênese do fungo da fase saprofítica para a fase parasitária (MIRBOD-DONOVAN et al, 2005).

O papel da urease como fator de virulência foi demonstrado *Cryptococcus neoformans* (COX et al., 2000), inclusive na invasão e manutenção do fungo no sistema nervoso central (SNC) de murinos. Olszewsk e colaboradores em 2004 demonstraram que quatro semanas após a inoculação tanto de cepas produtoras como não produtoras de urease em camundongos, os sintomas neurológicos foram bem mais brandos em cepas não produtoras quando comparados com murinos infectados com cepas produtoras, em que foi verificado 75% de mortalidade juntamente com o aparecimento de granulomas tanto nos pulmões quanto no cérebro apenas em murinos infectados com cepas capazes de produzir urease, demonstrando o importante papel desta enzima na disseminação do fungo para o SNC. A urease, também parece atuar como importante fator de virulência em outros fungos como *Trichophyton rubrum* (HIRUMA et al., 2013) e *Paracoccidioides brasiliensis* (ROCHA et al, 2009), contudo nesses modelos foram feitas apenas comparações de cepas que produzem muita ou pouca urease em meio de cultivo e transcrito de RNA mensageiro (RNAm).

Embora se tenha demonstrado que espécies clínicas do gênero *Sporothrix*, em sua maioria, produzem urease, até o presente, estudos moleculares, bioquímicos e a caracterização da enzima ainda não haviam sido realizados, e conseqüentemente seu

papel na arquitetura da infecção e na resposta imunológica do hospedeiro permanecem desconhecidos.

Aliada a esses importantes papéis que a urease representa em vários microrganismos, se flagra a necessidade de caracterizar o papel funcional desta enzima em fungos do gênero *Sporothrix*, principalmente em *S. brasiliensis*, principal espécie causadora da esporotricose aqui no Rio de Janeiro, já que até então não está claro qual a importância da urease na infecção por estes fungos, seja na aquisição da infecção ou em sua manutenção, por exemplo. Sabe-se que algumas cepas consideradas mais virulentas secretam mais urease em meio de cultivo, entretanto sua caracterização bioquímica e se este quadro se repete a nível molecular de expressão gênica permanece desconhecido.

Além dos fungos esta proteína também é um importante fator de virulência para vários outros tipos de microrganismos, como por exemplo, as bactérias *Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis* (DUBREUIL et al., 2002), sendo assim para um melhor entendimento de como se dá a participação desta importante proteína em uma infecção que cresce em número de casos, tanto em gatos quanto em seres humanos, se faz necessário, a sua identificação, caracterização bem como seu possível papel na virulência do fungo. Após essa caracterização esta enzima pode, no futuro ser estudada de modo que se torne alvo terapêutico e/ou alvo de diagnóstico mais rápido e eficiente dessa micose.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais:

Caracterizar a enzima urease (URE) a nível molecular e avaliar o papel funcional da urease de *Sporothrix brasiliensis*.

3.2 Objetivos específicos:

1. Avaliar a expressão a urease na composição fenotípica de isolados de *Sporothrix brasiliensis*;
2. Avaliar o crescimento de cepas de *Sporothrix brasiliensis* considerados urease positiva e urease negativa em diferentes condições de cultivo.
3. Caracterizar o nível de expressão do gene codificador da urease de *Sporothrix brasiliensis* considerados urease positiva e urease negativa em diferentes condições;
4. Comparar a produção de urease em cepas de *Sporothrix brasiliensis* considerados produtora e não produtora de urease;
5. Comparar as sequencias de aminoácidos de urease de fungos patogênicos ou não e da urease de *Canavalia ensiformis*

4 METODOLOGIA

4.1 Cepas estudadas

Para os testes, nesse trabalho, foram selecionadas por conveniência, uma cepa urease positiva (IPEC-34910) e outra urease negativa (IPEC-45308) de *S. brasiliensis*, (OLIVEIRA, 2016), previamente isoladas de pacientes humanos e armazenadas na Coleção do Setor de Diagnóstico Micológico do Laboratório de Micologia. Inicialmente, a identidade em nível de espécie de cada uma das cepas foi confirmada por métodos fenotípicos e sequenciamento parcial do gene codificador de calmodulina (OLIVEIRA et al., 2011).

4.2 Detecção de urease em meio de Christensen

As duas amostras selecionadas para o estudo foram submetidas a esta análise fenotípica para confirmação ou não da produção de urease. Para tal, as amostras foram semeadas em caldo ureia de Christensen (CHRISTENSEN, 1946; KANE; FISHER, 1971), após 7 dias de crescimento em meio BHI a 37°C sob agitação de 150 RPM.

Este meio contém o reagente fenol vermelho que funciona como indicador de pH. Na presença da urease, a ureia presente no meio de Christensen é metabolizada, liberando amônia e aumentando o pH, mudando a coloração avermelhada para roxa.

As células leveduriformes foram suspensas em equivalência à escala 2.0 de McFarland, o equivalente a aproximadamente 10^6 células de levedura. Isolados de *Candida albicans* ATCC 18804 e *C. neoformans* ATCC 32045 foram utilizados como controles negativo e positivo respectivamente. Ao final de 7 dias de crescimento as cepas em estudo foram comparadas com as cepas controles.

4.3. Avaliação de crescimento das cepas de *S. brasiliensis* em diferentes condições de cultivo

A cepa produtora (IPEC-34910) e não produtora (IPEC-45308) de urease foram semeadas em meio condicionado quanto a fonte de nitrogênio suplementada. Para este teste utilizamos o meio *Yeast Carbon Base* (Base de carbono para leveduras – YCB) que é um meio de cultivo que possui as fontes de carbono necessárias às leveduras, porém vem sem nenhuma fonte de nitrogênio sendo esta adicionada posteriormente. Com isso, montamos três meios condicionados quanto a fonte de nitrogênio: (i) Controle Positivo (YCBCP) – YCB adicionado de 2% de Sulfato de Amônia; (ii) Controle Negativo (YCBCN) – YCB sem adição de fonte nitrogênio; (iii) Teste (YCBT) – YCB adicionado de 2% de ureia.

Para realização do ensaio, as cepas foram previamente cultivadas no meio BHI por 7 dias, então repicadas em escala 2.0 Mc Farland, para três frascos distintos, contendo YCBCP em um, YCBCN em outro e por fim YCBT. Como as células vieram de BHI, um meio de cultivo rico em nutrientes, e para tentarmos alcançar o esgotamento das fontes endógenas de nitrogênio desses fungos, um novo repique (100 μ L) do crescimento inicial nos meios YCB foi realizado após outros 7 dias para 3 novos frascos dos mesmos meios e o crescimento fúngico, em cada condição, foi detectado por densidade ótica (D.O) em filtro 590nm, onde 200 μ L foram coletados em triplicata nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do crescimento.

4.4. Curva de crescimento de *S. brasiliensis* na presença do inibidor da urease

Para verificar se a cepa IPEC-34910 de *S. brasiliensis* depende do nitrogênio disponibilizado pela quebra da ureia através da urease para crescer em meio seletivo quanto a fonte de nitrogênio, essa cepa foi submetida a YCBT (2% de ureia) como única fonte de nitrogênio e frente as seguintes concentrações de tioureia, conhecido inibidor da urease: 0,33 μ M, 0,165 μ M e 0,0825 μ M, bem como YCBT sem a tioureia. Para observar

se a tioureia nessas concentrações estava sendo tóxica para as células de levedura, também cultivamos as células de levedura em YCBP com 2% de sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio e seguindo as mesmas concentrações de tioureia descrita anteriormente. Todas as oito condições (três concentrações diferentes de tioureia em cada YCB e mais controle negativo, sem tioureia, em cada um dos YCB) foram cultivadas sob agitação de 150 RPM, a 37°C por 7 dias. Todos os dias foram retirados 200µL das culturas, transferidos para uma placa de 96 poços, em duplicata e as DOs foram obtidas em espectrofotômetro em filtro com um comprimento de onda de 590nm.

4.5 Isolamento e caracterização da urease

4.5.1. Obtenção de extratos proteicos

As proteínas totais de *Sporothrix brasiliensis* das cepas IPEC-34910 e IPEC-45308 foram extraídas após ajustar a concentração celular para escala 2.0 Mc Farland e mantidas por 7 dias de crescimento a 37°C sob 150 RPM em caldo ureia de Christensen. Após lavar as células três vezes em tampão salina fosfato (PBS), as células foram centrifugadas (4°C – 4.600 G – 6 minutos), e posteriormente solubilizadas em tampão de extração (10mM Tris-HCl, pH 7.5) e submetidas a lise mecânica com *beads* de zircônia de 0,5 mm de diâmetro em três ciclos de 15 segundos em agitação máxima em *Bead biter* (Biospec, Bartlesville, OK, EUA) em intervalos de um minuto no gelo.

4.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

O perfil qualitativo das proteínas totais dos fungos foi resolvido por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Os ensaios de SDS-PAGE (10%T, 4.0%C), em condições desnaturantes e redutoras, foram conduzidos seguindo os procedimentos

descritos por (LAEMMLI, 1970). As preparações de proteínas (10 µg) foram previamente tratadas com tampão da amostra (80 mM Tris HCl, pH 6,8; 2 % SDS (p/v); 12 % glicerol (v/v); 5 % β-mercaptoetanol (v/v) e 0,05 % azul de bromofenol (p/v) e fervidas por 3 minutos. Posteriormente, a eletroforese foi conduzida a 150 volts por uma hora e meia.

Após a eletroforese, as proteínas foram coradas pelo método de impregnação pela prata (GONÇALVES et al., 1990) segundo protocolo do *kit* comercial *Silver Stain Plus Kit* (BioRad, Hercules, CA, EUA). Proteínas como massa molecular conhecidas foram usadas como padrões para análises comparativas das migrações eletroforéticas: SDS-7 (albumina bovina 66kDa, albumina de ovo 45kDa, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, músculo de coelho 36kDa, anidrase carbônica bovina 29kDa, tripsinogênio 24kDa, inibidor de tripsina 20kDa e α lactalbumina 14kDa) e SDS-6H (Miosina 205kDa, β galactosidase 116kDa, fosforilase b 97,4 kDa, albumina bovina 66kDa, albumina de ovo 45 kDa e anidrase carbônica 29 kDa). Ambos as preparações de proteínas padrões foram obtidas da Sigma-Aldrich Corporation (San Luis, MI, EUA).

4.5.3 Análise por ensaio imunoenzimático (*Western blot*)

As proteínas previamente resolvidas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (2,0 µM) segundo os procedimentos previamente descritos (TOWBIN et al., 1979). Nestes experimentos, a eletrotransferência das proteínas foi realizada utilizando-se um sistema semi-seco de transferência Trans-blot (Bio-Rad, CA, USA) por 50 minutos a 15V, 25°C. Após a confirmação da transferência das proteínas com solução de PonceauS (0,1% de PonceauS e 0,1% (v/v) de ácido acético), as membranas foram lavadas com água corrente e incubadas (20°C, 16 horas) em solução de PBS acrescido de 0,5 % de Tween 20 (PBST) e 5 % (p/v) *Skim Milk* (Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA). Em seguida, as membranas foram incubadas (25°C, 12 h) com anticorpo policlonal específico para urease de *Canavalia ensiformis* (feijão) (ThermoScientific, MA, USA) nas diluições de 1:500 (0,02 mg/mL); 1:1.000 (0,01 mg/mL) e 1:2.000 (0,005 mg/mL) em PBST (PBS mais 0,1% de *tween*) para padronização da

reação no extrato total bruto. Posteriormente, as membranas foram lavadas com PBST (3 vezes, 10 minutos cada vez) e o complexo imune formado foi revelado por reação com o reagente Diaminobenzidina (DAB).

4.5.4 Análise por ressonância plasmônica de superfície

Os ensaios de ressonância plasmônica de superfície (SPR - *surface plasmon resonance*) foram realizados para quantificar a urease produzida por duas cepas de *Sporothrix brasiliensis* em sua forma de levedura. As análises foram realizadas utilizando um *chip* COOH1, o qual foi funcionalizado com anticorpo policlonal IgG anti-urease (Thermoscientific, MA, EUA). A funcionalização do *chip* do sensor foi realizada em três etapas sequenciais no tampão de corrida PBS (pH 7,4), e todas as etapas a seguir foram executadas em uma taxa de fluxo contínua: (1) injeção de 250 μ L de EDC / NHS (0,4 M EDC e 0,1 NHS M) a 50 μ L / min; (2) injeção de 150 μ L de IgG de coelho (6 μ g) a 10 μ L/min (3) injeção de 100 μ L de etanolamina-HCl 1 M, pH 8,5 a 25 μ L/min. Posteriormente, uma curva de calibração plotando várias concentrações (41,0 μ M a 169,1 pM) da urease comercial de *Canavalia ensiformis* (ThermoScientific, MA, EUA) foi construída. Em seguida, concentrações de proteínas do extrato bruto (0,3 ng/uL, 0,25 ng/uL e 0,20 ng/uL) de ambas as cepas foram submetidas à interação com o anticorpo IgG anti-urease, previamente imobilizado no *chip*. Todas as análises foram avaliadas a um fluxo de 10 μ L/min. Os ensaios de interação foram conduzidos na presença de PBS, pH 7,4 (volume total de 100 mL). Após cada ciclo de interação, o chip foi regenerado por um novo ciclo com tampão de glicina 0,2 M, pH 3,0 (volume total de 200 μ L com fluxo de 50 μ L / min).

Os ensaios foram conduzidos no biossensor óptico SensiQ® Pioneer (FORTEBIO Company, Fremont, CA, EUA) e documentadas em um sensorgrama. A taxa inicial de interação foi determinada a partir da unidade de ressonância (RU) para a formação do complexo. Os diagramas sensoriais de associação e dissociação para a formação do complexo foram obtidos após análise utilizando o software SPd assay Qdat (FORTEBIO Company, Fremont, CA, EUA).

4.5.5 Análise de dados do SPR

Após a obtenção da média \pm desvio padrão, estes dados foram apresentados como dados quantitativos. A confiabilidade dos dados de SPR foi confirmada por regressão linear usando diferentes concentrações de urease e anticorpo anti-urease comerciais para definir o coeficiente de determinação (R^2). Os valores utilizados para calcular a detecção de proteínas no *chip* funcionalizado anti-urease foram obtidos pela variação da RU pós-injeção e pela RU da fase de dissociação (RUd). A curva de calibração foi determinada pela razão da concentração de urease de *Canavalia ensiformis* (abscissa) e RUd (ordenada) resultante da interação antígeno/anticorpo.

4.6 Avaliação da expressão do gene da UREASE

4.6.1 Extração e quantificação de RNA

A extração e purificação de RNA de *Sporothrix brasiliensis* IPEC-34910 e IPEC-45308 foram realizadas utilizando o método do TRIzol (Invitrogen), que consiste em 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. O TRIZOL mantém a integridade do RNA. As células foram submetidas à lise mecânica de sua parede celular com a ajuda de *beads* de zircônia (0,5 mm).

