

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

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

MANOEL MARQUES EVANGELISTA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *SPOROTHRIX* ISOLADAS
EM ÁREA ENDÊMICA DE ESPOROTRICOSE NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2009

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *SPOROTHRIX* ISOLADAS EM
ÁREA ENDÊMICA DE ESPOROTRICOSE NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**

MANOEL MARQUES EVANGELISTA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof. Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira
Prof. Dra. Maria José de Andrada Serpa

Rio de Janeiro

2009

MANOEL MARQUES EVANGELISTA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO
SPOROTHRIX ISOLADAS EM ÁREA ENDÊMICA DE ESPOROTRICOSE NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof. Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira

Prof. Dra. Maria José de Andrada Serpa

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo (Presidente)
Doutora em Medicina (Dermatologia)
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Manuela da Silva
Doutora em Ciências de Alimentos
Instituto Nacional de Controle de Qualidade - Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Daniela Sales Alviano
Doutora em Ciências (Microbiologia)
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Aurea Maria Lage de Moraes (Revisora e suplente)
Doutora em Biologia Celular e Molecular
Instituto Oswaldo Cruz- Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela orientação dedicada e pela companhia durante a superação dos obstáculos nesta caminhada. Muito obrigado por acreditar em mim, pelas oportunidades de aprendizado, pela amizade, obrigado por tudo.

À Prof^a. Dra. Maria José de Andrada Serpa, pelo ótimo recebimento em seu laboratório durante a execução deste trabalho e pela amizade.

À Prof^a. Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo, pelas ótimas observações realizadas durante os seminários de qualificação, por acreditar em nosso trabalho e pela amizade.

Ao colega Rodrigo de Almeida Paes, que mais que um mentor intelectual, nos iniciou nos conhecimentos básicos da micologia, pela grande contribuição e colaboração na execução técnica do trabalho, e nas extensas discussões durante a preparação deste manuscrito.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pelo curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas e aos seus professores.

A minha família por todo apoio e que apoio. Principalmente durante os momentos mais difíceis nos quais somente quem faz uma dissertação sabe como é. Obrigado a todos: pai, mãe, irmãos, minha esposa e meus avós.

A todos os amigos do Laboratório de Micologia, setor de Imunodiagnóstico, minha “família carioca”. Principalmente à “trupe”: Mauro, Claudia, Marcos, Priscila, Patrícia pelos agradáveis momentos de convívio, pela ótima receptividade no laboratório e por todo apoio durante essa caminhada. E aos demais integrantes do laboratório Karla e André.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, setor de Diagnóstico Micológico, pelos agradáveis momentos de convívio, em especial a Gleide pelo auxílio técnico no mesmo.

À Prof^a. Dra. Aurea Maria Lage de Moraes, pela revisão e valiosas sugestões no texto desta dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Virologia pela ótima recepção e pelos momentos agradáveis de convívio. Principalmente ao amigo Isaac, parceiro e companheiro que sempre me ajudou e pela sua amizade.

Aos amigos da Universidade Federal de Juiz de Fora, em especial ao Prof. Renê Gonçalves de Matos e a Prof^a Maria Helena Braga, pelas oportunidades, pela amizade e pelo apoio sempre.

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

A minha família meus pais Manoel e Lucia pelo amor, carinho, dedicação, apoio, exemplos de vida e razão de minha existência. A meus irmãos Armando e Pedro Henrique, amigos e companheiros sempre. A minha esposa Mariângela, amiga e companheira de todas as horas. A meus avós Amando e Cacilda pelo carinho e apoio sempre.

“Amanhã!
Será um lindo dia
Das mais loucas alegrias
Que se possa imaginar
Amanhã!
Redobrada a força
Pra cima que não cessa
Há de vingar
Amanhã!”

Guilherme Arantes

Oliveira, M.M.E. **Identificação e análise filogenética de espécies do gênero *Sporothrix* isoladas em área endêmica de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2009. 67f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A esporotricose, micose subcutânea causada pelo complexo *Sporothrix schenckii*, é cosmopolita e a mais freqüente na América Latina. Nos últimos anos tem aumentado significativamente o número de casos no Brasil, com destaque para o aumento no Estado do Rio de Janeiro na última década. Recentemente, foram consideradas quatro novas espécies dentro do gênero *Sporothrix*, sendo essas: *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. luriei*. Entretanto somente 25 isolados de área endêmica no Rio de Janeiro foram incluídos nos estudos prévios. A caracterização destas foi realizada por meio da utilização de provas fenotípicas: morfologia de conídios, teste de crescimento à 30°C, teste de termotolerância e auxonograma. No presente trabalho realizamos a caracterização de 248 isolados oriundos de pacientes atendidos no ambulatório de Dermatologia do IPEC, os quais tiveram diagnóstico de esporotricose durante a epidemia de esporotricose, no período de 1998 e 2008. De acordo com as características fenotípicas, 206 isolados (83,1%) foram caracterizados como *S. brasiliensis*, um isolado (0,4%) como *S. mexicana*, 15 (6,0%) como *S. schenckii* e em 26 isolados (10,5%) não foi possível realizar a caracterização da espécie sendo classificadas como *Sporothrix spp.* Dentre esse isolados foi realizada a análise molecular de 8 (31%) isolados que apresentaram resultados inconclusivos nos estudos fenotípicos através do sequenciamento de um locus do gene calmodulina possibilitou a formação de um grande grupo constituído por 7 isolados todos caracterizados genotipicamente como pertencentes à espécie *S. brasiliensis*. A análise em nível de genótipo deve ser utilizada como ferramenta complementar na identificação de espécies do complexo *Sporothrix*. A correlação entre dados moleculares e características fenotípicas é fundamental na identificação de espécies complexo *Sporothrix*, possibilitando a implementação da taxonomia polifásica.

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*, análise filogenética, esporotricose, endemia.

Oliveira, M.M.E. Identification and phylogenetic analysis of species of the **Genus *Sporothrix* from endemic are of sporotrichosis in the Rio de Janeiro State**. Rio de Janeiro, 2009. 67f. Master [Science Dissertattion in Clinic Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Sporothrix schenckii is the species responsible for sporotrichosis, an important subcutaneous mycosis with a worldwide distribution, and very frequent in Latin America, and it has been reported as endemic in Rio de Janeiro, Brazil. Recent molecular studies have demonstrated that this species constitutes a complex of numerous phylogenetic species, which were phenotypically characterized using different culture media, growth rates at different temperatures, and nutritional tests as well comparison calmodulin genes and it was proposed four new species *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana* and *Sporothrix luriei*. And just 25 isolates from the endemic occurring in Rio de Janeiro were included in this previous study. We have studied a total of 248 *Sporothrix* isolates from this endemic obtained during the period of 1998 and 2008. The phenotypic characterization was based on the morphology of conidia, growth rates at 30°C and 37 °C, ability to grow at 37 °C, and auxonographic method. According to the key features for species differentiation, 206 isolates (83.1%) were characterized as *S. brasiliensis*, one as *S. mexicana* (0.4%), 15 (6.0%) as *S. schenckii* and in 26 isolates (10.5%) the species was not differentiated being classified as *Sporothrix* spp. Among 8 (31%) of these unidentified isolates, molecular methodology, by sequence analysis of on protein coding locus (calmodulin) was performed, revealing the presence of one major clade, grouping 7 of these isolates with *S. brasiliensis*, representing this phylogenetic species. The analysis in genotype level should be used as complementary tool in the identification of species of the *Sporothrix* complex. The correlation among molecular data and phenotype is fundamental in the identification of species *Sporothrix* complex, making possible the implementation of the polyphasic taxonomy.

Keywords: *Sporothrix schenckii*, phylogenetic analysis, sporotrichosis, endemic

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 – ESPOROTRICOSE	12
1.1.1 - <i>Histórico</i>	12
1.1.2. <i>Epidemiologia</i>	12
1.1.3. <i>Patogenia</i>	14
1.1.4. <i>Formas clínicas</i>	15
1.1.5. <i>Resposta imune na esporotricose</i>	16
1.1.6. <i>Diagnóstico laboratorial do Complexo Sporothrix</i>	17
1.2 - O GÊNERO <i>SPOROTHRIX</i>	19
1.2.1. <i>Sistemática</i>	19
1.2.2. <i>Filogenia do Gênero Sporothrix</i>	22
1.2.3. <i>Morfologia e Fisiologia</i>	23
1.2.4. <i>Fatores de virulência</i>	25
3. OBJETIVOS	29
3.1. GERAL.....	29
3.2. ESPECÍFICOS	29
4. METODOLOGIA	30
4.1. MICRORGANISMO	30
4.2. RE-ISOLAMENTO DO ISOLADO	30
4.3. PROVAS FENOTÍPICAS	30
4.3.1 <i>Morfologia</i>	31
4.3.2. <i>Medida do diâmetro de colônias</i>	31
4.3.3. <i>Termotolerância</i>	31
4.3.4. <i>Assimilação de Carboidratos</i>	32
4.3.5. <i>Banco de dados dos fenótipos</i>	33
4.4. MÉTODOS MOLECULARES.....	33
4.4.1. <i>Extração de DNA</i>	33
4.4.2 <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	33
4.4.3. <i>Reação da polimerase em cadeia (PCR) e seqüenciamento</i>	34
4.4.4. <i>Análise de dados</i>	34
8. RESULTADOS	36
8.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	36
8.1.1 <i>Morfologia</i>	36
8.1.2. <i>Características dos conídios</i>	36
8.1.3. <i>Comparação do crescimento colonial</i>	38
8.1.4. <i>Estudos fisiológicos</i>	39
8.1.5. <i>Caracterização fenotípica da cepa tipo e controles</i>	40
8.1.6. <i>Identificação de espécies</i>	40
8.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	44
9. DISCUSSÃO	46

10. CONCLUSÕES	53
11. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54
11. REFERÊNCIAS	55

1.1 – Esporotricose

1.1.1 - Histórico

O fungo *Sporothrix schenckii* foi isolado pela primeira vez por Benjamin Schenck, em 1896, de um paciente com 36 anos, do sexo masculino, apresentando lesões na mão e no braço direito. Este isolado, obtido da secreção dos abscessos que o paciente apresentava, foi estudado pelo micologista Erwin Smith, que concluiu que este fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum* (Schenck, 1898). Anteriormente, Linck em 1809 e Lutz em 1889 já tinham se referido a possíveis casos de esporotricose. No entanto, não foi possível o isolamento do fungo para a confirmação dos casos (Kwon-Chung & Bennet, 1992). O segundo caso indiscutível de esporotricose descrito, também nos Estados Unidos, em Chicago, por Hekton & Perkins em 1900, relata o desenvolvimento de uma lesão no dedo de um menino após ter sido ferido com martelo, lesão esta que regrediu espontaneamente. Tais pesquisadores deram a esse fungo patogênico sua denominação atual, *Sporothrix schenckii* (Hekton & Perkins, 1900). Em 1907, o primeiro caso de infecção natural em animais foi descrito por Lutz e Splendore, em ratos, no Brasil (Lutz & Splendore, 1907), onde a possibilidade de contágio ao homem pela mordedura de ratos foi mencionada (Pupo, 1917). Este fungo tem sido identificado em diversas áreas do mundo e, nos anos mais recentes, a maioria dos casos publicados são provenientes da América Central e do Sul, em especial México, Colômbia, Brasil e Peru, além do continente africano (Pappas et al, 2000; Kovarik et al, 2008).

1.1.2. Epidemiologia

A esporotricose é a micose subcutânea mais prevalente na América Latina (Conti-Diaz, 1989; Kovarik et al, 2008), onde as taxas de infecção em áreas rurais são relevantes (Pappas et al, 2000). No Brasil, a distribuição do *S. schenckii* no meio ambiente e as características do seu nicho ecológico têm sido muito pouco estudadas, podendo ser enumerados os trabalhos referentes ao isolamento deste fungo do solo, apesar de diversos casos terem sido descritos em especial no Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (Freitas et al, 1965; Lopez et al, 1999; Barros et al, 2004).

No homem, a esporotricose é uma doença que costuma ocorrer sob a forma de casos isolados ou pequenos surtos familiares ou profissionais, envolvendo pessoas expostas a vegetais ou solo rico em matéria orgânica, como agricultores, floristas, jardineiros e mineiros, além de laboratoristas (Carrada-Bravo, 1975; Cooper et al, 1992a; Hajjeh et al, 1997). Epidemias envolvendo grande número de pessoas ou amplas regiões geográficas são raras e têm sido relacionadas a uma fonte de infecção comum no ambiente, sendo a maior epidemia conhecida de esporotricose registrada na África do Sul, em trabalhadores de uma mina cujas madeiras estavam contaminadas pelo fungo (Quintal, 2000). Outra importante epidemia ocorreu nos Estados Unidos, sendo relacionada a um tipo de musgo contaminado por *S. schenckii* (Coles et al, 1992), a qual foi confirmada por métodos moleculares de tipagem dos isolados clínicos e ambientais (Cooper et al, 1992b). Também nos Estados Unidos, uma microepidemia de esporotricose ocorreu através da contaminação de pessoas pelo feno estocado numa casa abandonada, onde se realizavam festas de “Halloween” (Dooley et al, 1997). Mais recentemente foi descrita na Austrália um aumento do número de casos de esporotricose, que por métodos moleculares ficou demonstrado ser relacionado à exposição ao feno presente no feno (O’Reilly & Altman, 2006).

No Brasil, a esporotricose foi primeiramente reportada em 1907 (Lutz & Splendore, 1907). Desde então, outros casos têm sido descritos, em especial no Rio Grande do Sul e em São Paulo (Freitas et al, 1965; Lopes et al, 1999). Uma recente revisão dos casos de esporotricose no Rio Grande do Sul entre 1967 e 2002 revelou um número de 304 casos de esporotricose, sendo 96% deles confirmados pelo isolamento de *S. schenckii* em cultura. Na maioria dos pacientes (75%) a infecção foi relacionada a exposição à matéria orgânica contaminada. Não foi possível verificar transmissão zoonótica da esporotricose neste estudo. Também foi verificado que o número de casos de esporotricose nesse estado brasileiro está diminuindo desde a década de 90 (Rosa et al, 2005). Em um inquérito epidemiológico com esporotriquina realizado em Morro Velho, uma cidade do quadrilátero ferrífero em Minas Gerais, revelou positividade em 13,67% dos indivíduos submetidos ao estudo, embora *S. schenckii* não tenha sido isolado de nenhuma amostra de solo colhida no local do inquérito (Rodrigues & Resende, 1996). Assim como no Sul do país, casos de esporotricose também foram evidenciados em um estudo realizado na região Norte, no período de 1973 a 1983 (Talhari et al, 1988).

O Estado do Rio de Janeiro apresenta atualmente uma endemia de esporotricose, fato esse demonstrado por Schubach e colaboradores (2005a, 2008) em um estudo realizado no período de 1998 a 2004, onde foram diagnosticados em uma mesma instituição hospitalar 759 casos de esporotricose humana, 1.503 de esporotricose felina e sessenta e quatro de infecção canina, onde 83,4% dos casos de esporotricose humana os pacientes relataram terem tido contato com gatos com esporotricose (Schubach et al, 2008). Esta difere das epidemias ocorridas em outros lugares do mundo por não serem transmitidas por uma fonte vegetal contaminada pelo fungo, mas sim por gatos domésticos infectados por *S. schenckii* (Hay & Morris-Jones, 2008). A epidemia inicialmente concentrou-se em áreas mais pobres do Rio de Janeiro, nos municípios da região metropolitana e, no município do Rio de Janeiro, principalmente nos bairros do subúrbio. A doença foi mais comumente observada em mulheres jovens que desenvolviam atividades no domicílio, proporcionando contato direto com estes animais; a forma cutâneo-linfática da doença foi a mais frequente, seguida das formas cutânea localizada e cutânea disseminada. O itraconazol (ITC) na dose de 100mg foi eficiente para cura da esporotricose cutânea em 90% dos pacientes tratados, com boa tolerabilidade e sem alterações laboratoriais importantes. Também foi salientado, nos períodos estudados (1998 a 2004), formas clínicas pouco comuns como envolvimento de mucosas nasal e conjuntival, isoladas ou associadas a formas cutâneas clássicas (Schubach et al, 2005a, 2008). Um outro aspecto interessante foi o relato de manifestações de hipersensibilidade, descritas pela primeira vez relacionadas a esporotricose, como eritema nodoso e eritema multiforme (Gutierrez-Galhardo et al, 2002, 2005).

1.1.3. Patogenia

O início da infecção aquém dos glânglios regionais nos seres humanos pelo *S. schenckii* geralmente ocorre após inoculação do fungo na pele por ocasião de um trauma com espinhos, farpas, arranhadura, mordedura de gatos ou ainda por meio da contaminação pré-existente de solução de continuidade cutânea, alcançando o tecido cutâneo e subcutâneo (Jin et al, 1990; Marques et al, 1993). Indivíduos que trabalham com solo ou plantas, tais como lavradores, jardineiros, agricultores, entre outros, são mais suscetíveis ao contato com este agente infectante, desenvolvendo essa micose com maior frequência. Os sítios de infecção habituais são os membros inferiores e superiores. A transmissão pode ocorrer também de

forma menos comum, por meio da inalação de estruturas fúngicas, via trato respiratório superior, com possibilidade de conseqüente disseminação hematogênica. Quando inalado promove um quadro de pneumonite granulomatosa cavitária, podendo iniciar-se semelhante a um quadro de tuberculose (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

A esporotricose foi descrita em 1970 como uma infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos como: alcoólatras, diabéticos, portadores de malignidade hematológica, doença pulmonar obstrutiva crônica, transplantados utilizando drogas imunossupressoras e mais recentemente em indivíduos infectados pelo HIV (Lynch et al, 1970; Ramos-e-Silva et al, 2007).