Após o rompimento da parede celular, submetemos os componentes intracelulares à separação de fases em que foi adicionado, para cada 1mL de TRIzol que foi recuperado do passo anterior, 0,2mL de clorofórmio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguido de centrifugação (12000 \times g, 4°C, 15 minutos). Na separação de fases, a solução é separada em fase orgânica e aquosa, permanecendo o RNA exclusivamente na fase aquosa. Após a transferência da fase aquosa, o RNA foi precipitado adicionando 200 μ L de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e o material foi centrifugado (12000 \times g, 4°C, 15 minutos). O RNA obtido foi lavado por centrifugação (12000 \times g, 4°C, 15 minutos)

com etanol 75 % por três vezes para retirada de possíveis matérias orgânicas e agregados celulares ainda contidos na solução. Após a última lavagem o excesso de etanol foi retirado e o tubo foi deixado em repouso com a tampa aberta para secar o que sobrou de etanol e então 30 µL de água ultrapura foi adicionada e o RNA hidratado. A concentração de RNA extraído foi quantificada por espectrofotometria no aparelho de quantificação *Nano vue* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). A fim de degradar as possíveis fitas de DNA genômico que poderiam contaminar a amostra de RNA total extraído, após as extrações, foi utilizado o *kit* de degradação de DNA genômico chamado *DNase I amplification grade* (ThermoFisher, Califórnia, EUA). Com o intuito de inibir a ação de RNase (enzima que degrada RNA, que poderia estar na amostra de RNA extraído, também após a extração) em todas as amostras, foi utilizado o inibidor de RNase *Ribonuclease H* (Sigma Aldrich San Luis, MI, EUA). Ambos kits foram utilizados segundo as recomendações dos fabricantes. Todo esse processo foi realizado dentro da cabine de fluxo laminar e após todos esses processos, uma parte do RNA foi separada para síntese de cDNA (protocolo descrito abaixo) e a outra parte dos RNAs foi estocada em freezer -80°C.

4.6.2 Síntese de cDNA

Cerca de 2 µg de RNA total foram submetidos a uma reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) para se obter DNA complementar (cDNA) utilizando o *kit* comercial High Capacity RNA-to-cDNA (*Life Technology*). Este *kit* utiliza o método de hexâmetros randômicos para a transcrição reversa da amostra de RNA total. Vale destacar que a extração de RNA e a síntese de cDNA foram programadas para acontecer sempre no mesmo dia, para evitar degradação de RNA no processo de congelamento e descongelamento. Após a síntese, o cDNA foi guardado em freezer -20°C.

4.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Neste trabalho foi padronizada uma reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR - *quantitative real time Polymerase chain reaction*) para detecção e quantificação de transcritos de RNA mensageiro para urease. Nesta etapa de padronização, foi utilizada a cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910, produtora de urease. As células fúngicas foram cultivadas em meio *Yeast Carbon Base* (YCB), sendo que a concepção foi, além de estabelecer ambientes controlados em relação a fonte de nitrogênio para as células fúngicas, tentar esgotar a urease produzida pelas células de *S. brasiliensis*, já que antes de serem cultivadas nesse meio, as células foram guardadas e recuperadas em BHI líquido por 6 dias. Para ilustrar, foi criado o seguinte fluxograma de crescimento celular (Figura 4).

Para avaliar a expressão do gene da urease foi desenvolvido neste trabalho uma qPCR e para tanto a reação foi padronizada com testes dos genes de referência previamente desenvolvidos por Trujillo-Esquivel e colaboradores (2017), bem como a eficiência de amplificação de cada gene de referência e do nosso gene de estudo, em que o par de iniciador foi desenhado neste trabalho (Oliveira, 2016) (Tabela 1). Foram testadas também as curvas de *melting* dos genes para detectar se haveria amplificação inespecífica.

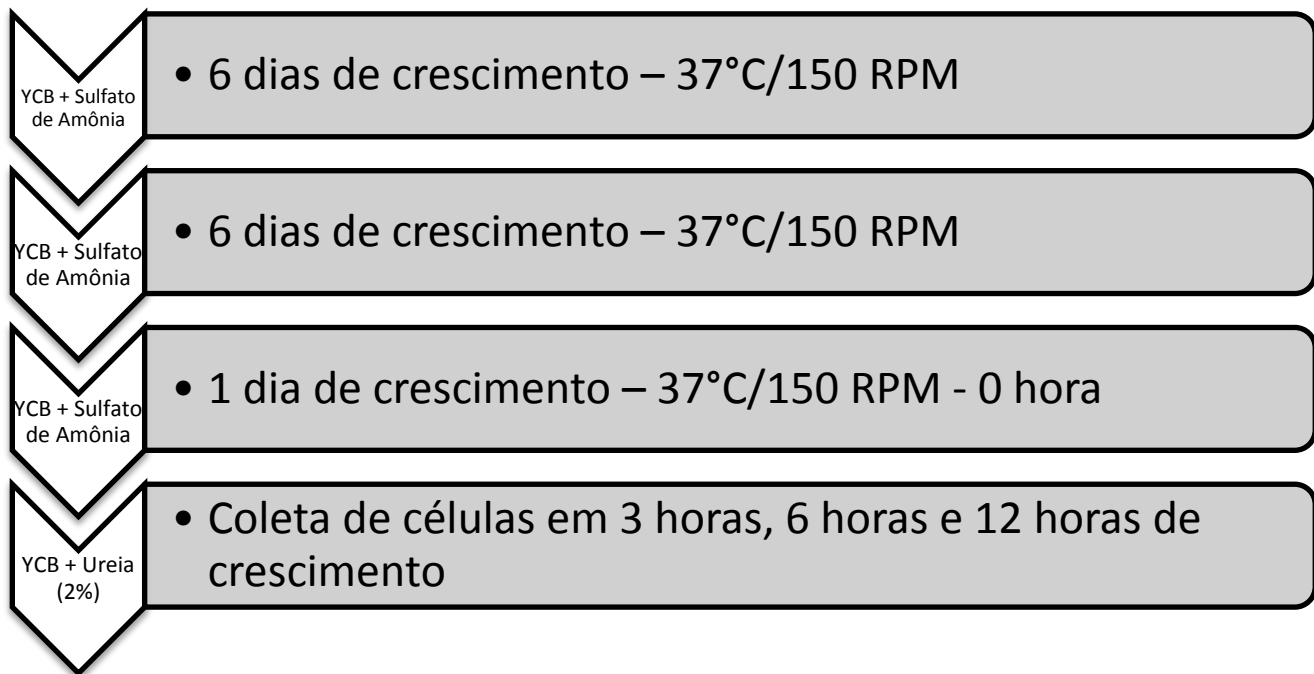
Inicialmente foram testadas as concentrações de iniciadores a 5 μM , 10 μM e 20 μM com todos os genes de referência e com o da urease para observar possíveis variações entre os tempos designados para o estudo. Após esses testes iniciais, reações realizadas com o cDNA de tempo zero nas concentrações de 200 ng/ μL , 100 ng/ μL , 50 ng/ μL , 25 ng/ μL , 12,25 ng/ μL , 6,25 ng/ μL e 3,125 ng/ μL para estabelecer a eficiência de amplificação destes iniciadores, levando em conta que 100% de eficiência significa que a cada ciclo a quantidade de cópias de cDNA é dobrada, ou seja a amplificação é exponencial.

Por fim, as reações de qPCRs foram realizadas com *kit Type-it HRM PCR* (Qiagen, Hilden, Germany), que usa o intercalante de DNA/cDNA *Evagreen dye*.

Todas as reações de qPCR foram feitas com o protocolo padrão de dois passos, sugerido pelo Type-it HRM PCR (Qiagen, Hilden, Germany) no termociclador Rotorgene (Qiagen, Hilden, Germany) como a seguir: (i) Etapa 1: 95°C - 20 segundos; (ii) Etapa 2: 95°C - 1 segundo; (iii) Etapa 3: 60°C - 20 segundos

As etapas 2 e 3 foram repetidas 40 vezes. Ao final da reação, a curva *melting* foi realizada em que a temperatura da amostra crescia de grau em grau de 60°C a 95 °C, para detecção de alguma amplificação inespecífica. Após esses testes iniciais foi feita uma reação completa, ainda com ambas as cepas do estudo (IPEC-34910 e IPEC-45308), desta vez com todos pontos de coleta de amostras pré-estabelecidos, sendo eles: 0, 3, 6 e 12 horas de cultivo no YCB com ureia, conforme descrito na Figura 4, tanto com o iniciador que amplifica o cDNA para urease quanto com o que amplifica para gene de referência escolhido.

Figura 4: Fluxograma demonstrativo de como foi proposto o crescimento fúngico



Crescimento fúngico usado com o objetivo de tentar esgotar a produção de ureia da cepa IPEC-34910, produtora de urease e da cepa IPEC-45308, não produtora de urease, ambas de *Sporothrix brasiliensis*. Fonte: Elaboração própria

Tabela 1: Tabela do conjunto dos iniciadores usados na reação qPCR.

<i>Alvo (Número de Acesso)</i>	<i>Sequências dos iniciadores</i>	<i>Função biológica de cada iniciador</i>	<i>Tamanho do Amplicon (pb)</i>
<i>Urease (ERS95967.1*)</i>	5'- CAACGACAGCGATCCCAAG -3' 5'- ACGGTGAGACAGGCGTCAAT -3'	Degradação da ureia	114
<i>L6 (XP_016584434**)</i>	5'- ATTGCGACATCAGAGAAGG -3' 5'- TCGACCTTCTTGATGTTGG-3'	RNA estrutural de ribossomo	224
<i>GAPDH (XP_016586602**)</i>	5'- ATCAAGGCCGCTATTAAGG-3' 5'- CTATCGACCTTGGCTACG-3'	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase participa da gliconeogênese	236
<i>EF1A (XM_016731693**)</i>	5'-AAGACTCACATCAACGTCG-3' 5'-CTTCCACAGAGCAATATCG'-3'	Fator de alongação de tamanho celular	226
<i>L34 (XM_016732368.1**)</i>	5'-CCTGGTATCCCCGCACTG-3' 5'- CGCATCTTGAGCCACCGTA-3'	RNA estrutural de Ribossomo	91

*Gene de teste no estudo. ** Genes de referência eleitos para o estudo; pb = pares de base Fonte: Elaboração própria

4.7 Estudos *in silico* da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis*

4.7.1 Busca das sequências de aminoácidos das ureases

Inicialmente, foi realizada uma busca no servidor do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), em que foram recuperadas sequências de aminoácido das ureases de fungos não patogênicos aos humanos, das espécies *Neurospora crassa* (KHE85978.1), *Grosmannia clavigera* (EFW98524.1), *Agaricus bisporus* (CAG34286.1), *Ophiostoma piceae* (EPE08642.1) e *Sporothrix insectorum* (OAA62669.1), além de sequências de urease de fungos patogênicos para os seres humanos, das espécies *Histoplasma capsulatum* (EDN07066.1), *Blastomyces dermatitidis* (EGE79166.2), *Paracoccidioides brasiliensis* (ACN56572.1), *Paracoccidioides lutzii* (XP_015700973.1) *Coccidioides immitis* (KMU85567.1), *Trichophyton rubrum* (EGD89553.2), *Microsporum canis* (EEQ29612.1), *Aspergillus fumigatus* (CAE17672.1), *Aspergillus nidulans* (CBF89498.1) *Fonsecaea pedrosoi* (KIW75013.1), *Sporothrix schenckii* (XP_016584457.1), *Sporothrix brasiliensis* (KIH89566.1) *Cryptococcus neoformans* (XP_572365.1), *Cryptococcus gattii* (KJE01260.1), *Cutaneotrichosporon oleaginosum* (KLT45987.1) e *Trichosporon asahii* (EKD04296.1). A sequência de aminoácido da urease da planta *C. ensiformis* (feijão) (AAA83831.1) foi usada como grupo externo na comparação dessas sequências e por ser uma das ureases mais bem estudadas pela comunidade científica.

4.7.2 Análise de estruturas primárias e secundárias das ureases

A estrutura primária da urease de *S. brasiliensis* e outros fungos patogênicos e não patogênicos, bem como a urease de *C. ensiformis* depositados no banco de proteínas do NCBI, conforme citados na sessão anterior, foram submetidos a servidores

disponíveis na Internet. A estrutura primária da proteína foi analisada usando o ProtParam server (<https://web.expasy.org/protparam/>), em que foram coletados os seguintes dados: tamanho da sequência (número de aminoácidos), peso molecular (KDa), índice de hidrofobicidade (Gravy), ponto isoelétrico (PI) e previsão da estrutura secundária (alfa-hélices, folhas beta, *coil* e porções estendidas).

4.7.3 Alinhamento de sequência linear da ureases

As sequências lineares recuperadas do servidor NCBI foram submetidas ao software MEGA6 e, em seguida, uma árvore pelo método de *Neighbor-Joining* foi projetada usando a matriz de identidade e o servidor *Multiple Sequence Alignment (Muscle)*. A história evolutiva foi inferida pelo método UPGMA. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 3.06233746 é mostrada. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos (próximos aos ramos) nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson e estão nas unidades do número de substituições de aminoácidos por local. A variação da taxa entre sites foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 22 sequências de aminoácidos. Todas as posições que contêm lacunas foram eliminadas. Havia um total de 715 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

4.7.4 Análise *in silico* da localização subcelular da urease de *S. brasiliensis*

A localização subcelular das proteínas foi avaliada usando a ferramenta DeepLoc-1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>), um preditor de localização subcelular de proteína eucariótica com base em um cálculo hierárquico em árvore usado para prever a localização de ambas as proteínas nos compartimentos celulares (Almargo et al., 2017).

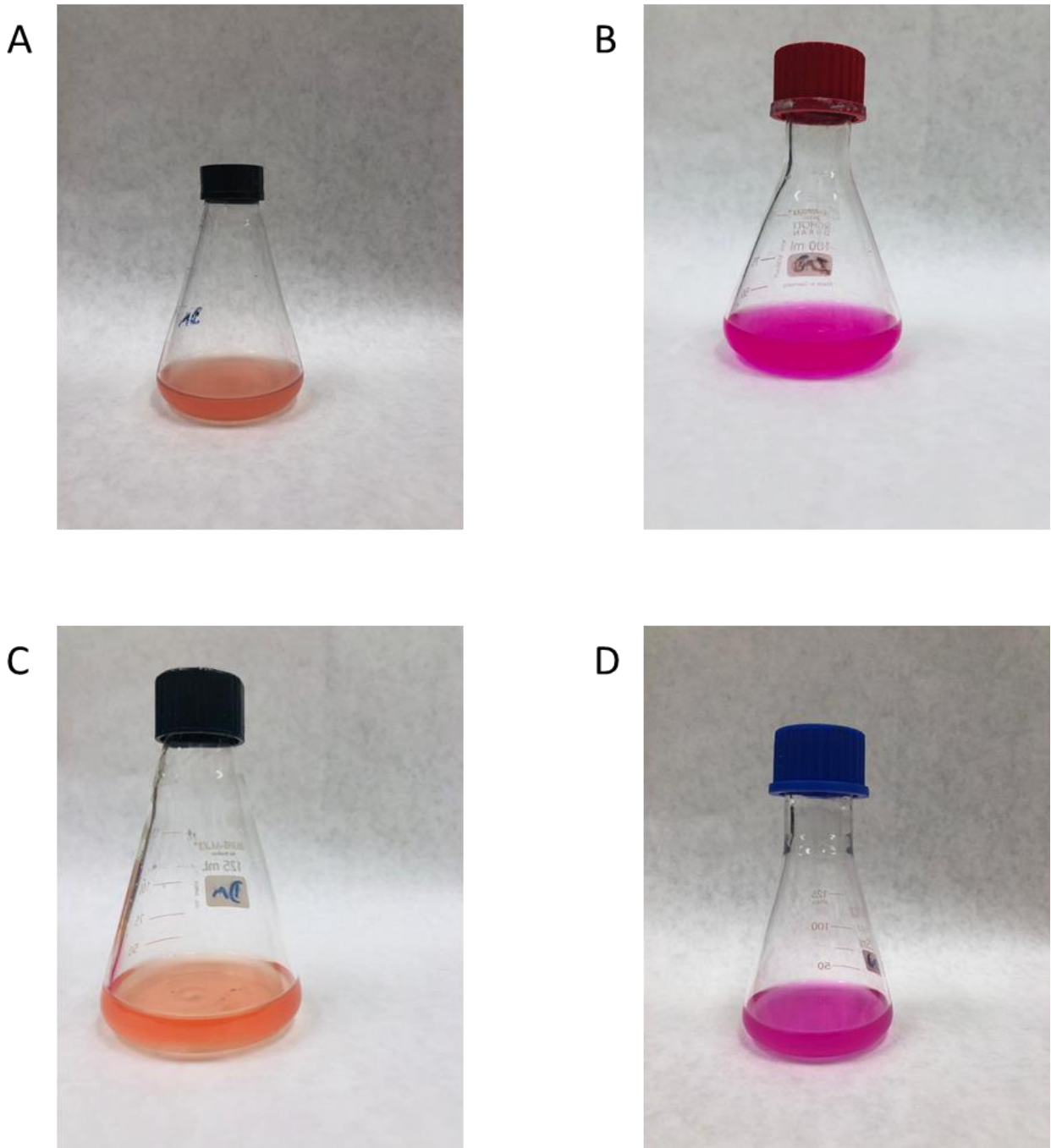
Como controle da ferramenta DeepLoc-1.0, foram escolhidas algumas proteínas conhecidas de *Sporothrix*, como calmodulina (número de acesso: A0A0C215Y7) e catalase (número de acesso: A0A0C2EZJ2) como proteínas citoplasmáticas; e glucanase (número de acesso: A0A0C2IBE4) e ubiquitina-proteína a ligase (número de acesso: F2XFB3_9PE2I) como proteínas de membrana e da urease de *C. ensiformis* (número de acesso: AAA83831.1).

5 RESULTADOS

5.1. Detecção de urease em meio de Christensen

Na primeira etapa deste trabalho foi observado o crescimento das cepas produtora (IPEC-34910) e não produtora (IPEC-45308) e a expressão fenotípica da urease avaliada pelo consumo da ureia pela urease onde ocorre liberação de amônia no meio de cultivo e conseqüente mudança de pH após 7 dias de crescimento. Verificou-se que o meio de cultivo com a cepa IPEC-34910 tornou-se roxo após liberação de amônia devido a hidrólise da ureia (Figura 5A), enquanto a cepa IPEC-45308 não foi capaz de hidrolisar a ureia, portanto entende-se que não houve liberação da amônia e o meio de cultivo manteve-se basicamente com a mesma coloração inicial (Figura 5B). O frasco com a cepa de *C. neoformans* ATCC 32045 tornou-se roxo (Figura 5C) e o frasco com *C. albicans* ATCC 18804 manteve-se fundamentalmente da mesma coloração (Figura 5D). Na Figura 5E foi demonstrado o meio sem inoculação de fungo.

Figura 5: Representação das cepas de *C. albicans* e *C. neoformans* (controles) e de *S. brasiliensis* em meio de cultura líquido de Christensen para avaliar produção de urease.

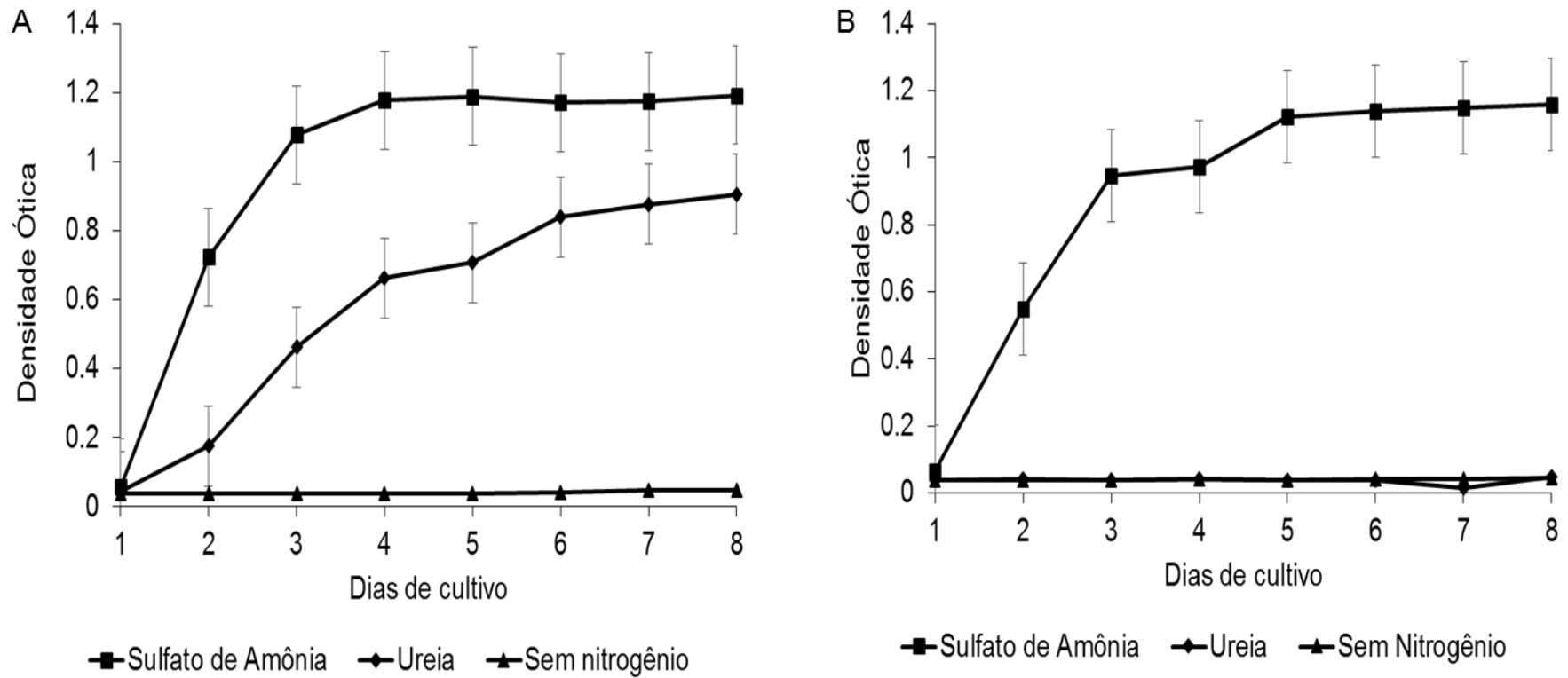


(A) Controle negativo de *Candida albicans* ATCC 18804; (B) Controle positivo de *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045 Cepa urease negativa IPEC-45308, (C) Cepa IPEC-45308; (D) Cepa IPEC-34910. Fonte: Elaboração própria.

5.2 Avaliação do crescimento das cepas de *Sporothrix brasiliensis* em diferentes condições de cultivo.

Foi avaliado também o crescimento do fungo em meio condicionado quanto à fonte de nitrogênio. Ambas as cepas, foram capazes de crescer após os 14 dias em meio de cultivo YCB com sulfato de amônia como fonte nitrogênio (YCBCP - controle positivo), mas não foram capazes de crescer sem fonte alguma de nitrogênio (YCBCN). A cepa que produz urease em caldo ureia de Christensen, IPEC-34910, foi capaz de crescer após os últimos 7 dias em YCBT tendo apenas ureia como fonte de nitrogênio, e a cepa não produtora de urease em caldo ureia de Christensen, IPEC-45308, não foi capaz de crescer em meio YCBT tendo ureia como única fonte de nitrogênio, como demonstra a Figura 6.

Figura 6: Curvas de crescimento das cepas *Sporothrix brasiliensis* IPEC-34910 (A) e IPEC-45308 (B) em diferentes meios de cultivo.

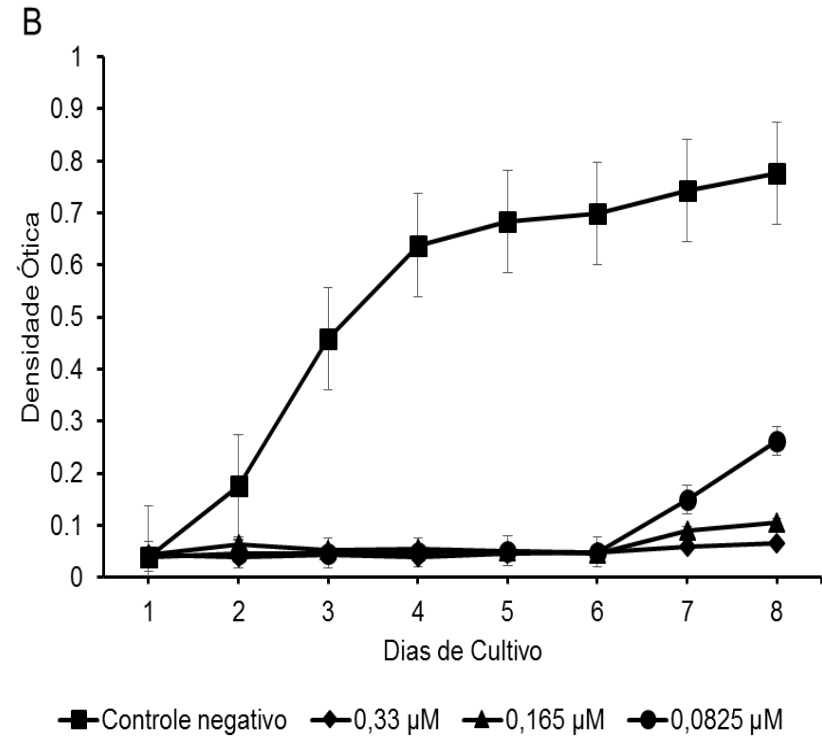
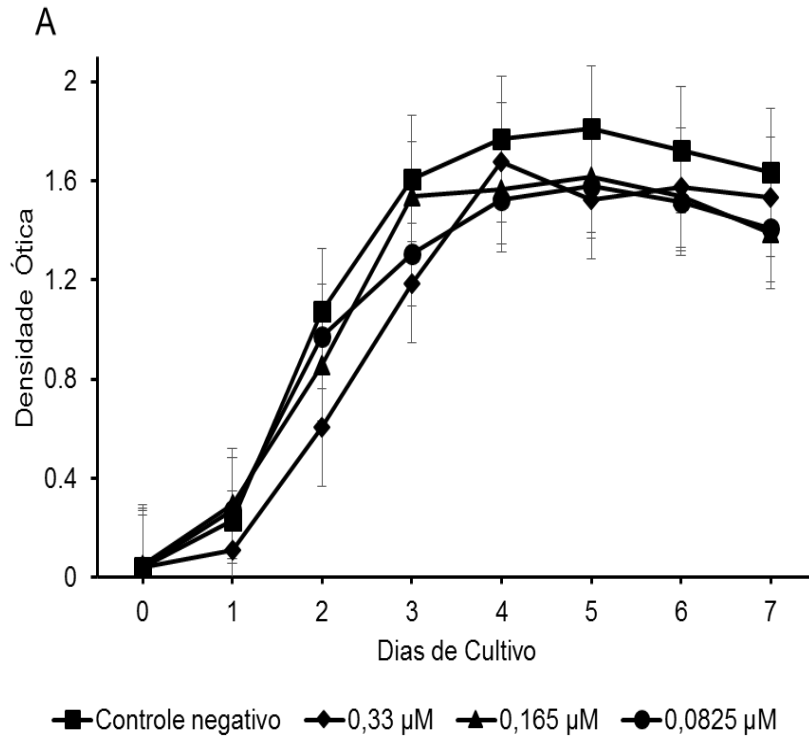


Os fungos foram submetidos a diferentes condições de crescimento em meio YCB suplementado com 2% de sulfato de amônia (■), 2 % de ureia (◆) e sem fonte de nitrogênio (▲). O crescimento dos fungos foi acompanhado durante 14 dias consecutivos, sendo o teste coletado nos últimos sete por medidas de densidade ótica a 590nm. Em A as curvas de crescimento da cepa IPEC-34910 e em B as curvas de crescimento da cepa IPEC-45308. Os resultados são expressos em média e desvio padrão de três análises independentes. Fonte: Elaboração própria.

5.3. Curva de crescimento de *S. brasiliensis* IPEC-34910 na presença do inibidor da urease

A cepa IPEC-34910 demonstrou-se capaz de crescer em meio YCB tendo sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio e ureia como única fonte de nitrogênio após sete dias, como demonstrado na Figura 7A. Por outro lado, também em YCB com a ureia como única fonte de nitrogênio e mais a adição do inibidor de urease tioureia no meio de cultivo, houve inibição do crescimento que teve o comportamento dose-dependente demonstrado também na Figura 7B.