1.1.4. Formas clínicas

A esporotricose é uma micose de evolução subaguda ou crônica e clinicamente pode ocorrer com uma variedade de expressões clínicas.

Na classificação clínica proposta por Sampaio & Lacaz (1959), a esporotricose está agrupada nas formas cutâneo-linfática (mais freqüente), cutâneo-localizada, cutâneo-disseminada e extracutânea.

A forma cutâneo-linfática é a mais freqüente. A lesão inicial (cancro de inoculação) caracteriza-se por lesão pápulo-nodular, eritematosa que evolui com aumento de tamanho e ulceração, surgindo então novas lesões semelhantes ao longo do trajeto linfático até cadeia ganglionar regional. Localizam-se preferencialmente em membros superiores e face, correspondendo aos locais mais expostos ao trauma. O período de incubação varia de 3 a 30 dias (média 14 dias). As manifestações clínicas são poucas ou nulas, sendo caracterizadas por dor local e pequenas adenomegalias regionais e, mais raramente, com a presença de sintomatologia sistêmica (Azulay & Azulay, 1992).

A forma cutâneo-localizada (forma fixa) é menos comum e se caracteriza por lesão única, sem comprometimento linfático. As lesões são muito polimórficas e inespecíficas, podendo se apresentar como lesão papulosa ou pápulo-nodular que pode evoluir para formas verrucosas com ou sem ulceração (Azulay & Azulay, 1992)

A forma cutâneo-disseminada é relativamente rara e se caracteriza por várias lesões disseminadas pelo tegumento. Pode resultar da disseminação hematogênica, observada em pacientes imunossuprimidos; primariamente a partir da inalação ou ingestão do *S. schenckii*; e

após inoculação cutânea do fungo, com disseminação secundária (Azulay & Azulay, 1992). Clinicamente pode se apresentar como pápulas, nódulos subcutâneos, lesões gomosas, úlcero-vegetantes e verrucosas. Pode também, haver freqüente sintomatologia sistêmica (Rippon, 1988; Know-Chung e Bennet, 1992). Essa forma ocorre especialmente em pacientes com comprometimento do sistema imunológico.

As formas extracutâneas são muito raras e de difícil diagnóstico, pois caracterizam-se por afetar um ou mais órgãos internos. Frequentemente apresenta caráter oportunista e resulta, geralmente, de disseminação hematogênica após inalação ou ingestão de esporos, com febre e comprometimento do estado geral (Rippon, 1988). Pode haver acometimento de pulmões, ossos, articulações, fígado, olhos, sistema nervoso central, pele e trato genito-urinário (Know-Chung & Bennet, 1992). Alguns estudos sugerem que esta forma está relacionada ao comprometimento de imunidade celular do hospedeiro, principalmente nos casos de AIDS e uso de drogas imunossupressoras (Carvalho et al, 2002).

1.1.5. Resposta imune na esporotricose

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e no controle de infecções causadas por *S. schenckii* ainda não estão bem compreendidos, porém, devem incluir tanto a resposta imune humoral como a celular, as quais parecem ser desencadeadas contra antígenos distintos (Carlos et al, 1992; Maia et al, 2006). Os antígenos da parede celular ativam a resposta celular, enquanto que a resposta humoral é ativada por proteínas secretadas pelo fungo, ou exoantígenos, os quais parecem não ter qualquer ação na resposta celular (Carlos et al, 2003).

A imunidade adquirida contra o fungo requer a ação de macrófagos ativados por linfócitos T CD4+, os quais liberam principalmente IFN- γ , forte ativador de macrófagos (Tachibana et al, 1999).

Na resposta imune humoral ao patógeno *S. schenckii*, já foram caracterizados determinantes antigênicos de peptido-ramnomananas em coelhos. Embora estes não apresentem reações cruzadas contra manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae*, fracas reações cruzadas contra glicopeptídeos da parede celular de *Ophiostoma stenoceras* foram verificadas (Lopes-Alves et al, 1994). Na esporotricose experimental em camundongos anticorpos específicos da classe IgG1 e IgG3 contra uma proteína de 70 kDa são

produzidos no decorrer da infecção e podem estar relacionados à eliminação do fungo do organismos desses animais (Nascimento & Almeida, 2005). Novos estudos são necessários no sentido de melhor caracterizar a resposta imune humoral na esporotricose, visto que vários aspectos continuam obscuros.

1.1.6. Diagnóstico laboratorial do Complexo *Sporothrix*

O diagnóstico da esporotricose é baseado no isolamento e identificação de seu agente causal, o *S. schenckii*, de materiais biológicos (Know-Chung & Bennet, 1992). Para isso, devem ser empregados, concomitantemente, os exames diretos, onde preparações a fresco de espécimes clínicos tratados com hidróxido de potássio (KOH) a 10% ou hidróxido de sódio (NaOH) a 4% são analisadas microscopicamente para a observação de células leveduriformes do *S. schenckii*, e o cultivo. O exame direto é de difícil observação, uma vez que as células leveduriformes presentes no material clínico são estruturas pequenas e escassas, exceto quando o espécime biológico é proveniente de gatos domésticos (Reed et al, 1993). Esfregaços de pus e “imprint” de biópsias de lesões coradas pelo Giemsa favorecem a visualização das formas infectantes. Em cortes histológicos a impregnação pela prata, pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina-eosina (HE) são as colorações de escolha, porém a menos que o material esteja muito rico em células parasitárias, não é fácil a observação das formas leveduriformes características do *S. schenckii* (Morris-Jones, 2002). Geralmente, estas têm aspecto variando do globoso a ovalado com brotamentos claveiformes, no interior de macrófagos, e em cerca de 40% dos casos onde o fungo é encontrado, nota-se presença de corpo asteróide, substância eosinofílica de forma radiada constituída de complexo antígeno-anticorpo, que se deposita na parede de alguns fungos (Chandler et al, 1980; Morris-Jones, 2002).

O isolamento do *S. schenckii* é facilmente obtido através da semeadura do material clínico, que, em geral, é biópsia ou o pus da lesão, sem um tratamento prévio, em Ágar Sabouraud com cloranfenicol para evitar contaminação bacteriana, adicionado ou não de cicloheximida, droga que reduz a contaminação por alguns fungos saprófitos. Entre 05 a 07 dias já é possível a observação do aparecimento de colônias filamentosas, hialinas com aspecto úmido que, com o tempo, começam a apresentar uma coloração escura no seu centro que vai aumentando centrifugamente ou permanece hialina. Nesta fase filamentosa deve-se

preparar um microcultivo em lâmina objetivando o estudo mais detalhado da microscopia das estruturas fúngicas. A presença de dois tipos de conídios: hialinos a marrom, de parede fina, em conidióforo do tipo simpodial e conídios escuros de parede espessa, dispostos ao longo da hifa identifica a amostra como *S. schenckii* (Dixon et al, 1991).

A observação de crescimento de uma colônia miceliana com aspectos descritos acima é indicativa para a realização do teste de termo-conversão da colônia em meio de BHI ágar (Brain Heart Infusion Agar) com extrato de levedura. Para tanto, distribui-se um pequeno inóculo por toda a superfície do meio de cultura e incuba-se a 37°C por cinco dias. A colônia, após a conversão do fungo à levedura, assumirá um aspecto cremoso de cor bege amarelado (Morris-Jones, 2002; Criseo et al, 2008b). As colônias de *S. schenckii* são urease negativas após sete dias, podendo torna-se urease positivas ao décimo-quarto dia (Sigler et al, 1990). O *S. schenckii* em cultura à 37°C apresenta células leveduriformes hialinas, pequenas, globosas com um ou mais brotamentos claveiformes, tais como aquelas observadas no exame direto. A confecção de lâminas de *S. schenckii*, tanto na fase filamentosa como na leveduriforme, é feita com lactofenol-azul de algodão e estas são observadas em um microscópio óptico nos aumentos de 100 e 400X.

Para o estabelecimento do diagnóstico sorológico da esporotricose várias técnicas têm sido descritas. Reações de imunodifusão dupla com soro de pacientes com esporotricose subcutânea não costumam apresentar reações cruzadas com leishmaniose e cromoblastomicose, doenças com manifestações clínicas semelhantes às da esporotricose. O teste de imunoeletroforese apresenta alta sensibilidade, sendo observado em todos os casos positivos, a presença de um arco anódico, chamado arco S (Albornoz et al, 1984). Os testes de aglutinação em tubo e em partículas de látex têm grande valor na pesquisa de anticorpos, demonstrando boa sensibilidade e especificidade (Karlin & Nielsen, 1970; Blumer et al, 1973; Casserone et al, 1983). Técnicas imunoenzimáticas também começaram a ser utilizadas no diagnóstico da esporotricose, sendo descritas algumas reações. As primeiras reações imunoenzimáticas (ELISA) descritas foram utilizando um antígeno purificado de parede celular da forma leveduriforme (Bernardes-Engemann et al, 2005), e um extrato bruto de cultivo da forma filamentosa de *S. schenckii* (Almeida-Paes et al, 2007a). Ambas as técnicas demonstraram valores de especificidade e sensibilidade satisfatórios. Recentemente Almeida-Paes e colaboradores (2007b) descreveram que ELISA utilizando exoantígenos de *S.*

schenckii, a qual apresentou sensibilidade de 97%, especificidade de 89% e eficiência de 92%, estava associada com a detecção de três isotipos IgG, IgA e IgM e que dependendo do isotipo verificado existe um aumento da sensibilidade e a especificidade deste método para o diagnóstico da esporotricose.