Figura 7: Curvas de crescimento da cepa de *Sporothrix brasiliensis* IPEC-34910

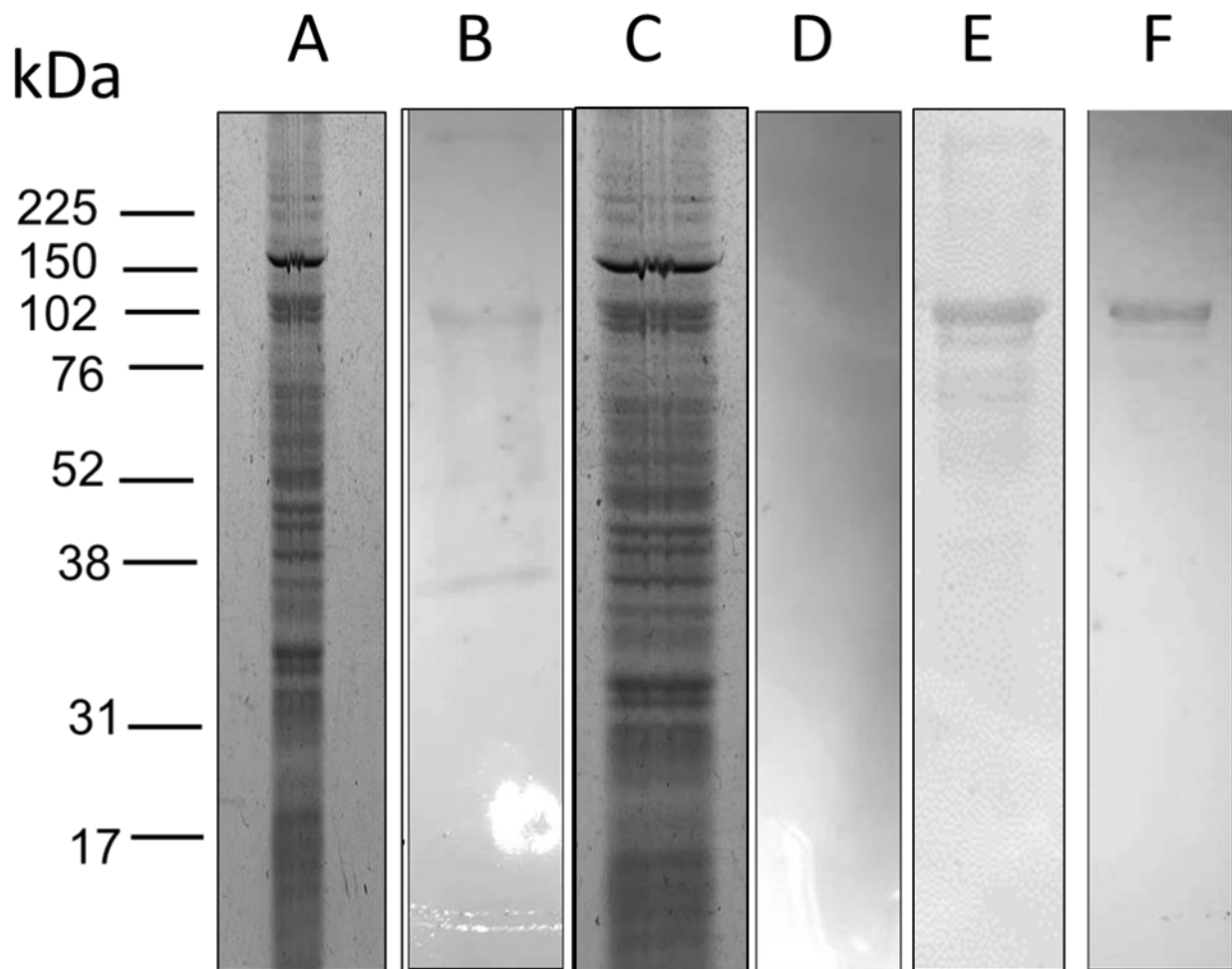


Em A o meio de cultivo YCB foi suplementado com 2% de Sulfato de amônia e com diferentes concentrações de tiourea. Em B o meio de cultivo YCB foi suplementado com 2% de ureia e com diferentes concentrações de tiourea. O crescimento dos fungos foi acompanhado durante 14 dias consecutivos, sendo o teste coletado nos últimos sete por medidas de densidade ótica a 590nm. Os resultados são expressos em média e desvio padrão de três análises independentes. Fonte: Elaboração própria

5.4. Análise bioquímica e estrutural da urease de *Sporothrix brasiliensis*

O western blot apresentou reatividade frente o extrato proteico de *S. brasiliensis* IPEC-34910, a considerada produtora de urease, uma vez que anticorpo policlonal anti-urease de *C. ensiformes* (feijão) (ThermoFisher, Califórnia, EUA) reconheceu uma proteína com massa molecular de 90kDa. Nenhuma proteína foi reativa frente ao anticorpo policlonal quando extrato proteico de *S. brasiliensis* IPEC-45308 foi testado (Figura 8). Foi utilizado como controle positivo urease purificada de *C. ensiformes* (feijão).

Figura 8: *Western blot* do extrato total das cepas do estudo e da urease comercial e purificada de *C. ensiformis*.

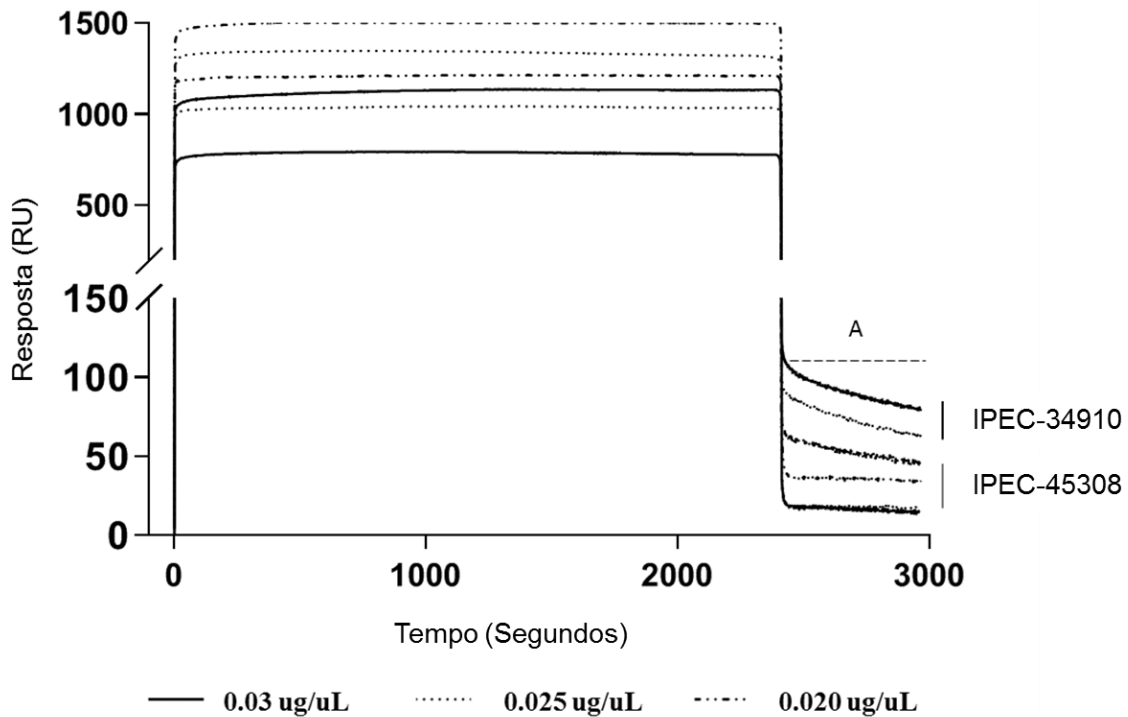


Extrato proteico de *S. brasiliensis* cepa IPEC-34910 (A), *western blot* de *S. brasiliensis* IPEC-34910 com anticorpo policlonal específico para urease de *C. ensiformis* (B), extrato proteico de *S. brasiliensis* cepa IPEC-45308 (C), *western blot* de *S. brasiliensis* IPEC-45308 com anticorpo policlonal específico para urease de *C. ensiformis* (D), urease purificada de *Canavalia ensiformis* (E), *western blot* de *C. ensiformis* (F). Em A, C e E as amostras foram analisados por SDS-PAGE 10%, seguido por coloração da prata. Fonte: Elaboração própria

5.5. Análise por ressonância plasmônica de superfície

A proteína urease das cepas de *S. brasiliensis* IPEC-34910 e IPEC-45308, conforme descrito nas sessões anteriores, demonstrou, pelo ensaio de *western blot*, reatividade apenas na cepa IPEC-34910, positiva para urease em meio de cultivo de Christensen. Contudo, os dados de SPR mostraram a presença de urease no extrato bruto de ambas as cepas de *S. brasiliensis* utilizadas no trabalho (Figura 9 e Tabela 2). Os gráficos do sensorgrama de ligação, após a injeção de proteínas em um *chip* de superfície sensibilizado com anticorpo policlonal anti-urease de feijão (*Canavalia ensiformis*), indicaram valores de unidades de ressonância (RU) de 6 - 0,3 ng/ μ L de proteína. A reatividade cruzada de anticorpos foi detectada em ambos os extratos de proteína *S. brasiliensis* em todas as concentrações analisadas (Figura 9 e Tabela 2). Os dados de SPR indicaram valores mais altos de RU relacionados às preparações de proteínas da cepa IPEC-34910 em comparação com a cepa IPEC-45308. Embora os valores de RU não indiquem uma maneira dose-resposta do reconhecimento de antígeno-anticorpo, foi possível detectar uma diferença significativa ($p < 0,001$) indicando um nível mais alto de detecção de urease na cepa IPEC-34910, forte produtora de urease pelos meios de cultivo convencionais. Foram realizados ensaios de controle para avaliar a especificidade da ligação nos ensaios de SPR. A reatividade do controle positivo (urease de feijão) foi confirmada usando anticorpo IgG específico imobilizado na superfície do *chip*, mostrando sinais de uma ligação dose-dependente.

Figura 9: Análise dos homólogos da urease de *Sporothrix brasiliensis* por ressonância plasmônica de superfície.



Os *chips* do sensor foram cobertos com anticorpo anti-urease de *Canavalia ensiformis* (feijão) e dois extratos brutos da forma de levedura, um positivo para a urease (*Sporothrix brasiliensis* IPEC-34910) e um negativo para a urease (*Sporothrix brasiliensis* IPEC-45308) foram passados sobre a superfície do chip. As proteínas foram testadas em três concentrações [0,03 µg / µL (—), 0,025 µg/µL (---), 0,02 µg/µL (— · —)], mostrando uma diminuição significativa nas taxas de ligação de anticorpos - (*), $p < 0,001$. Os dados são apresentados como unidades de ressonância arbitrária (RU) e são representativos de dois experimentos independentes. Os valores de RU de dissociação são representativos da resposta média entre 2500 e 3000 segundos (A) em todos os ensaios. Fonte: Elaboração própria

Tabela 2: Análise quantitativa da detecção de urease de *Sporothrix brasiliensis* por reatividade cruzada com anticorpo policlonal anti-urease. Fonte: Elaboração própria

	Concentração ($\mu\text{g}/\text{uL}$)	^a RU	Proteína (ng/mm^2)
<i>S. brasiliensis</i> IPEC-45308	0.30	18.7 \pm 0.7	0.02 \pm 0.0002
	0.25	20.2 \pm 0.2	0.02 \pm 0.0002
	0.20	33.7 \pm 1.4	0.03 \pm 0.0003
<i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910	0.30	106.6 \pm 2.2	0.106 \pm 0.010
	0.25	61.4 \pm 0.25	0.061 \pm 0.006
	0.20	88.3 \pm 1.60	0.088 \pm 0.009

5.6. Caracterização da expressão gênica da urease de *Sporothrix brasiliensis* (IPEC-34910 e IPEC-45308)

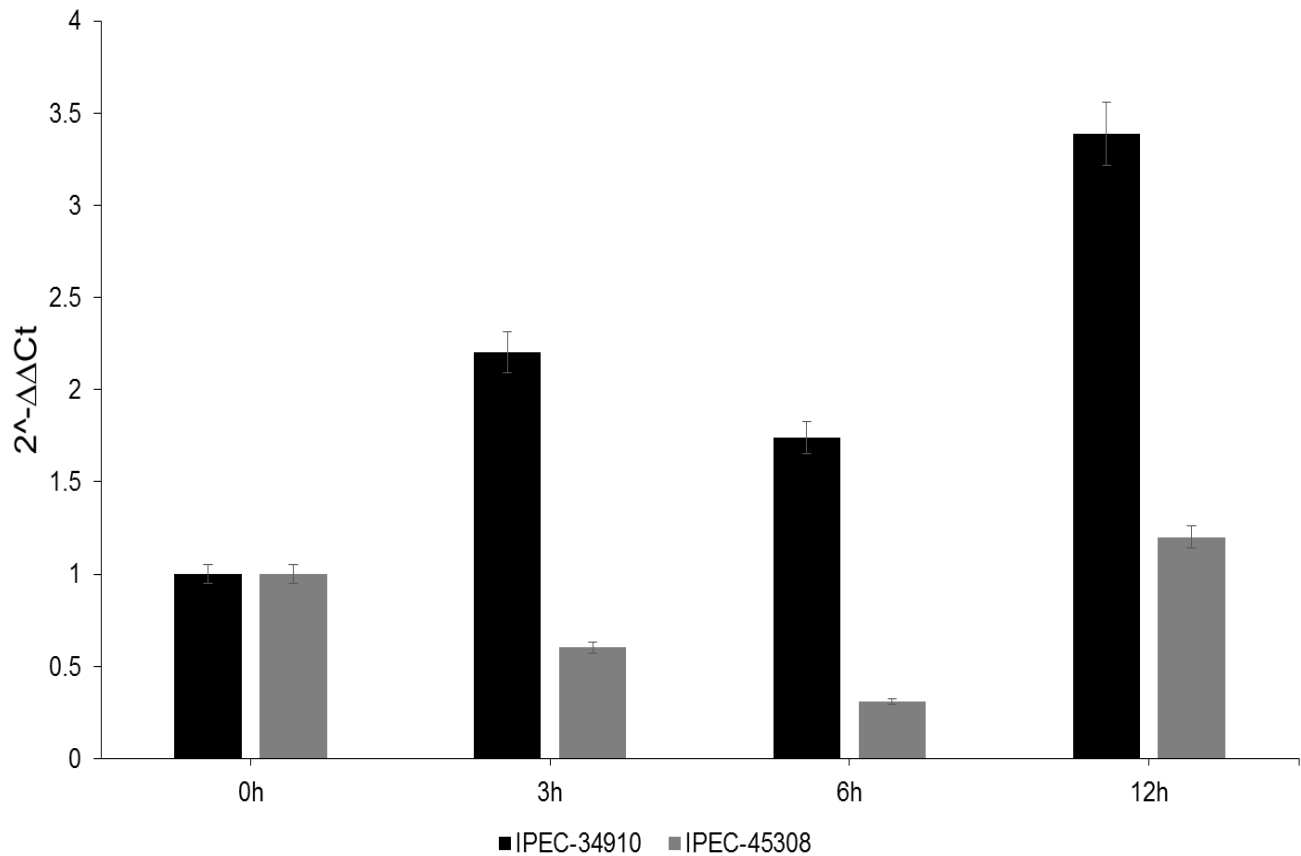
A partir do fluxograma descrito na Figura 4, esperamos que a quantidade de nitrogênio endógeno, proveniente do meio de cultivo rico em nutrientes no fungo cesse, já que sua única fonte de nitrogênio durante 13 dias seguidos era somente sulfato de amônio.

Todos os genes apresentaram alguma variação nos ciclo de amplificação nos pontos coletados para o estudo (L6 e L34) ou apresentaram dímeros na curva de *melting* sugerindo que houve amplificação inespecífica (GAPDH) com excessão do iniciador que amplifica para o gene de referência EF1A (*Elongation Factor 1A*). Com isso EF1A foi escolhido para o restante do estudo, por não apresentar dímeros de amplificação na curva de *melting*, sugerindo que não há amplificação inespecífica, e apresentou pouca variação no ciclo de amplificação em cada ponto do estudo.

Foi avaliado então a eficiência da reação, que como dito estabelece se os produtos estão sendo amplificados de forma exponencial, isto é, a cada ciclo dobram em quantidade. Com as diluições de cDNA estabelecidas, foi observado que a eficiência da reação para urease é de 108% e de EF1A é de 115%.

Visto isso, foi realizada a qPCR com as cepas IPEC-34910 e IPEC-45308, e o resultado foi obtido após o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que se calcula a expressão gênica do gene de interesse em função do gene constitutivo escolhido. Ambas cepas demonstraram expressão de transcrito para urease, porém a cepa que no meio de cultivo de Christensen se apresenta como forte produtora (IPEC-34910) teve a expressão gênica duas vezes maior que a cepa considerada negativa no meio de cultivo de Christensen (IPEC-45308) em cada tempo de estudo (Figura 10).

Figura 10: Reações PCR quantitativa em tempo real com as cepas do estudo.



Calculos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ demonstrando a quantificação de transcrito de urease nas cepas IPEC-34910, considerada produtora de urease e na cepa IPEC-45308, considerada não-produtora de urease. Fonte: Elaboração própria

5.7 Aspectos estruturais e funcionais da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis*

O presente estudo utilizou uma abordagem *in silico* para caracterizar ainda mais a urease de *S. brasiliensis* (KIH89566.1) depositada no banco de dados de proteínas do NCBI. As sequências apresentaram valores de pI variando de 5,44 a 6,45, com a urease de *S. brasiliensis* apresentando pI = 5,89. A estrutura secundária prevista nas sequências analisadas e em nosso modelo indicou predominância de α -hélice (25,16 a 33,21%, *S. brasiliensis*: 28,93%) e *coils* aleatórios (40,33 a 44,94%, *S. brasiliensis*: 41,79%). Entre as 22 sequências analisadas, todas apresentaram índices GRAVY negativos (-0,011 a -0,308, *S. brasiliensis*: -0,087), indicando ausência de regiões hidrofóbicas. Por outro lado, apresentam valores de índice alifático que variam de 78,11 a 91,46 (*S. brasiliensis*: 90,45), definido como o volume relativo ocupado pelas cadeias laterais alifáticas (alanina, valina, isoleucina e leucina), que auxiliam a mensurar a termoestabilidade dessas proteínas, ou seja, quanto maior o valor de índice alifático maior a probabilidade desta proteína manter-se estável em temperaturas mais altas. Todas as sequências apresentaram peso molecular variando de 86,93 a 141,54 KDa (*S. brasiliensis*: 90,75 KDa) (Tabela 3).

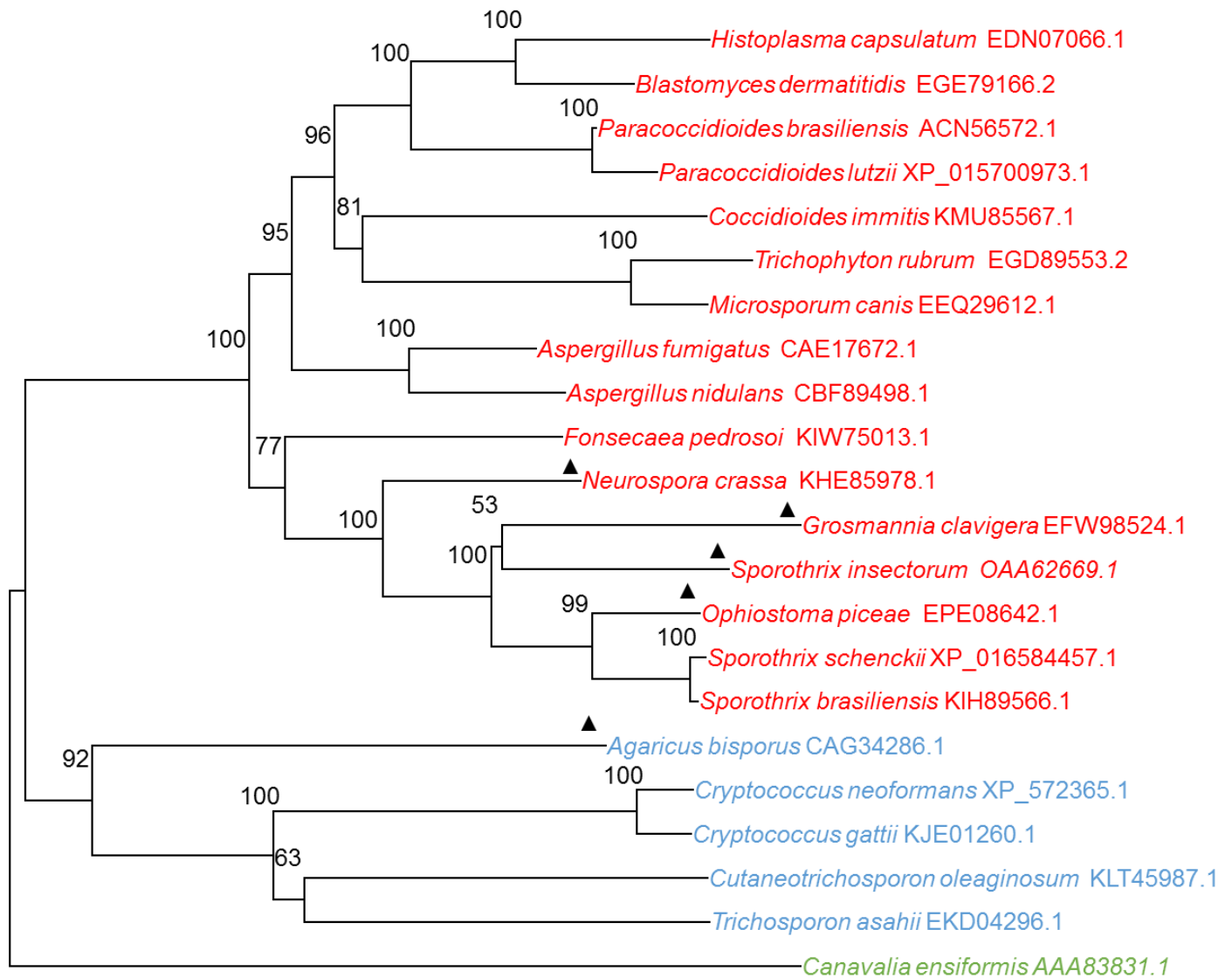
Uma análise filogenética mostrou que as ureases de ascomicetos e basidiomicetos foram separadas em dois grandes clados monofiléticos, com suporte de *bootstrap* de 92% e 100%, utilizando *Canavalia ensiformis* como grupo externo (Figura 11). Como esperado, a urease de *S. brasiliensis* agrupou-se com outros membros da família Ophiostomataceae.

Tabela 3: Comparação entre as ureases de fungos e de *C. ensiformis*.

Nome da espécie	Número de Acesso	Tamanho da Sequencia	MM (kDa)	Índice alifático	GRAVY	Alfa hélice (%)	Porções estendidas (%)	Folhas beta (%)	Coil randômico (%)	pl
<i>Agaricus bisporus</i> *	CAG34286.1	838	90,20	91,46	-0,154	28,28	20,41	8,95	42,36	5,77
<i>Aspergillus fumigatus</i> **	CAE17672.1	838	90,54	85,64	-0,19	28,64	21,12	8,95	41,29	5,67
<i>Aspergillus nidulans</i> **	CBF89498.1	836	90,98	84,82	-0,224	28,47	20,81	9,45	41,27	5,85
<i>Blastomyces dermatitidis</i> **	EGE79166.1	836	91,99	84,21	-0,206	28,47	20,45	9,57	41,51	5,88
<i>Canavalia ensiformis</i>	AAA83831.1	840	90,76	90,48	-0,147	29,76	20,36	8,45	41,43	6,05
<i>Coccidioides immitis</i> **	KMU85567.1	837	91,14	84,90	-0,219	28,91	20,43	9,20	41,46	5,72
<i>Cryptococcus gattii</i> **	KJE01260.1	833	90,31	86,99	-0,205	29,41	20,29	9,96	40,34	5,64
<i>Cryptococcus neoformans</i> **	XP_572365.1	833	90,53	85,81	-0,201	29,29	20,29	9,48	40,94	5,51
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosum</i> **	KLT45987.1	834	90,39	87,24	-0,24	29,50	20,50	9,23	40,77	5,49
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> **	KIW75013.1	1301	141,54	82,92	-0,301	33,21	16,83	8,76	41,20	6,45
<i>Grosmannia clavigera</i> *	EFW98524.1	853	90,39	92,22	-0,011	28,84	19,93	9,26	41,97	5,80
<i>Histoplasma capsulatum</i> **	EDN07066.1	999	109,81	81,90	-0,308	27,53	18,82	8,71	44,94	6,44
<i>Microsporum canis</i> **	EEQ29612.1	836	91,90	85,38	-0,194	28,83	20,1	9,09	41,99	5,73
<i>Neurospora crassa</i> *	KHE85978.1	842	90,81	86,33	-0,132	29,22	20,67	8,79	41,33	5,84
<i>Ophiostoma piceae</i> *	EPE08642.1	840	90,80	90,23	-0,066	29,17	20,95	9,29	40,6	5,69
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> **	ACN56572.1	836	90,62	82,58	-0,206	29,43	20,33	9,33	40,91	5,90
<i>Paracoccidioides lutzii</i> **	XP_015700973.1	795	86,93	78,11	-0,269	25,16	21,38	8,81	44,65	5,65
<i>Sporothrix brasiliensis</i> **	KIH89566.1	840	90,75	90,45	-0,087	28,93	20,12	9,17	41,79	5,89
<i>Sporothrix insectorum</i> *	OAA62669.1	838	88,95	86,41	-0,104	29,00	20,41	10,26	40,33	5,71
<i>Sporothrix schenckii</i> **	XP_016584457.1	841	90,67	90,12	-0,094	28,54	20,33	9,04	42,09	5,92
<i>Trichophyton rubrum</i> **	EGD89553.2	854	92,69	87,00	-0,188	28,34	20,84	9,25	41,57	5,71
<i>Trichosporon asahii</i> **	EKD04296.1	813	88,96	84,56	-0,282	29,64	19,07	9,23	42,07	5,58

Em cinza destacada as sequencias de urease de *C. ensiformis* (feijão) e de *S. brasiliensis*. (*) Fungos não patogênicos ao homem; (**) Fungos patogênicos ao homem. Fonte: Elaboração própria

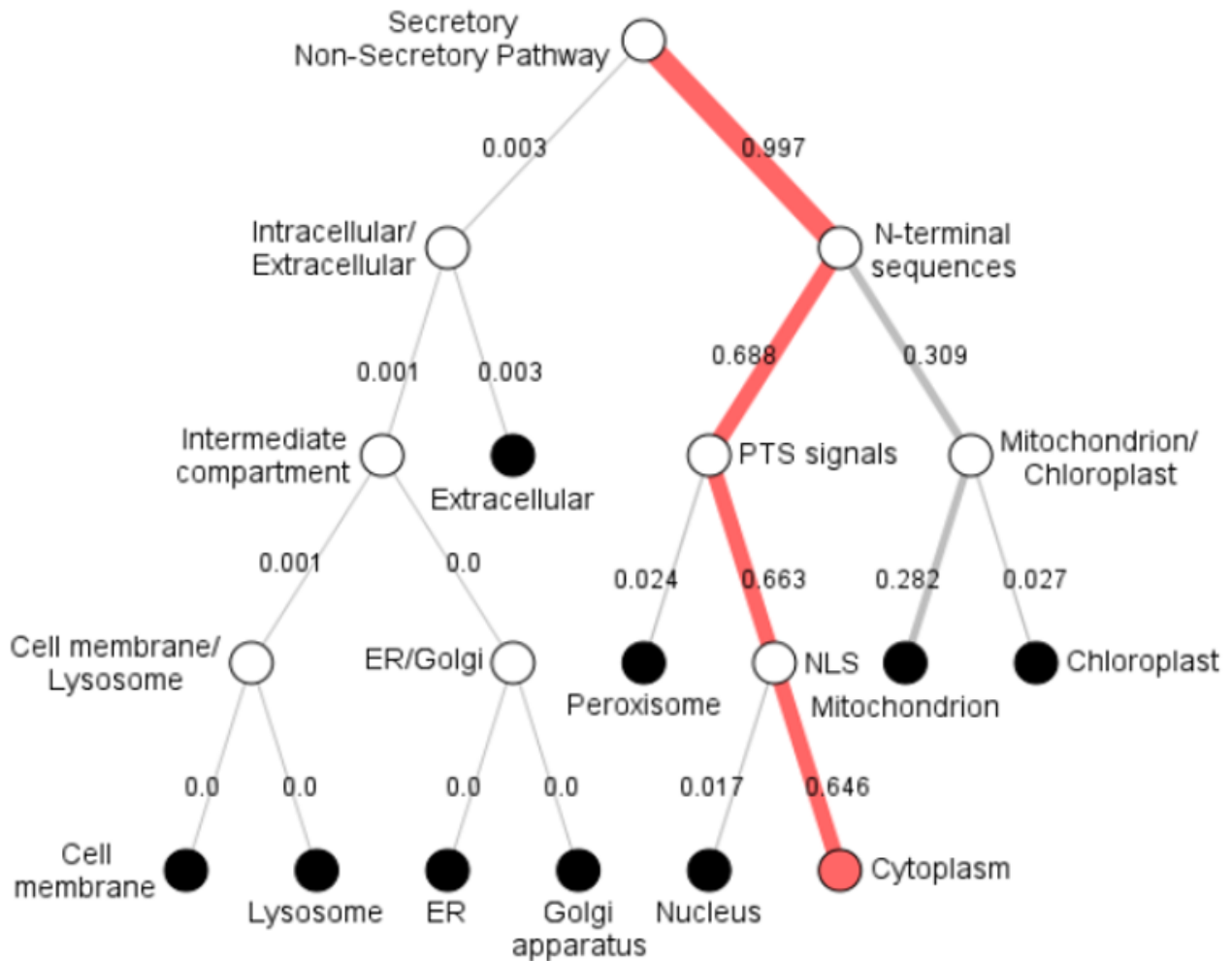
Figura 11: Árvore filogenética das ureases de fungos patogênicos e não patogênicos e de *C. ensiformis*.