1.2 - O gênero *Sporothrix*

1.2.1. Sistemática

Infecções fúngicas invasivas por leveduras e fungos filamentosos são significativa causa de morbidade e mortalidade em indivíduos com comprometimento do sistema imune e também os que estão sob procedimentos invasivos. Com isso, a rápida identificação dos agentes etiológicos isolados de espécimes clínicos é particularmente importante. Neste sentido, a sistemática e seu principal constituinte a taxonomia dos fungos patogênicos possui grande importância uma vez que a posição exata dos fungos na classificação informa as características do microorganismo, permitindo encaminhar, com maior confiabilidade, o melhor esquema terapêutico ou profilático a ser utilizado.

Os estudos taxonômicos em micologia iniciaram-se oficialmente no ano de 1753 em estudos de Linnaeus, onde foi proposto o sistema binomial de nomenclatura. Christian Hendrich Persoon e Elias Magnus Fries conotativamente denominados “pais da micologia” propuseram a hipótese de ocorrência de relação entre todos os níveis da sistemática taxonômica. Juntamente com os demais taxonomistas do século, promoveram um sistema de classificação estruturado no estudo da morfologia comparativa. Nesse sistema proposto baseou-se a classificação de espécies e gênero. Poucos sistemas foram propostos em substituição aos já implementados no século 19, sendo o que mais se destacou foi o da hipótese filogenética por arranjo numérico e a associação de maior quantidade de características. Dentre os taxonomistas que a desenvolveram temos Pier Andrea Saccardo, o qual foi responsável pela inserção de características primordiais na classificação dos fungos como a observação da coloração, forma e da presença de septos; características essas que segundo o autor deveriam ser catalogadas. A contribuição de Saccardo a taxonomia fúngica foi considerada adversa pelas próximas gerações de micologistas chegando a ser taxada como inoperante segundo Korf (2005.) A quimiotaxonomia foi

também utilizada na sistematização, mas com poucos adeptos e promovendo surpresa entre os não envolvidos nesse sistema.

O' Hara (1997) apresentou uma visão resumida e muito didática da sistemática no século 20 realizando a divisão da mesma em dois períodos: **população sistemática** implementado entre os anos de 1930 e 1940 e da **sistemática filogenética** a qual foi iniciada em 1960 e continua sendo utilizada durante todos os anos até o presente.

Historicamente, a classificação dos fungos primeiramente se baseou em dois principais eixos: **fenótipo** o qual inclui todas as características que possam ser vistas ou medidas diretamente à partir do microorganismo, como por exemplo, produção de metabólitos secundários, e bem utilizada na taxonomia de fungos filamentosos (Frisvad, 1998); **ecologia** e **fisiologia** tal como características de crescimento sobre diferentes substratos (Frisvad, 1998; Frisvad & Samson, 2004), muito eficiente na classificação de leveduras. Com o transcorrer do tempo um terceiro eixo foi introduzido para delimitação de espécie, onde o **genoma** do fungo reflete a herança genética (filogenia) (Guarro et al, 1999; Taylor et al, 2000). A classificação baseada na filogenia pode ser utilizada em todos microorganismos, entretanto, uma grande parte do genoma pode ser muito similar entre alguns gêneros, e a escolha do gene correto implicará na determinação de espécie. Todos os três estão fortemente inter-relacionados e algumas vezes redundantes, mas igualmente importantes na descrição, entendimento e classificação de espécies (Smedsgaard & Nielsen, 2004). Promovendo a realização da taxonomia polifásica, na qual realiza-se a junção de características fenotípicas e genotípicas.

A definição de espécies fúngicas não apresenta um consenso entre os micologistas. Atualmente os conceitos de espécie mais comumente utilizados na classificação são:

1. **O conceito morfológico ou fenotípico ou de fenótipo** é clássico sendo baseado na descrição das características morfológicas ou outras características fenotípicas, como termotolerância, produção de metabólitos secundários, presença de pigmento, entre outros (Taylor et al, 2000).

2. **O conceito ecológico** que se baseia na adaptação dos organismos ao habitat e na reprodução isolada, apresentando grande aplicabilidade na classificação de fungos patógenos de plantas (Davis, 1995).

3. **O conceito biológico** o qual define espécie como populações que se reproduzem entre si produzindo uma progênie viável e são isoladas reprodutivamente dos

outros grupos (Kwon-Chung & Varma, 2006). Este também está fundamentado nas variações genéticas entre espécies com possível compartilhamento de genes e na presença de barreiras quanto a essa “troca de genes” (Davis, 1995; Taylor et al, 2000).

4. **O conceito filogenético** que define espécie como o menor agrupamento de indivíduos interconectados por relações genéticas (Taylor et al, 2000).

Todos estes conceitos apresentam vantagens e desvantagens na classificação de fungos. Smedsgaard & Nielsen (2004) propuseram um simplificado e prático modelo para “**conceito de espécie**” o qual engloba a combinação de caracteres fenotípicos juntamente com os aspectos relacionados ao ambiente (ecologia) e suas características hereditárias (filogenia ou genoma) (Fig. 1). Este modelo conceitual poderia ser utilizado na classificação e taxonomia (Fig. 1A), na descoberta de novas espécies (Fig. 1B), e na caracterização de diversos aspectos relacionados à própria espécie que poderiam ter relevância biotecnológica (Fig.1C).

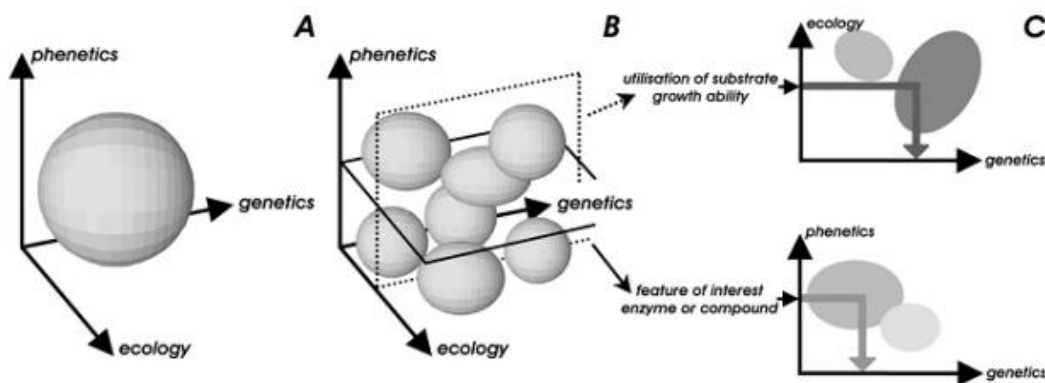


Figura 1. O conceito de espécies delimitado pelo fenótipo, ecologia e genoma. Smedsgaard and Nielsen (2004), p.274

A inserção de conceitos de biologia molecular fundamentados principalmente na análise de seqüências nucleotídicas do DNA possibilitou o acesso a novas informações sobre os isolados caracterizados. Estudos de morfo-espécies ou de morfologia das espécies estão empregando a associação de variáveis biológicas e filogenéticas, sendo um dos grandes questionamentos enfrentados pelos morfologistas a decisão de quantas diferenças são necessárias para a definição de espécies diferentes. Segundo Guarro e colaboradores (1999), a aplicação do conceito filogenético de espécies tem parcialmente respondido ao

questionamento dos morfologistas quando esse conceito é fundamento na análise cladística de características moleculares, o que permite bases estruturadas na realização do delineamento das espécies. A utilização do cladograma determina a existência de grupos monofiléticos os quais podem ser classificados como espécies ou subespécies.

1.2.2. Filogenia do Gênero *Sporothrix*

O agente etiológico da esporotricose, *S. schenckii*, é um fungo dimórfico, que pode ser encontrado no meio ambiente na forma filamentosa, tendo como habitat natural vegetação, madeira em decomposição e solo. *S. schenckii* está inserido no Reino Fungi, sendo um organismo eucariótico, heterotrófico, sem mobilidade própria, com parede celular quitinosa e rígida. Constituinte da Divisão Ascomycota, da Classe Pyrenomycetes, Ordem Ophiostomatales e Família Ophiostomataceae (Guarro et al, 1999).