Em vermelho urease de fungos do filo Ascomycota, em azul urease de fungos do filo basidiomicota e em verde a urease de feijão, pertencente ao grupo vegetal angiosperma. ▲: destacam os fungos não patogênicos ao homem. Fonte: Elaboração própria

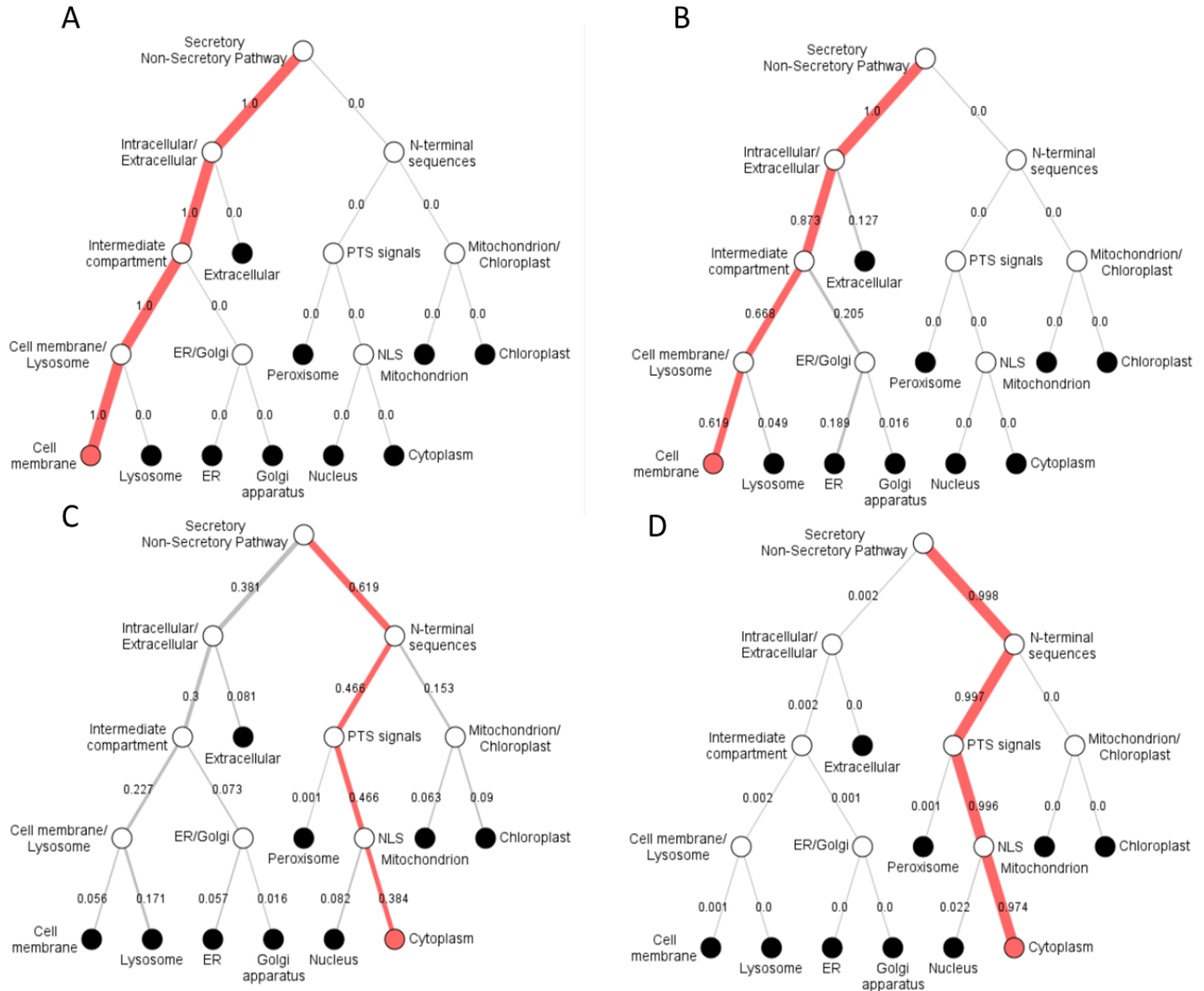
Além disso, uma predição da localização celular da urease de *S. brasiliensis* foi realizada com base na sequência de aminoácidos da proteína. Os cálculos preditivos indicaram que a proteína está localizada no citoplasma (0,646), que foi baseada apenas nas propriedades da sequência, usando uma rede neural profunda fornecida pelo servidor DeepLoc-1 (Figura 12). A precisão dessas análises foi avaliada com quatro proteínas de *S. brasiliensis*, todas com localização subcelular definida experimentalmente: a ubiquitina-proteína ligase de *S. brasiliensis* (número de acesso: F2XFB3_9PE2I) (Figura 13A) e a glucanase de *S. brasiliensis* (número de acesso: A0A0C2IBE4) (Figura 13B) foram preditas como proteínas de membrana (1,00 e 0,619 respectivamente) já a catalase (número de acesso: A0A0C2EZJ2) (Figura 13C) e a calmodulina (número de acesso: A0A0C215Y7) (Figura 13D) foram categorizadas como proteínas citoplasmáticas pela análise *in silico* (0,384 e 0,974 respectivamente). Após confirmar a precisão da análise, a urease de *C. ensiformis* também foi predita como citoplasmática (0,711) (Figura 14).

Figura 12: Previsão da localização subcelular da urease de *Sporothrix brasiliensis*



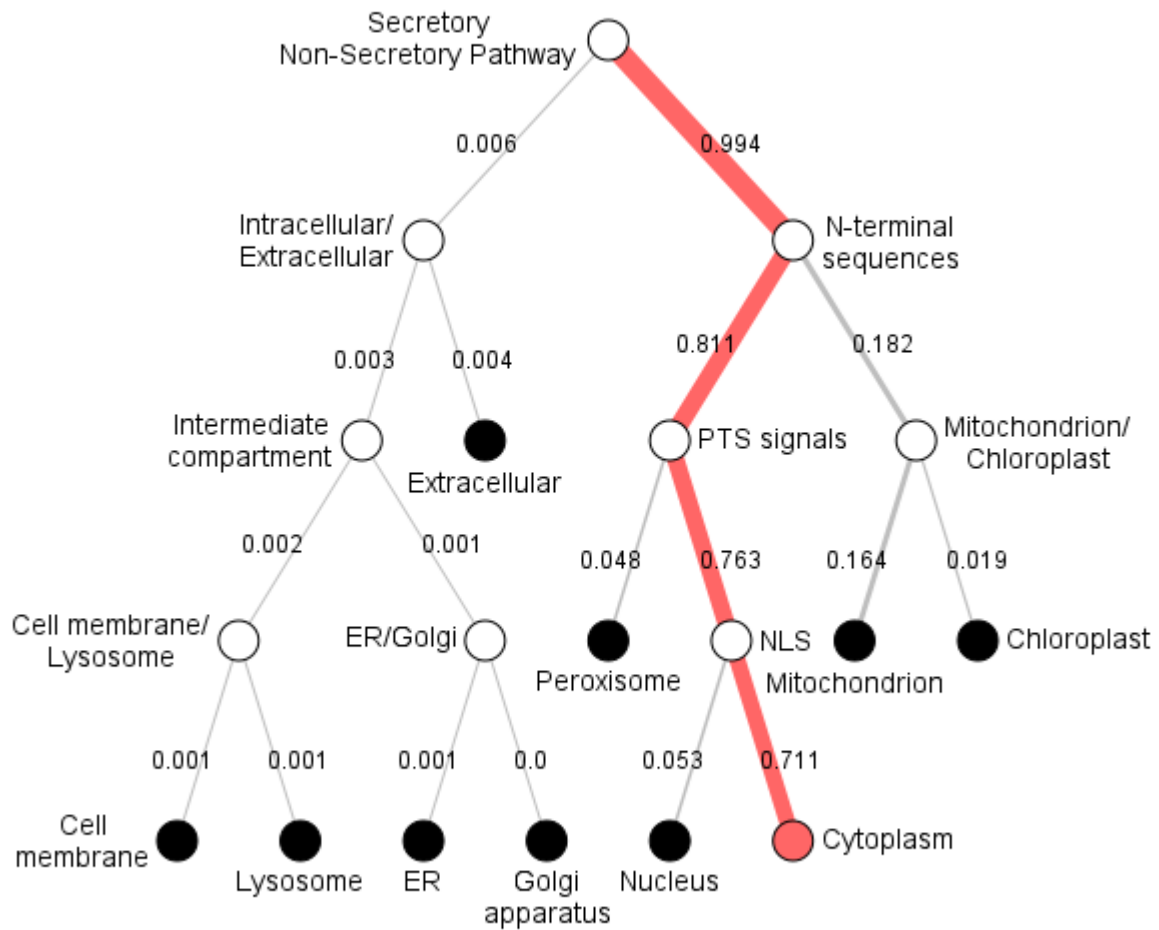
Prevê-se que a urease de *S. brasiliensis* esteja localizada no citosol, por análise com o servidor DeepLoc-1. Árvore hierárquica de predição de proteínas localizadas em compartimentos celulares. As linhas vermelhas mostram os caminhos mais prováveis das proteínas na célula calculadas pelo programa. Fonte: Elaboração própria

Figura 13: Previsão da localização subcelular de proteínas *Sporothrix brasiliensis*



Proteínas de *S. brasiliensis* foram previstas por análise com o servidor DeepLoc-1. Árvore hierárquica de predição de proteínas localizadas em compartimentos celulares. As linhas vermelhas mostram os caminhos mais prováveis das proteínas na célula calculadas pelo programa. Na ubiquitina-proteína ligase em A, na glucanase em B, na catalase em C e na calmodulina em D. Fonte: Elaboração própria.

Figura 14: Previsão da localização subcelular da urease de *Canavalia ensiformis*



A urease de *C. ensiformis* foi prevista por análise como servidor DeepLoc-1. Árvore hierárquica de predição de proteínas localizadas em compartimentos celulares. As linhas vermelhas mostram os caminhos mais prováveis da proteína na célula calculadas pelo programa, que neste caso é o citoplasma celular. Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

A esporotricose se tornou nos últimos anos, uma doença de enorme relevância para as políticas públicas do Brasil, especialmente no estado do Rio de Janeiro, onde se encontra hiperendêmica. Para que tenha sucesso, é necessário que se conheça aspectos biológicos e fisiológicos do seu agente etiológico *S. brasiliensis*, sobretudo por ser o mais circulante no Brasil (CHAKRABARTI et al., 2015), tais conhecimentos básicos são necessários pois esclarecem alternativas para novas propostas de diagnóstico, alvos vacinais e podem orientar prognósticos mais graves desta micose.

A ausência de estudos bioquímicos sobre a expressão e secreção de proteínas e enzimas em fungos, especialmente os do gênero *Sporothrix*, pode estar impedindo a verificação de tais proteínas na fisiologia, metabolismo e patogênese desses modelos. O presente estudo apresenta evidências de que a urease é produzida pelas cepas de *S. brasiliensis*, independentemente do comportamento fenotípico em caldo ureia de Christensen.

É interessante notar que, embora a urease tenha sido detectada a nível genômico e transcriptômico em cepa de *S. brasiliensis* que não foi capaz de hidrolisar a ureia em meio de Christensen (OLIVEIRA, 2016). A cepa IPEC-45308 também incapaz de hidrolisar a ureia em meio de Christensen não utilizou esta enzima em seu metabolismo quando em condições de cultivo em que a ureia era a única fonte de nitrogênio não havendo crescimento após 7 dias, comportamento diferente daquele observado na cepa IPEC-34910. Possivelmente, esta cepa pode estar sob controle pós-traducional, semelhante ao que ocorre nas células eucarióticas na regulação após produção e a secreção da proteína pelo complexo golgiense (LIU et al., 2019). Demonstrou-se que modificações nos padrões de expressão gênica ocorrem juntamente com sucessivas divisões mitóticas ou meióticas, sem envolver alterações na sequência base do DNA através de mecanismos epigenéticos que envolvem a ubiquitinação de histonas, tornando a remodelação da cromatina mais eficaz, acessível ou refratária à transcrição (HOLLIDAY et al., 2006). Além disso, os resultados observados nos ensaios de SPR corroboram o fato de que a proteína está sim sendo traduzida após a transcrição do DNA e os

processos pós transcricionais, a princípio, parecem estar acontecendo de forma normal, contudo esta proteína pode não estar tendo, na cepa IPEC-45308, um papel funcional.

A urease parece ser extremamente importante para o crescimento fúngico, já que, sua falta ou deficiência na cepa IPEC-45308, a impediu de crescer em meio de cultivo cujo a ureia era a única fonte de nitrogênio disponível. Para se obter o contraponto, a cepa considerada positiva para urease, IPEC-34910, foi submetida à crescimento em meio de cultivo com ureia como única fonte de nitrogênio, contudo com concentrações distintas de um inibidor da urease chamado tioureia, composto orgânico composto de carbono, nitrogênio, enxofre e hidrogênio, com a fórmula CSN_2H_4 ou $(NH_2)_2CS$ similar à ureia, exceto que o átomo de oxigênio é substituído por um átomo de enxofre. Com isso, a tioureia tem sido utilizada como um competidor bem conhecido da ureia, já que a urease é uma enzima específica para a ureia, capaz de catalisar apenas reações deste substrato, ou seja, não sendo capaz de catalisar reações nem mesmo com uma molécula parecida com a ureia, como a tioureia (AKHTAR et al., 2008). Por conta das propriedades descritas, muitas vezes a tioureia é usada para inibir a hidrólise da ureia pela urease e para observar o crescimento de microrganismos nessas condições (GRIFFITH et al., 1973; AKHTAR et al., 2008). Esse ensaio mostrou que conforme a urease foi sendo inibida pela ação da tioureia, o fungo não foi capaz de crescer normalmente como no controle positivo, sem a tioureia. Este ensaio mostra que em um meio com ureia como única fonte de nitrogênio, a urease é determinante para o crescimento fúngico.

Além disso, a urease de *S. brasiliensis* possui epítomos reconhecidos pelo anticorpo policlonal anti-urease de feijão. Este achado indica que ambas as proteínas reservam certa similaridade estrutural, seja na sua estrutura linear e/ou conformacional na organização dos epítomos, já que foram identificadas pela reação antígeno anticorpo nos ensaios propostos de *western blot* (apenas cepa IPEC-34910) e de SPR (ambas cepas).

A estratégia experimental proposta neste estudo permitiu observar limitações do método de Christensen (CHRISTENSEN et al., 1946; KANE; FISCHER, 1971), no entanto, apesar dessas limitações, o método de Christensen que define agentes produtores e não produtores de urease é um método bem conhecido, estabelecido e

largamente aplicado no diagnóstico e diferenciação de várias amostras microbiológicas em laboratório (DUNN; PHADNIS, 1998; FU et al., 2018). Embora essa abordagem colorimétrica, em conjunto com o ensaio *western blot*, caracterize a cepa IPEC-45308 como não produtora de urease e a cepa IPEC-34910 como produtora de urease, a presença dessa proteína foi confirmada em ambos fungos pelo teste de SPR proposto neste estudo.

A principal vantagem do SPR, utilizada como ferramenta para detecção de proteínas, é sua capacidade de medir interações moleculares em tempo real em ambientes complexos, como misturas de proteínas encontradas em extratos de fungos. De fato, essa é uma abordagem de escolha para estudos em sistemas dinâmicos, pois detecta interações fracas e fortes que podem variar em concentrações desde milimolar até nanomolar (OHLSON et al., 1997; PEESS et al., 2015; SANTOS-DE-SOUZA et al., 2019). Nosso trabalho utiliza esta propriedade, já que pequenas concentrações de urease na cepa IPEC-45308 foram rastreadas e detectadas pela SPR, o que não foi possível através da técnica de *western blot*. A diferença entre as duas metodologias pode ser explicada pela alta sensibilidade da SPR e sua capacidade de detectar epítomos conformacionais e lineares de proteínas que podem estar ligados a nitrocelulose e não expostos ao reconhecimento dos anticorpos. O método de detecção de proteínas também pode interferir nestes resultados, já que em *western blot* utilizamos as proteínas desnaturadas e o SPR foi realizado com o extrato de proteínas nativas dos fungos. Contudo o fato de termos observado a proteína na cepa IPEC-34910 e não na cepa IPEC-45308 corrobora com a hipótese da quantidade de proteína.

Os achados da SPR foram confirmados pela detecção de mRNA da urease em ambas as cepas por PCR quantitativo. Foi possível detectar os seus transcritos na forma de DNA complementar (cDNA), indicando que, o gene além de presente está sendo expressos em condições de cultura *in vitro* independentemente da reatividade observada no caldo de ureia de Christensen por essas cepas.

A presença de transcritos em ambas cepas, em todos os tempos de estudo inclusive no tempo 0 hora de coleta, no qual não tem ureia como fonte de nitrogênio, apenas sulfato de amônia por 12 dias consecutivos, sugere que este gene tenha, ao menos *in vitro* a expressão constitutiva, ou seja o gene da urease é continuamente

expresso em *S. brasiliensis* independente do meio de cultura ou da fonte de nitrogênio disponível. Isto posto, corrobora com a tese, sugerida neste trabalho, que a urease possui extrema importância no metabolismo de *S. brasiliensis*, que pode ir além da captação de nitrogênio. Apesar desse gene já ter sido demonstrado com expressão constitutiva em outros modelos como na planta *Glycine max* (soja) por Goldraij e colaboradores em 2003 e em bactérias das espécies *Morganella morganii* (ROSENSTEIN et al., 1981) e *H. pylori* (BEER-DAVIDSON et al., 2017), em fungos, pouco foi demonstrado sobre a necessidade ou não de indução do gene da urease. Exemplificando, Reinert e Marzluf (1975) estudando gene ure em *Neurospora crassa* e Seazzocchio e Darlington (1968) em *Aspergillus nidulans* não foram categóricos em afirmar se este é um gene constitutivo ou não, chegando a conclusão de que nesses dois modelos se não for constitutivo, esse gene depende de uma indução muito fraca para que seja produzido RNA mensageiro que codifica para urease. Portanto, destacamos que nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a expressão constitutiva do gene codificador da urease em cepas de *Sporothrix brasiliensis*, sobretudo em condições estressantes as quais os fungos foram submetidos, o que corrobora com a hipótese trazida pelo nosso grupo de que no nosso modelo a urease é codificada por um gene que não depende de indução externa para ser produzido. Essa hipótese também foi fortalecida pelas observações sobre sua expressão em meio de cultivo BHI, que teoricamente, por ser um meio rico, o fungo teria disponibilidade de outras fontes de nitrogênio, não somente urease, e mesmo assim foi detectada a produção deste RNA mensageiro após 5 dias de crescimento (OLIVEIRA, 2016).

Em adição, a cepa IPEC-34910, produtora de urease detectada pelos métodos tradicionais, expressa mais transcritos que decodificarão para esta proteína do que a cepa IPEC-45308 nas mesmas condições experimentais sugerindo fortemente que esta enzima está presente na célula fúngica em baixas concentrações, e isto pode ser uma razão pela qual não foi detectada pelo *western blot*, podendo explicar também a incapacidade de crescer com a ureia como única fonte de nitrogênio, porém estudos complementares se fazem necessários, principalmente aumentando o número de cepas e condições de cultivo. A falta de atividade enzimática, apesar da presença do transcrito e da enzima, mesmo que em menor quantidade, pode ser explicada por alguns motivos,

como o controle pós-traducional já descrito, ou a atuação das proteínas acessórias da urease, que poderia, neste caso, inibir a ação direta da urease na hidrólise da ureia.

Já foi demonstrado que a urease, para ter a sua atividade enzimática funcionando em sua plenitude, depende da ação de proteínas acessórias. Em bactérias como a *Klebsiella aerogenes*, foram detectadas um conjunto de proteínas (UreD, UreF, UreG e UreE) que formam junto com a urease um complexo de atividade enzimática em que a apoenzima (urease) metaboliza a ureia, porém com o auxílio direto dessas outras proteínas, em que cada uma pode ter uma função específica. Em fungos já foram observadas as mesmas proteínas acessórias a urease sendo que, recebem um nome distinto, URE4, URE5, URE6 e URE7, respectivamente. A deleção de pelo menos uma dessas proteínas resultou em atividade enzimática indetectável na bactéria supracitada (CHANG et al., 2004).

Um exemplo muito bem estabelecido de proteínas acessórias de urease pode ser observado em fungos da espécie *Cryptococcus neoformans*. Nesses fungos, apenas a presença de ureia não é determinante para a produção de urease, contudo, a presença da ureia e de proteínas acessórias, como URE4, URE6 e URE7 são imprescindíveis para que esta enzima seja produzida e funcional. Vale ressaltar a propriedade da URE7 de ligar o íon níquel ao sítio catalítico da enzima, para que a ureia seja metabolizada (SINGH et al., 2013). Portanto, os resultados aqui descritos sugerem que a ausência de atividade enzimática da urease na cepa IPEC-45308 pode estar relacionada às proteínas acessórias da urease. Para responder a essas questões, outras investigações precisam ser realizadas, especialmente uma descrição de toda a sequência do gene da urease, bem como das regiões flangeadoras de cepas com produções discordantes de urease em meio de cultivo de Christensen. Assim como a caracterização molecular e genética das proteínas acessórias, bem como o nível de produção de transcrito e nível de produção proteica de cada uma dessas proteínas. Portanto, estudos são necessários acerca destas proteínas acessórias da urease no gênero *Sporothrix*, para a elucidação do metabolismo da ureia nestes fungos, estudos estes trarão maior entendimento sobre o papel desse complexo proteico, urease mais proteínas acessórias, na virulência desses microrganismos. Isto posto, cabe a reflexão de que a função da urease, nesses fungos vai além da produção da enzima ou de seus transcritos bem como da disponibilidade da

ureia, mas da formação de um complexo enzimático em que todas essas proteínas juntas são responsáveis por esse metabolismo de captação de nitrogênio, tão importante para o microrganismo.

As análises *in silico* realizadas neste estudo demonstram que a enzima urease é bem conservada entre as espécies de fungos estudadas e de *Canavalia ensiformis*, já que as sequências de aminoácidos analisadas apresentam alta homologia/similaridade entre si. Esta conservação entre espécies diferentes de fungos e até em reinos diferentes, entre Reino Vegetal e Reino Fungi, é um indício forte de que esta proteína tem uma importância ímpar na fisiologia desses seres, pois mesmo com uma biologia completamente diferente em termos nutritivos, autotrofismo e heterotrofismo respectivamente, mantém essa enzima bem conservada e sendo constantemente produzida. Sendo assim, possivelmente esta enzima tem a importância na nutrição dos fungos no meio ambiente, principalmente na captação de nitrogênio, bem como na geração de microambientes em que a quebra da ureia pela urease gera amônia, que alcaliniza o pH do meio ambiente, sobretudo em madeiras em decomposição por ácido oxálico (ARANTES; MILAGRES, 2009). O ácido oxálico, na natureza demonstra ser importante para o crescimento de hifas, já que ajuda a degradar tanto a madeira, quanto prejudica a célula vegetal na produção de espécies reativas de oxigênio, mecanismo de defesa celular da planta. Contudo a acidez extrema do microambiente próximo à hifa pode prejudicar o crescimento fúngico (ARANTES; MILAGRES, 2009), apesar da faixa de pH de 3.5 a 9.0 ser considerada ótima (BARROS et al., 2011), sendo assim o equilíbrio dessa acidez que pode ser realizada com a produção de amônia pela célula fúngica pode criar um ambiente mais favorável para o crescimento da fase miceliana de *Sporothrix*.

Tendo isso em vista, refletimos que a contínua produção de ureia em parasitismo, pode possuir razões semelhantes a observada em saprobiose, em que além do fungo fazer captação de nitrogênio através do metabolismo da ureia, pode estar utilizando a alcalinização, para criar um microambiente no sítio da infecção, com formação de um processo inflamatório crônico granulomatoso em que há supurações, ou seja, processo de formação de pus em uma inflamação que é decorrente da morte de células fúngicas e de neutrófilos (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2002). Os neutrófilos são a primeira via de defesa da imunidade inata e possui uma ação decorrente de processo inflamatório,

que corresponde a fagocitose dos microrganismos (SIMCHOWITZ; ROOS, 1985), produção de espécies reativas de oxigênio, produção de enzimas líticas e hidrolases que atuam em pH ácido (SEGAL, 2005) e produção de armadilhas extracelulares (*neutrophil extracellular traps* - NETs) para capturar e matar microrganismos (BRINKMANN et al., 2004; KAPLAN; RADIC., 2012), sendo provocando acidificação do meio tanto intracelular quanto extracelular, conforme demonstrado por Cao e colaboradores (2015). Com isso, a degradação da ureia pela urease em *Sporothrix*, principalmente nos que tem este mecanismo mais eficiente, pode ser determinante para modificar o microambiente ácido, tornando-o mais alcalino e favorecendo a proteção e sobrevivência do fungo utilizando como defesa própria o aumento do pH.

Esta hipótese de criação de microambiente pela ação indireta da urease, não foi testada em fungos, contudo sua ação indireta pode estar ligada com o sucesso no dimorfismo de *Coccidioides immitis* (YU et al., 1997) e com a capacidade de invasão do SNC pelo *Cryptococcus neoformans* (FU et al., 2008), já que em ambos modelos quando a urease é nocauteada, esses processos não ocorrem de maneira satisfatória. Contudo a criação de microambiente através da ação da urease de liberação de amônia e aumento de pH favorecendo o microrganismo, já foi demonstrada em bactérias da espécie *Helicobacter pylori*, já que essa bactéria se instala e faz infecção no estômago, que possui um pH extremamente ácido, o que seria inviável para a sobrevivência dessas bactérias. Sendo assim *H. pylori* faz o pH do estômago aumentar por essa ação indireta da quebra da ureia pela urease favorecendo a infecção, bem como sua multiplicação neste ambiente desfavorável (PHADNIS et al., 1996; DUNN; PHADNIS, 1998)

Para que essas hipóteses sejam avaliadas e posteriormente respondidas, o conhecimento da enzima se faz necessário. Não só de sua atuação na patogênese ou na infecção propriamente dita, mas também o conhecimento bioquímico, evidenciando seus aspectos físico-químicos. Pensando nisso lançamos mão de ferramentas de servidores de bioinformática capazes de analisar a sequência linear da urease desses fungos, bem como da urease de feijão. Foi possível observar que as características físicas da enzima como tamanho e peso da sequência, porcentagens de alfa-hélice, porções estendidas, *coil* randômico, folhas beta e ponto isoelétrico são parecidos entre todas as ureases estudadas, dados esses que, juntamente com o que foi dito no

parágrafo anterior fortalece a tese de que essas enzimas possuem alta identidade funcional, podendo assim, independente do microrganismo ser infeccioso ou não manter características diretamente ligada com a captação de nitrogênio ou não em comum.

Tal como os que foram relatados, estudos sobre a localização da enzima urease em fungos, principalmente no gênero *Sporothrix* não são descritos na literatura especializada até o presente. Com isso, este estudo é pioneiro na análise das localizações subcelulares da urease, importante na predição da função desta enzima neste modelo, já que o papel funcional de uma proteína depende da sua localização celular. Dados provenientes de análises de bioinformática, juntamente com os averiguados nos ensaios de *western blot* e SPR sugerem fortemente que esta enzima está presente no citoplasma, já que os ensaios de *wetern blot* e SPR foram realizados com as proteínas obtidas do extrato celular bruto, sugerindo que essas proteínas estavam no interior celular ou ancoradas em sua membrana. Além disso, os resultados obtidos através do algoritmo DeepLoc-1.0 em nosso estudo são semelhantes aos propostos para as serina-proteinases citosólicas das células eucariotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (SANTOS-DE-SOUZA et al., 2019). Cabe salientar, que esta ferramenta de bioinformática, o algoritmo DeepLoc-1.0, é baseada em sequências que não dependem de informações provenientes de proteínas homólogas anotadas. Assim como no servidor DeepLoc-1.0, na análise da sequência linear, foi observado em todos os fungos e na sequência linear da urease de feijão o índice GRAVY negativo, significando que essas sequências provavelmente não possuem regiões hidrofóbicas, sendo assim a chance da urease estar ancorada em membrana plasmática, que possui região hidrofóbica por conta de seu arranjo e da composição da bicamada fosfolipídica é extremamente mínima. Novamente, nossos resultados são concordantes com os observados na localização celular da urease em outros microrganismos tais como as bactérias *Helicobacter pylory* (PHADNIS et al., 1996; DUNN; PHADNIS, 1998) e *Klebsiella aerogenes* (MULROONEY et al., 1989), que também se mostraram citoplasmáticas, fato este que fortalece os dados aqui apresentados.

7 CONCLUSÕES

- Entre as cepas da espécie *Sporothrix brasiliensis* estudadas todas foram capazes de produzir urease;
- Urease e degradação da ureia são vitais para o crescimento do fungo, já que o fungo com a ação da urease inibida teve seu crescimento diminuído;
- Em *Sporothrix brasiliensis* o gene da urease parece ter expressão constitutiva, ou seja, sua expressão é contínua, e mesmo mínima, independe do meio ou do tempo de cultivo;
- As ureases, mesmo entre espécies diferentes de fungos e de feijão, parece ser bem conservada, aumentando assim a sua importância, motivo pelo qual evolutivamente entre as espécies manteve sua conservação;
- A urease de *Sporothrix brasiliensis* está presente no citoplasma da célula.

REFERÊNCIAS

- ADOLFO LUTZ; ALFFONSO SPLENDORE. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, v. 21, p. 433–450, 1907.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics**, v. 33, n. 21, p. 3387–3395, 1 nov. 2017.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the *Sporothrix* Complex. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. **PloS One**, v. 11, n. 3, p. e0152796, 2016.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Interaction with *Pantoea agglomerans* Modulates Growth and Melanization of *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 184, n. 3, p. 367–381, jun. 2019.
- ALZUGUIR, C. L. C. et al. Geo-epidemiology and socioeconomic aspects of human sporotrichosis in the municipality of Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil, between 2007 and 2016. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 2, p. 99–106, 7 fev. 2020.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevance of low molecular weight compounds produced by fungi and involved in wood biodegradation. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009.
- ARAUJO, M. L. DE et al. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 485–490, 2015.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. 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**, v. 15, n. 7, p. 651–655, jul. 2009.

BARROS, M. B. DE L. 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**, v. 38, n. 4, p. 529–535, 15 fev. 2004.

BARROS, M. B. DE L.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633–654, out. 2011.