Até o presente não se conhece a forma de reprodução sexuada de *S. schenckii*, embora haja fortes evidências moleculares de que este fungo sofra mecanismos de recombinação na natureza (Mesa-Arango et al, 2002). Estudos demonstram que *S. schenckii* é um ascomiceto, uma vez que apresenta septo simples, com corpúsculos de Woronin (Smith & Batenburg-van der Vegte, 1985) e três genes de quitina sintase (Chua et al, 1994). Análises moleculares da região 18S do DNA ribossomal mostraram evidências indiretas de que a forma sexuada deste fungo pudesse ser *Ophiostoma stenoceras* (Berbee & Taylor, 1992), porém, estudos morfo-fisiológicos mostram diferenças básicas entre as duas espécies: *O. stenoceras* é incapaz de produzir conídios demáceos, conforme todos teleomorfos, ao contrário de *S. schenckii*, um anamorfo, não produzindo peritécio em meios de batata, arroz ou malte, como acontece com os isolados de *O. stenoceras* (Dixon et al, 1991; O'Reilly & Altman, 2006); as diferenças também se demonstram quando ambas espécies são inoculadas em camundongos, pois *S. schenckii* é encontrado em diversos tecidos após inoculação intravenosa, o que não ocorre com *O. stenoceras*, que somente é encontrado em determinados órgãos e nunca em todos os animais inoculados (Dixon et al, 1992). Tais observações levaram a considerar como espécies diferentes o anamorfo de *O. stenoceras* (*Sporothrix* spp.) e *S. schenckii*. Outros estudos moleculares (Hintz, 1999) unidos aos de Berbee & Taylor (1992), reforçam, entretanto, que a forma teleomórfica do patógeno *S. schenckii* pertença ao gênero *Ophiostoma*.

Recentemente, Marimon e colaboradores (2007) sugeriram que o *S. schenckii* não deveria ser considerada a única espécie causadora da esporotricose uma vez que através da combinação de características fenotípicas e genéticas, onde uma chave de identificação foi desenvolvida (Tabela 1), e proposta à criação de três novas espécies: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix mexicana* (Tabela 1). Sendo essas associadas às demais espécies já existentes *S. schenckii* e *S. albicans*, apresentando a última uma característica peculiar que é a presença apenas de conídios hialinos. Estes autores realizaram estudos fenotípicos incluindo morfologia de conídios em meio Corn Meal Agar à 30°C por 10 a 12 dias, teste de crescimento à 30°C do isolado em meio de ágar batata (PDA) incubado por 21 dias, teste de crescimento à 37°C do isolado em meio PDA incubado por 21 dias e auxonograma utilizando os açúcares rafinose, e sacarose conforme chave de identificação proposta. Já no estudo genotípico a reação da polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada com as seqüências iniciadoras CL1 e CL2A, as quais são oriundas do gene da calmodulina. Posteriormente, o mesmo grupo sugere que *S. schenckii* var. *luriei* deveria, também, ser considerada uma nova espécie (Marimon et al, 2008b) após estudos baseado na mesma metodologia proposta anteriormente (Marimon et al, 2007).

1.2.3. Morfologia e Fisiologia

Os fungos classificados dentro do gênero *Sporothrix* são de caráter dimórfico; em vida saprofítica ou em cultivo a 25°C apresenta-se na forma filamentosa, como hifas hialinas, septadas, ramificadas, com conídios unicelulares de dois tipos: hialinos a castanhos (demáceos). Os conídios hialinos são pequenos, ovóides, surgindo de dentículos distintos na porção apical dos conidióforos. Já os conídios demáceos são grandes, ovóides, com parede celular espessa, sendo observados ao longo de toda a extensão das hifas (St-Germain & Summerbell, 1996). Os conídios não possuem a propriedade de realizar a formação de cadeias (Sigler et al, 1990). A macroscopia da colônia nesta fase evolutiva do fungo se apresenta inicialmente de cor branca e gradativamente, ao formar conídios escuros assume coloração marrom a negra. Em parasitismo, ou a partir de espécimes clínicos sob cultivo à 37°C em meio de cultura apropriado, o *S. schenckii* se apresenta como leveduras unicelulares ovaladas, globosas e em forma de charuto, podendo apresentar um ou mais brotamentos (Chandler et al, 1980; Ramos-e-Silva et al, 2007). Macroscopicamente a colônia de *S. schenckii* a 37°C

apresenta coloração bege amarelada e aspecto cremoso (Morris-Jones, 2002; Criseo et al, 2008b).

Poucos são os trabalhos referidos na literatura especializada sobre as características fisiológicas de *S. schenckii*. Gosh e colaboradores (2002) analisaram e compararam 49 isolados de *S. schenckii* de três regiões da Índia e observaram que as mesmas não apresentaram variação na morfologia em três diferentes meios de cultivo. Além disso, o crescimento de todos os isolados foi inibido a 40°C, com crescimento ótimo entre 30 e 37°C. As leveduras se mostraram mais tolerantes à pressão osmótica que a forma filamentosa, crescendo em três dias, em meio contendo 20% de glicerol, e 10 isolados apresentaram tolerância em 30% de glicerol. Na fase micelial todos os isolados cresceram lentamente em meio com 20% de glicerol, e nenhum cresceu na concentração de 30%. Houve crescimento de todos os fungos na fase leveduriforme em meios acrescidos de NaCl a 9%; já em concentrações mais elevadas somente 24% dos isolados estudadas foram tolerantes. A forma filamentosa não foi capaz de crescer em concentração acima de 7%. O crescimento ótimo da forma miceliana foi vista no pH entre 3,0-11,5, entretanto algumas amostras foram tolerantes ao pH de 12,5. Por outro lado, leveduras cresceram bem a um pH entre 3,0-8,5, mas alguns isolados puderam crescer mesmo em pH 2,0. Variações no padrão de assimilação de carboidratos foram observadas em isolados de diferentes áreas geográficas. Todos os isolados assimilaram adonitol, celobiose, frutose, galactose, glicose, glicerol, maltose, manose, sorbitol, sacarose, trealose e xilose e nenhuma foi capaz de assimilar inositol, lactose e dulcitol. Os isolados do norte da Índia não assimilaram ramnose, do oeste não assimilaram amido. Todos os isolados do sul da Índia assimilaram rafinose e dextrose. Apenas a forma filamentosa pôde degradar a uréia após 96 horas de incubação. O teste de fenol oxidase foi positivo para todos os isolados. Tanto a fase leveduriforme quanto a miceliana de todos os isolados puderam assimilar KNO₃. Nenhum dos isolados hidrolisou caseína e não apresentaram atividade de gelatinase (Gosh et al, 2002).

Mais recentemente, alguns outros trabalhos descrevem as características fisiológicas de cepas de *S. schenckii* preservadas em água e por repiques sucessivos (Mendonza et al, 2005), onde observou-se alterações na capacidade de liquefazer gelatina, bem como na degradação de amido.

1.2.4. Fatores de virulência

Seres humanos estão constantemente expostos a diferentes microorganismos, entre eles, os fungos, mas somente um número limitado entre os últimos pode causar doença. Com isso, a patogenicidade não é uma característica estável na maioria dos fungos. Vários fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência destes microorganismos têm sido descritos na literatura especializada, sendo alguns destes bem determinados como: parede celular e estruturas complementares responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, como a produção de fosfolipases, proteases e elastases capazes de causar dano tecidual e quebrar as defesas do hospedeiro, a capacidade de fazer “switch” a várias vias metabólicas que são fundamentais para a sobrevivência intracelular, a termotolerância (capacidade de crescer a 37°C) a qual é pré-requisito para disseminação hematogênica. fungos dimórficos, entre eles o *S. schenckii*, fazem morfogênese conforme o ambiente em que se encontram (Hogan et al, 1996).

Os fatores de virulência do *S. schenckii* são pouco conhecidos devido à escassez de estudos. Steenbergen e colaboradores (2004) sugerem que a origem da virulência esteja relacionada às relações intermicrobianas existentes no habitat natural do *S. schenckii*, sendo demonstrado por esses que as células leveduriformes quando fagocitadas por *Acanthamoeba castellanii* são capazes de sobreviver em seu interior, matar a ameba e utilizá-la como nutriente. Estas relações também são observadas em outros fungos dimórficos patogênicos, como o *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e pelo *Cryptococcus neoformans*. Entretanto essa característica não é compartilhada por fungos patogênicos que não possuem o solo como seu habitat primário como, por exemplo, *Candida albicans*, ou por fungos não patogênicos como o *Saccharomyces cerevisiae* (Steenbergen et al, 2004; Malliaris et al, 2004).

Um dos principais fatores de virulência associado ao *S. schenckii*, assim como a outros fungos patogênicos, é a termotolerância. Na esporotricose, isolados que são capazes de crescer a 35°C, mas incapazes de realizá-lo a 37°C não promovem lesões linfangíticas, limitando-se a infecções cutâneas fixas. Já os isolados oriundos de lesões linfangíticas, disseminadas e extracutâneas apresentam tolerância e crescimento a 37°C (Kwon-Chung & Bennet, 1992). Recentes estudos demonstraram que os isolados de *S. schenckii* provenientes da Colômbia, onde a forma clínica predominante da esporotricose é a cutânea

fixa, apresentaram alta taxa de inibição do crescimento entre 35 a 37°C, ao contrário de cepas do México e da Guatemala, onde as formas linfangíticas predominam (Mesa-Arango et al, 2002).