BEER-DAVIDSON, G.; HINDIYEH, M.; MUHSEN, K. Detection of *Helicobacter pylori* in stool samples of young children using real-time polymerase chain reaction. **Helicobacter**, v. 23, n. 1, fev. 2018.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 28–33, jan. 2015.

BRANDOLT, T. M. et al. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012–2017. **Medical Mycology**, v. 57, n. 5, p. 527–533, 1 jul. 2019.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 5 mar. 2004.

CAO, S. et al. Extracellular Acidification Acts as a Key Modulator of Neutrophil Apoptosis and Functions. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. e0137221, 2015.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon: Official**

Journal of the International Society on Toxinology, v. 40, n. 11, p. 1515–1539, nov. 2002.

CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 110, p. 90–109, fev. 2016.

CASADEVALL, A. The future of biological warfare. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 584–587, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Multistate outbreak of sporotrichosis in seedling handlers, 1988. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 37, n. 42, p. 652–653, 28 out. 1988.

CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, jan. 2015.

CHANG, Z.; KUCHAR, J.; HAUSINGER, R. P. Chemical cross-linking and mass spectrometric identification of sites of interaction for UreD, UreF, and urease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 15305–15313, 9 abr. 2004.

CHRISTENSEN, W. B. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. **Journal of Bacteriology**, v. 52, n. 4, p. 461–466, out. 1946.

COOPER, C. R.; DIXON, D. M.; SALKIN, I. F. Laboratory-acquired sporotrichosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology: Bi-Monthly Publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 30, n. 2, p. 169–171, 1992.

CÓRDOBA, S. et al. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 441–448, jul. 2018.

CRUZ, L. C. H. DA. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisao de parte da literatura e consideracoes sobre o diagnostico e a epidemiologia. **Veterinaria e zootecnia**, v. 20, p. 8–28, 2013.

CRUZ, I. L. R. et al. Evaluation of melanin production by *Sporothrix luriei*. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 68–70, jan. 2018.

CRUZ, I. L. R. et al. Evolution of virulence-related phenotypes of *Sporothrix brasiliensis* isolates from patients with chronic sporotrichosis and acquired immunodeficiency syndrome. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 22 maio 2020.

CUOMO, C. A. et al. Genome Sequence of the Pathogenic Fungus *Sporothrix schenckii* (ATCC 58251). **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, 22 maio 2014.

DM, C.-G. et al. Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 122, p. 73–77, 28 jan. 2016.

DUBREUIL, J. D.; GIUDICE, G. D.; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* Interactions with Host Serum and Extracellular Matrix Proteins: Potential Role in the Infectious Process. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 4, p. 617–629, 1 dez. 2002.

DUNN, B. E.; PHADNIS, S. H. Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 71, n. 2, p. 63–73, abr. 1998.

FALCÃO, E. M. M. et al. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 4, 2019.

FERNÁNDEZ-SILVA, F. et al. Modest efficacy of voriconazole against murine infections by *Sporothrix schenckii* and lack of efficacy against *Sporothrix brasiliensis*. **Mycoses**, v. 57, n. 2, p. 121–124, fev. 2014.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 18–28, jan. 2008.

FREITAS, D. F. S. **Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos associados à esporotricose**. Thesis—[s.l: s.n.].

FREITAS, D. F. S. et al. Sporotrichosis: An Emerging Neglected Opportunistic Infection in HIV-Infected Patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 28 ago. 2014.

FREITAS, D. F. S. et al. Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 112–120, 2015a.

FREITAS, D. F. S. et al. Sporotrichosis in the Central Nervous System Caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 61, n. 4, p. 663–664, 15 ago. 2015b.

FRIEDMAN, D. Z. P.; SCHWARTZ, I. S. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, 20 jul. 2019.

FU, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, 15 jun. 2018.

GOLDRAIJ, A.; BEAMER, L. J.; POLACCO, J. C. Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1801–1810, ago. 2003.

GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M. An improved silver staining procedure for schizodeme analysis in polyacrylamide gradient gels. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 101–106, mar. 1990.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15–21, jan. 2015.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, 19 jan. 2017.

GRIFFITH, D. P.; MUSER, D. M.; CAMPBELL, J. W. Inhibition of bacterial urease. **Investigative Urology**, v. 11, n. 3, p. 234–238, nov. 1973.

GUTIERREZ GALHARDO, M. C. et al. Erythema nodosum associated with sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 2, p. 114–116, fev. 2002.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. et al. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 78–80, jan. 2010.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. et al. Epidemiological Aspects of Sporotrichosis Epidemic in Brazil. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 4, p. 238–245, 1 dez. 2015.

HAN, H. S.; KANO, R. Feline sporotrichosis in Asia. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 3 maio 2020.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. REFRACTORY SUBCUTANEOUS ABSCESES CAUSED BY *SPOROTHRIX SCHENCKII*. A NEW PATHOGENIC FUNGUS. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 1, p. 77–89, 1 out. 1900.

HESSLER, C.; KAUFFMAN, C. A.; CHOW, F. C. The Upside of Bias: A Case of Chronic Meningitis Due to *Sporothrix schenckii* in an Immunocompetent Host. **The Neurohospitalist**, v. 7, n. 1, p. 30–34, jan. 2017.

HIRUMA, M. et al. Urease gene of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii*. **The Journal of Dermatology**, v. 40, n. 2, p. 111–113, 2013.

HOLLIDAY, R. Epigenetics: A Historical Overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76–80, abr. 2006.

HOOG, G. S. D. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2 edition ed. Utrecht: Amer Society for Microbiology, 2001.

IKEDA, M. A. K. et al. Extracellular Vesicles From *Sporothrix brasiliensis* Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2286, 2 out. 2018.

KANE, J.; FISCHER, J. B. The differentiation of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by use of Christensen's urea broth. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 911–913, jul. 1971.

KAPLAN, M. J.; RADIC, M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 189, n. 6, p. 2689–2695, 15 set. 2012.

KAUFFMAN, C. A. Sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 29, n. 2, p. 231–236; quiz 237, ago. 1999.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. 2nd edition edition ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LECCA, L. O. et al. Associated factors and spatial patterns of the epidemic sporotrichosis in a high density human populated area: A cross-sectional study from 2016 to 2018. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 176, p. 104939, mar. 2020.

LIU, Y. et al. The Cdc42 effectors Gic1 and Gic2 regulate polarized post-Golgi secretion. **Cell & Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 33, dez. 2019.

MACEDO, P. M. et al. 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**, v. 29, n. 4, p. 719–724, 2015.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, 2014.

MARIMON, R. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, set. 2006.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, out. 2007.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 621–625, set. 2008.

MARIO, D. A. N. et al. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 33, n. 1, p. 21–25, mar. 2016.

MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEAO, C. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 540–545, set. 2004.

MIALSKI, R. et al. Chronic Meningitis and Hydrocephalus due to *Sporothrix brasiliensis* in Immunocompetent Adults: A Challenging Entity. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. ofy081, 2018.

MINES, T. C. OF. **Sporotrichosis Infection on Mines of the Witwatersrand. A symposium. Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association.** [s.l.] Johannesburg: Transvaal Chamber of Mines, 1947.

MIRBOD-DONOVAN, F. et al. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 504–515, jan. 2006.

MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 451–480, set. 1995.

MOREIRA, J. A. S.; FREITAS, D. F. S.; LAMAS, C. C. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. **Infection**, v. 43, n. 3, p. 267–276, jun. 2015.

MORRISON, A. S. et al. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p. 88–90, 1 jan. 2013.

MULROONEY, S. B.; PANKRATZ, H. S.; HAUSINGER, R. P. Regulation of Gene Expression and Cellular Localization of Cloned *Klebsiella aerogenes* (*K. pneumoniae*) Urease. **Microbiology**, v. 135, n. 6, p. 1769–1776, 1 jun. 1989.

MUSIANI, F. et al. Protein Tunnels: The Case of Urease Accessory Proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 5, p. 2322–2331, 9 maio 2017.

MYRACH, T.; ZHU, A.; WITTE, C.-P. The assembly of the plant urease activation complex and the essential role of the urease accessory protein G (UreG) in delivery of nickel to urease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 35, p. 14556–14565, 1 set. 2017.

NAKASU, C. C. T. et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 9 maio 2020.

OHLSON, S.; STRANDH, M.; NILSHANS, H. Detection and characterization of weak affinity antibody antigen recognition with biomolecular interaction analysis. **Journal of molecular recognition : JMR**, v. 10, n. 3, p. 135–138, 1997.

OLIVEIRA, L. C. DE. **Caracterização molecular e expressão fenotípica da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis***. [s.l: s.n.].

OLIVEIRA, L. C. DE et al. Diagnostic performance of mycologic and serologic methods in a cohort of patients with suspected sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 36, n. 2, p. 61–65, 1 abr. 2019.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 257–267, out. 2011.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. fnv027, 24 fev. 2015.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, maio 2004.

OROFINO-COSTA, R. et al. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, out. 2017.

PAIXÃO, A. G. et al. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. **AIDS research and therapy**, v. 12, p. 16, 2015.

PAPAIORDANOU, F. et al. Hypersensitivity reaction to *Sporothrix schenckii*: erythema nodosum associated with sporotrichosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 504–504, ago. 2015.

PEESS, C. et al. Deciphering the Stepwise Binding Mode of HRG1 β to HER3 by Surface Plasmon Resonance and Interaction Map. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116870, 6 fev. 2015.

PEREIRA, S. A. et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392–393, jun. 2014.

PHADNIS, S. H. et al. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 905–912, mar. 1996.

POESTER, V. R. et al. Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 7, p. 815–821, 2018.

POWELL, K. E. et al. Cutaneous sporotrichosis in forestry workers. Epidemic due to contaminated Sphagnum moss. **JAMA**, v. 240, n. 3, p. 232–235, 21 jul. 1978.

QUINTELLA, L. P. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, n. 1, p. 25–32, jan. 2011.

RAMOS-E-SILVA, J. Sporotrichosis In Brazil. In: **Essays on Tropical Dermatology**. 2. ed. Amsterdam: Excerpta Medica Pub. Co., 1972. v. 2.

REINERT, W. R.; MARZLUF, G. A. Regulation of the purine catabolic enzymes in *Neurospora crassa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 166, n. 2, p. 565–574, fev. 1975.

RIPPON, J. W. **Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. Subsequent edition ed. Philadelphia: W B Saunders Co, 1988.

ROCHA, A. A. et al. Transcription regulation of the *Pbpg43* gene by nitrogen in the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 46, n. 1, p. 85–93, jan. 2009.

RODRIGUES, A. M. et al. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 5, p. e32, maio 2014.

RODRIGUES, A. M. et al. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 246–264, fev. 2016.

RODRIGUES, A. M. et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, 12 fev. 2020.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383–387, abr. 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, dez. 2015.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 7, 14 jul. 2016.

ROMERO-MARTINEZ, R. et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696–3703, jun. 2000.

ROSENSTEIN, I. J.; HAMILTON-MILLER, J. M.; BRUMFITT, W. Role of urease in the formation of infection stones: comparison of ureases from different sources. **Infection and Immunity**, v. 32, n. 1, p. 32–37, abr. 1981.

ROSSATO, L. et al. Proteins Potentially Involved in Immune Evasion Strategies in *Sporothrix brasiliensis* Elucidated by Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry. **mSphere**, v. 3, n. 3, p. e00514-17, /msphere/3/3/mSphere514-17.atom, 13 jun. 2018.

SAMPAIO, S. A. P.; LACAZ, C. S.; ALMEIDA, F. Aspectos clínicos da esporotricose em São Paulo. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v. 9, n. 6, p. 391–402, 1954.

SANDHU, G. S. et al. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2913–2919, nov. 1995.

SANTOS-DE-SOUZA, R. et al. Insights into the tracking of the cysteine proteinase B COOH-terminal polypeptide of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by surface plasmon resonance. **Parasitology Research**, v. 118, n. 4, p. 1249–1259, 1 abr. 2019.

SCAZZOCCHIO, C.; DARLINGTON, A. J. The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 166, n. 2, p. 557–568, 24 set. 1968.

SCHENCK, B. R. **On Refractory Subcutaneous Abscesses Caused by a Fungus Possibly Related to the Sporotricha.** [s.l.] Johns Hopkins Press, 1898.

SCOPEL-GUERRA, A. et al. The Impact of *Helicobacter pylori* Urease upon Platelets and Consequent Contributions to Inflammation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 12 dez. 2017.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 197–223, 2005.

SILVA, M. B. T. DA et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 10, p. 1867–1880, out. 2012.

SIMCHOWITZ, L.; ROOS, A. Regulation of intracellular pH in human neutrophils. **The Journal of General Physiology**, v. 85, n. 3, p. 443–470, mar. 1985.

SIMONI, R. D.; HILL, R. H.; 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**, v. 277, n. 35, p. 23e, 30 ago. 2002.

SINGER, J. I.; MUNCIE, J. E. Sporotrichosis; etiologic considerations and report of additional cases from New York. **New York State Journal of Medicine**, v. 52, n. 17:1, p. 2147–2153, 1 set. 1952.

SINGH, A. et al. Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, 7 maio 2013.

SINGHAI, M. et al. Primary pulmonary sporotrichosis in a sub-Himalayan patient. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 4, n. 1, p. 48–49, jan. 2012.

SONG, Y. et al. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 27, n. 3, p. 313–318, mar. 2013.

STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R. Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. **Toxins**, v. 4, n. 2, p. 55–67, 2012.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, dez. 2013.

TEIXEIRA, M. M. et al. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC genomics**, v. 15, p. 943, 29 out. 2014.

TEIXEIRA, P. A. C. et al. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 155, n. Pt 11, p. 3730–3738, nov. 2009.

TOVIKKAI, D. et al. Sporotrichosis: The case series in Thailand and literature review in Southeast Asia. **Medical Mycology Case Reports**, v. 27, p. 59–63, mar. 2020.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, set. 1979.

TRUJILLO-ESQUIVEL, E. et al. The *Sporothrix schenckii* Gene Encoding for the Ribosomal Protein L6 Has Constitutive and Stable Expression and Works as an Endogenous Control in Gene Expression Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 1 set. 2017.

WANKE, B; SCHUBACH, TMP; BARROS, MBL. Esporotricose. In: **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. v. 2p. 1161–1669.

WISE, H. Z. et al. Extracellular ammonia at sites of pulmonary infection with *Coccidioides posadasii* contributes to severity of the respiratory disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 59–60, p. 19–28, jul. 2013.

YU, J. J. et al. Isolation and characterization of the urease gene (URE) from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. **Gene**, v. 198, n. 1–2, p. 387–391, 1 out. 1997.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. et al. New Diagnostic Applications in Sporotrichosis. **Skin Biopsy - Perspectives**, 2 nov. 2011.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM et al. Diagnosis of Sporotrichosis: Current Status and Perspectives. In: **Sporotrichosis**. 1. ed. Araraquara, São Paulo, Brazil: Iracilda Zeppone Carlos, 2015. v. 1p. 133–145.

ZHANG, M. et al. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, 28 fev. 2019.

PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS AO LONGO DO DOUTORAMENTO