Tem sido amplamente discutido que a melanina pode atuar como fator de virulência em vários fungos patogênicos. *S. schenckii* é capaz de sintetizar melanina, e, portanto, poderia ser outro fator de virulência apresentado pelo mesmo (Jacobson, 2000). A produção de melanina nos conídios de *S. schenckii* ocorre por meio da via do 1,8-diidroxinaftaleno penta acetato (Romero-Martinez et al, 2000). Embora macroscopicamente somente a forma filamentosa do fungo pareça ser melanizada, recentemente foi demonstrada a produção de melanina por *S. schenckii* também nas formas leveduriformes, tanto *in vitro* como durante a infecção. As hifas, porém não são capazes de sintetizar melanina, somente os conídios (Morris-Jones et al, 2003). Foi demonstrado que a melanização dos conídios torna-os mais resistentes à fagocitose por macrófagos, o que favoreceria a instalação da infecção, já que estas são as partículas infectantes do fungo (Romero-Martinez et al, 2000).

2. RELEVÂNCIA e JUSTIFICATIVA

A esporotricose é a doença fúngica subcutânea com alta frequência no Estado do Rio de Janeiro nos últimos anos, ocorrendo um aumento no número de casos diagnosticados em humanos, no IPEC (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas), de 13 entre 1987 a 1997, para 759 casos entre o período de 1998 a 2004 (Barros et al, 2001; Schubach et al, 2008). A partir de 1998 até os dias de hoje, os Laboratórios de Pesquisa Clínica em Dermatologia Infecciosa, Laboratório de Pesquisa Clínica em Zoonoses do IPEC - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e nosso laboratório, Laboratório de Micologia, vêm observando a maior e mais duradoura epidemia de esporotricose na forma de zoonose na cidade do Rio de Janeiro e seus arredores transmitida por felinos (Barros et al, 2001, 2004; Schubach et al, 2004), sendo atualmente considerada uma endemia. Uma vez que segundo conceitos uma endemia é uma doença infecciosa que ocorre habitualmente e com incidência significativa em dada população ou região (Halloran, 2001).

Nesta endemia, um amplo espectro clínico tem sido observado. A forma predominante de apresentação clínica é a cutânea clássica. Entretanto, apresentações consideradas raras como lesões cutâneas com múltiplas localizações (16,3%) e envolvimento das mucosas conjuntival (2,8%) e nasal foram observadas (Schubach et al, 2005a; Barros et al, 2004). Neste sentido, associações como eritema nodoso (Gutierrez-Galhardo et al, 2002) e eritema multiforme (Gutierrez-Galhardo et al, 2005) foram descritas pela primeira vez. Provavelmente esta forma de transmissão exibindo uma riqueza parasitária deve estar influenciando estas formas de apresentação clínica. Acreditamos que fatores relacionados à forma de transmissão, ao hospedeiro e a virulência do fungo possam estar relacionados à diversidade clínica vista nesta endemia.

O gato com esporotricose apresenta-se ricamente parasitado e constitui uma fonte de potencial zoonótico (Schubach et al, 2002, 2003), transmitindo a doença na ausência de trauma, como observado em 35,5% dos casos da endemia (Barros et al, 2004). É provável que o contato estreito com o gato doente no ambiente domiciliar acarrete repetidas exposições ao *S. schenckii*, possibilitando repetidas inoculações, podendo acarretar em hipersensibilização do

hospedeiro ao fungo (Gutierrez-Galhardo et al, 2002). Entretanto estas questões ainda não foram confirmadas.

Em relação ao *S. schenckii* consideramos importante a descrição do padrão fenotípico e genotípico das cepas provenientes desta endemia uma vez que tem sido sugerido que a mesma seja causada pela nova espécie *S. brasiliensis* (Marimon et al, 2007).

Nosso grupo tem se voltado para a caracterização fenotípica e genotípica de *Sporothrix* spp. isolados nesta endemia. Inicialmente, quando ainda considerada uma epidemia, fungos isolados de pacientes e gatos foram utilizados na caracterização genotípica através da técnica de PCR-RAPD. Foram caracterizados 44 isolados (19 de pacientes e 25 de gatos) provenientes da epidemia, um isolado de origem brasileira anterior ao surto e outro proveniente dos Estados Unidos. Alto grau de similaridade genética foi observado entre os isolados provenientes da epidemia, embora tenha sido possível discriminar entre 5 a 10 perfis genotípicos, sugerindo mais de uma população de *S. schenckii* circulante (Reis, 2004). Os perfis genotípicos dos isolados brasileiros foram diferenciados do isolado dos Estados Unidos. Estes resultados sugeriram uma fonte comum de infecção entre humanos e gatos, e que estes possam estar atuando como o transmissor do fungo. Mais recentemente, foram demonstrados alguns padrões fenotípicos e genotípicos dos isolados de *S. schenckii* provenientes da epidemia do Rio de Janeiro (Gutierrez-Galhardo et al, 2008). Novamente, nossos dados sugerem uma fonte comum de infecção, bem como corroboram dados recentemente publicados (Marimon et al, 2008a), onde isolados provenientes desta endemia são mais suscetíveis aos antifúngicos utilizados na rotina clínica. Com isso, estudos em nível de fenótipo e genótipo têm nos permitido e nos permitirão esclarecer aspectos ainda obscuros relacionados à taxonomia, fisiologia e patogenia do complexo *Sporothrix*, agente etiológico da epidemia da esporotricose no Estado do Rio de Janeiro, contribuindo, portanto para um maior entendimento do agente infectante neste surto de esporotricose fornecendo dados mais significativos para o desenvolvimento e aplicação de medidas profiláticas e esquemas terapêuticos adequados, Estes conhecimentos também nos permitirão explorar a relação parasita-hospedeiro, bem como serão úteis no desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos de diagnóstico.

3.1. Geral

Tem sido sugerido que a presença de variações genéticas entre isolados fúngicos, bem como a classificação de novas espécies fúngicas de interesse clínico poderiam influir no desenvolvimento clínico de diversas micoses entre elas a esporotricose (Marimon et al, 2007). Entretanto, novas investigações são necessárias, uma vez que a amostragem incluída (25 isolados) no estudo relacionado não é representativa da endemia de esporotricose em curso no Estado do Rio de Janeiro. Com isso, nosso principal propósito seria confirmar a taxonomia dessas novas espécies, e sua(s) circulação em nosso meio. Acreditamos que o conhecimento dos fenótipos e genótipos possa desempenhar importante papel na interação fungo-hospedeiro e, portanto, têm importante potencial investigativo podendo gerar contribuições relevantes tanto na patogenia quanto na epidemiologia da esporotricose.

3.2. Específicos

- 3.2.1. Caracterização fenotípica de *Sporothrix* spp. isolados provenientes da endemia (1998 a 2008) de esporotricose do Estado do Rio de Janeiro.
- 3.2.2. Identificação de espécies através de métodos moleculares de isolados não identificados através de seu fenótipo.
- 3.2.3. Avaliação dos métodos utilizados na caracterização fenotípica das espécies do gênero *Sporothrix*.
- 3.2.4. Determinação da espécie do gênero *Sporothrix* mais freqüente na endemia de esporotricose no estado do Rio de Janeiro.

4.1. Microrganismo

Para a caracterização das espécies do gênero *Sporothrix*, foram utilizadas 248 cepas oriundas de pacientes atendidos no ambulatório de Dermatologia do IPEC com diagnóstico de esporotricose associados à epidemia. Estas cepas foram isoladas durante o período entre 1998 e 2008 e armazenadas na Coleção do Setor de Diagnóstico Micológico do Laboratório de Micologia. Para inclusão neste estudo as cepas foram selecionadas de forma aleatória. Uma cepa padrão ou tipo *S. schenckii* 16490(CBS 120339) caracterizada como *S. brasiliensis* por Marimon e colaboradores (2007) também foi incluída em nossa amostragem, bem como 4 cepas controles isoladas anteriormente a epidemia, sendo duas oriundas do estado do Espírito Santo 23251 e 23252 mantidas no Laboratório de Micologia do IPEC, e duas cepas do Rio de Janeiro mantidas na Coleção de Cultura do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), cepas 29333(IOC 1113) e 29335(IOC 1824) isoladas respectivamente em 1926 e 1984.

4.2. Re-isolamento do isolado

Todas as cepas de *Sporothrix* spp. da Coleção de Cultura do Setor de Diagnóstico Micológico são conservadas por diferentes métodos de conservação (óleo mineral, água, liofilização e armazenamento em geladeira). Os isolados foram oriundos de amostras biológicas: secreção da lesão, biopsia de pele e glânglio, urina e líquor. Para o re-isolamento de cepas preservadas na água, óleo mineral e em geladeira foi retirado um fragmento da colônia e semeado em meio Potato Dextrose Agar (PDA) [Difco™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA]. Já as amostras liofilizadas foram suspensas em 0,3mL de água destilada estéril, homogeneizadas e mantidas em repouso por 30 minutos para hidratação da cepa. Subseqüentemente, as mesmas foram re-inoculadas em meio PDA (Figueiredo, 2001). Consideramos esta semeadura como nossa semeadura primária.

4.3. Provas Fenotípicas

A caracterização fenotípica das cepas se baseou no protocolo descrito por Marimon e colaboradores (2007), a qual compreendeu as etapas descritas a seguir:

4.3.1 Morfologia

Após re-isolamento do isolado, *Sporothrix* spp. foi transferido para meio Corn Meal Agar (BBL TMBecton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA) e incubado 30°C por 12 dias. Após o crescimento, preparou-se uma lâmina do fungo em sua fase filamentosa, utilizando um pequeno fragmento da colônia retirado com o auxílio de uma alça de platina, colocado em uma lâmina de vidro contendo uma gota de lactofenol. Realizou-se, também, microcultivo em lâmina do fungo. Para tanto, uma placa com meio PDA foi preparada, e com auxílio de um bisturi estéril cortou-se fatias perpendiculares, formando quadrados de meio com medidas de 1cm x 1cm. Preparou-se uma placa de Petri de vidro estéril (medindo 20mm x 100mm) contendo 1 lâmina e duas lamínulas (22mm x 22mm), 1 bastão de vidro em forma de “U” e no fundo da mesma uma folha de papel filtro. Com uma alça de platina estéril, um quadrado do meio de cultura foi colocado sobre a lâmina, e com auxílio de uma agulha de inoculação o isolado da semeadura primária foi transferido para o microcultivo. Uma lamínula foi depositada sobre o meio inoculado com o fungo. Água destilada estéril foi adicionada sobre o papel filtro, deixando o mesmo úmido. A placa foi fechada e incubada à temperatura ambiente por 7 dias. Após observação macroscópica do crescimento fúngico, a lamínula foi retirada com uma pinça estéril, colocada sobre uma lâmina limpa contendo uma gota de lactofenol azul de algodão (McGinnis, 1980).

Ambas as preparações foram levadas ao microscópio óptico e observadas em aumento de 400X e 1000X para verificação das seguintes características dos conídios: cor (demáceos e hialinos ou somente hialinos) e forma dos conídios.

4.3.2. Medida do diâmetro de colônias

Para este fim, fragmento de cultura de *Sporothrix* spp. de semeadura primária em meio PDA foi re-inoculado na região central de outra placa de Petri contendo o mesmo meio. Após um período de incubação por 21 dias a 30°C foi realizada a medida do diâmetro das colônias utilizando régua, obtendo-se a distância em milímetros entre as duas extremidades da colônia.

4.3.3. Termotolerância

As cepas de *Sporothrix* spp. foram re-inoculadas em meio PDA utilizando um fragmento de aproximadamente 1mm de diâmetro. Posteriormente foram incubadas por 21

dias a 37°C para observação da capacidade de crescimento nesta temperatura. Realizou-se também a medida do diâmetro das colônias utilizando régua.

4.3.4. Assimilação de Carboidratos

O teste de assimilação de compostos de carbono foi realizado em 50µL meio líquido Yeast Nitrogen Base (YNB) [Difco™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA] 4 vezes concentrado acrescido de 100µL de diferentes fontes de carbono: glicose, sacarose (ambos Sigma Aldrich, Inc. St Louis, MO 63103 USA), e rafinose (Vetec Química Fina Ltda). Para esta metodologia, foram utilizadas microplacas de poliestireno contendo 96 poços com fundo em U, estéreis (Nunclon™, Delta Surface, Denmark).

Para inoculo no teste de assimilação foi preparada uma suspensão em 2 ml de água destilada previamente esterilizada e filtrada no momento de uso, a partir de um subcultivo de *Sporothrix* spp em sua forma filamentosa, com turvação ajustada a uma densidade óptica (DO) entre 0,20 a 0,29 nm (2×10^5 até 2×10^6 UFC/mL).

Para realização do teste, 50µL do inoculo na concentração desejada foram transferidos para a microplaca, conforme o esquema a seguir:

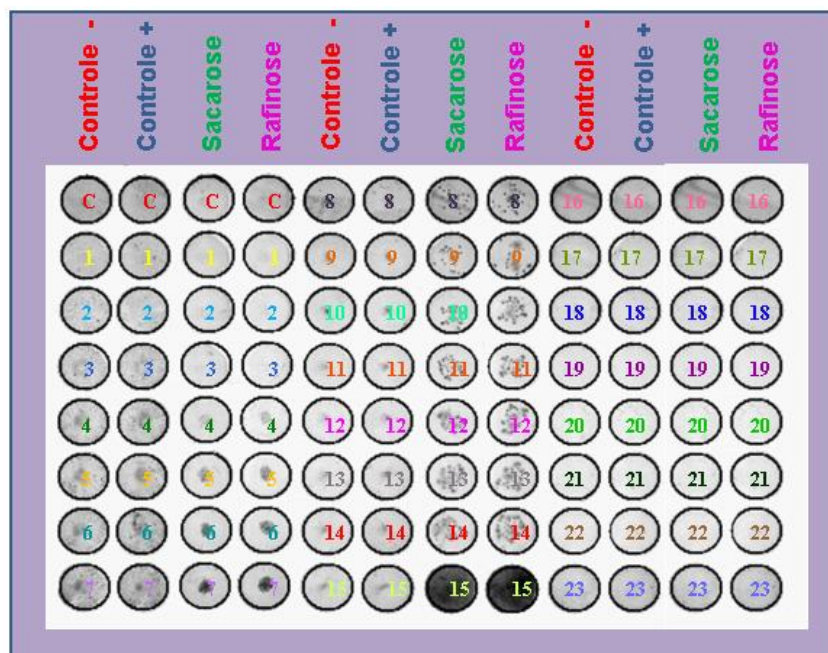


Figura 2. Esquema do método de assimilação de carboidratos. Controle -: 50ul YNB+100ul H2 O2 estéril + 50ul do inoculo; Controle +: 50ul YNB+100ul glicose+50 ul do inoculo. Números de 1 a 23 são as cepas testadas

As placas foram incubadas por 10 dias a 25°C. A leitura da turvação foi feita no 5º dia de crescimento e no 10º dia. O critério de reação positiva ou negativa foi baseado no crescimento do *Sporothrix* spp. Foram considerados como resultados positivos a presença de crescimento fúngico e negativo a ausência.

4.3.5. Banco de dados dos fenótipos

Todos os resultados obtidos nos métodos de caracterização fenotípica foram inseridos em um banco de dados em Programa Excel criado por nós, utilizando uma ficha padrão para coleta dos dados.

4.4. Métodos Moleculares

Metodologias convencionais aplicadas a ácidos nucleicos foram utilizadas para caracterização taxonômica entre os alguns isolados.

4.4.1. Extração de DNA

Técnicas convencionais utilizadas para a extração e purificação do DNA genômico de fungos filamentosos e/ou leveduras foram aplicadas aos isolados do gênero *Sporothrix*, os quais não foram identificados ao nível de espécie através da caracterização fenotípica (Sambrook et al, 1989). A extração de DNA constuiu-se das seguintes etapas:

1. Lise Mecânica: Nitrogênio Líquido / TES(Tris Etilenodiamino Tetracético Sorbitol)
2. Precipitação de Proteínas: Clorofórmio Álcool Isoamílico (24:1)
3. Precipitação DNA: Acetato de Sódio (3M)/ Álcool Absoluto
4. Hidratação do DNA: Água destilada

4.4.2 Eletroforese em gel de agarose

Tanto para verificação da pureza do DNA extraído e determinação de sua concentração, bem como para confirmação da amplificação pela PCR através da visualização dos *amplicons* foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1% (Agarose Ultra-Pure – Invitrogen) em tampão TBE 0,5X (0.1 M Tris, 0.09 M ácido bórico, 0.001 M EDTA, pH 8.4). Cinco microlitros de DNA e/ou do produto de PCR foram adicionados em cada poço

do gel, e a eletroforese foi conduzida a 80V por 45 a 60 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) com agitação a 30 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos e descorados com água destilada por 30 minutos antes de ser examinado em transiluminador (UV transiluminador – Hoefer Scientific Inc) e então fotografados.

4.4.3. Reação da polimerase em cadeia (PCR) e seqüenciamento

Para realização do seqüenciamento parcial dos genes da calmodulina (CAL) as seguintes seqüências iniciadoras (“primers”) foram utilizadas: “primers” senso CL1 (5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3') e antisenso CL2A (5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3') (O'Donnell et al, 2000). As condições de PCR utilizadas foram iguais as previamente descritas para amplificação do gene calmodulina (Susca et al, 2007) com a implementação de ajustes. Sucintamente, a reação da PCR foi composta de 100ng de DNA genômico, tampão do PCR 10X/MgCl₂ (Applied Biosystems), 0.5 mM MgCl₂; 30µmol de cada “primer”, 200 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP – Invitrogen), e 2.5 U of *TaqGold* DNA Polimerase (Applied Biosystems) em um volume total de 100 µl. Desnaturação inicial do DNA foi obtida com aquecimento a 94°C por 10 minutos. A seguir, a PCR foi realizada por 35 ciclos com 50 segundos de desnaturação a 94°C, 50 segundos de pareamento a 60°C, e extensão por 1 minuto a 72°C, seguido de uma extensão final por 7 minutos a 72°C. Após amplificação, os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose e purificados usando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Corp., Chatsworth, Calif.) de acordo com instruções do fabricante, sendo posteriormente reconstituídos com 50µl de água destilada. O seqüenciamento foi realizado de acordo com o método de Sanger e colaboradores (1977) no Laboratório de Seqüenciamento da Plataforma de Seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde se utilizou BigDye reagente e o seqüenciador automático Applied Biosystems ABI Prism 3730 (Applied Biosystem, Foster CA, USA). O seqüenciamento foi realizado nas direções 5' e 3' em um volume de reação de 10 µl contendo 4 µl de “premix terminator”, 100 ng de DNA, 3,2 pMoles de “primer” .

4.4.4. Análise de dados

De posse do mapa do seqüenciamento, as seqüências foram analisadas com os programas Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation). A similaridade entre as espécies foi

realizada através da submissão da seqüência nucleotídica no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool- NIH). Análises filogenéticas foram realizadas através do software Mega 4 (Tamura et al, 2007).

8.1. Caracterização Fenotípica

Foram estudados 248 isolados de *Sporothrix* spp oriundos de pacientes atendidos no ambulatório de Dermatologia do IPEC com diagnóstico de esporotricose associados à epidemia. Além destas, uma cepa padrão ou tipo *S. schenckii* 16490 (CBS 120339) caracterizada previamente como *S. brasiliensis* (Marimon et al, 2007), e 4 cepas controles (23251, 23252, IOC 1113, IOC 1824). Em todos os isolados a identificação foi realizada pela observação das características coloniais e morfológicas dos cultivos, e através caracterização fisiológica e bioquímica, os quais segundo Marimon e colaboradores (2007) permitem a caracterização de espécies do gênero *Sporothrix*.

8.1.1 Morfologia

Todos os isolados fúngicos incluídos no estudo, bem como a cepa tipo e os controles, se apresentaram macroscopicamente em sua forma filamentosa com aspecto muito similar na semeadura primária. Após 21 dias de incubação a 30°C em PDA, as colônias apresentavam textura glabra a aveludada, de cor branca, acastanhada ou negra. Somente três cepas (16919, 27022 e 27087) não apresentaram colônias pigmentadas macroscopicamente. Microscopicamente, foram observadas hifas finas, hialinas e septadas. Todos os isolados quando cultivados em meio Corn Meal Agar desenvolveram conídios intercalares ou terminais em conidióforos do tipo simpodial dispostos ao longo da hifa. Estes conídios eram hialinos ou levemente pigmentados, usualmente ovalados ou em forma de pêra. Além destes também foram observados conídios sésseis, escuros, de parede espessa, ligados individualmente ao longo das hifas por minúsculos dentículos (Fig. 3). Estes conídios são mais largos e se apresentam com diferentes formatos. A presença ou ausência destes conídios demáceos, e sua morfologia são características importantíssimas na distinção entre as espécies de *Sporothrix*.

8.1.2. Características dos conídios

A microscopia dos 248 isolados foi feita após incubação em meio Corn Meal Agar por 12 dias a 30°C para estudo da morfologia de conídios. Foram observados conídios hialinos e pigmentados, ovalados, alongados (Fig. 3) e triangulares (Fig. 4). Em 235 isolados (94,8%)

foram visualizados conídios demáceos com morfologia ovalada característica de *S. brasiliensis*, e em 7 (2,8%) conídios pigmentados triangulares característicos de *S. schenckii* (Tabela 2).

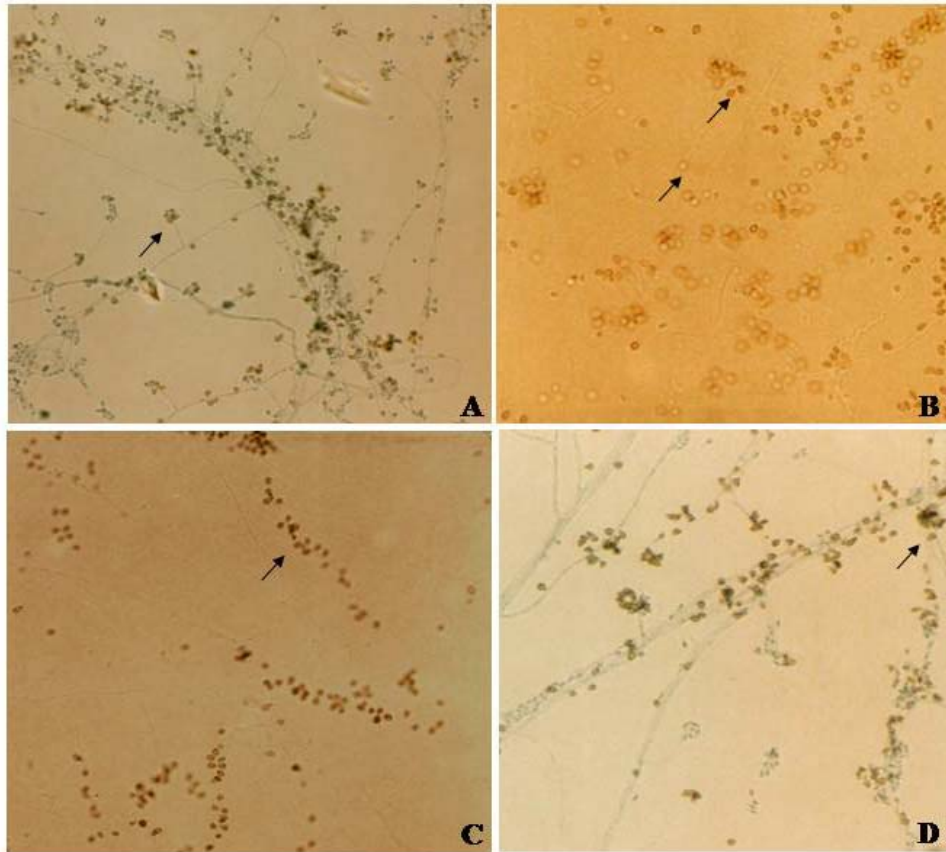


Figura 3. Morfologia de conídios de *Sporothrix* spp. (A) Conídios intercalares ou terminais em conidióforos do tipo simpodial dispostos ao longo da hifa. (B) Conídios hialinos e pigmentados. (C) Conídios sésscis, escuros, ligados individualmente ao longo das hifas. (D) Conídios triangulares (Aumento de 400X)



Figura 4. Conídio triangular característico de *S. schenckii* (400X).

Tabela 2. Morfologia de conídios

CONÍDIOS	ISOLADOS (n)	PERCENTAGEM (%)	% ACUMULADA
Ovalados	235	94,8	94,8
Triangulares	07	2,8	97,6
Hialinos	03	1,2	98,8
Alongados	03	1,2	100,0
TOTAL	248	100,0	

8.1.3. Comparação do crescimento colonial

Para este fim foi realizada a medida do diâmetro das colônias após cultivo de *Sporothrix* spp em meio PDA durante 21 dias a 30°C e a 37°C. O diâmetro de colônia nestas temperaturas é um dos parâmetros auxiliares à chave de identificação para caracterização das espécies, assim como os demais dados estatísticos de dispersão no estudo da frequência. Em nosso estudo a média dos diâmetros das colônias, assim como as medidas estatísticas de dispersão estão demonstradas na Tabela 3, onde se observou que em todos os isolados incluídos no estudo, inclusive os controles, apresentam melhor crescimento a temperatura de 30°C, uma vez que os diâmetros mínimos nesta temperatura variaram entre 9 a 13 mm, e o máximo entre 42 a 51 mm. Apenas um isolado (27722) apresentou diâmetro da colônia de 51 mm no teste de crescimento à 30°C. Cepas com diâmetro acima de 50 mm à 30°C seriam

representativas da espécie *S. mexicana*. Já o crescimento colonial a 37°C foi menor, onde foram observados diâmetros mínimos de colônia com 2 a 3 mm e máximos entre 14 a 20 mm.

Tabela 3. Crescimento colonial de *Sporothrix* spp em PDA após 21 dias de incubação a 30°C e a 37°C

<i>SPOROTHRIX</i> (N)	AMPLITUDE*		MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	
	30°C	37°C	30°C	37°C
206	9-45	2-18	26,9 ± 7,7	6,3 ± 2,5
15	12-49	3-14	33,2 ± 10,2	7,0 ± 3,4
26	13-42	2-20	26,8 ± 7,5	6,3 ± 3,6
1	51	3	51,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0

*Variação entre o diâmetro de colônia mínimo e máximo

8.1.4. Estudos fisiológicos

Todos os isolados incluídos no estudo apresentaram crescimento ótimo a 30°C, e foram termotolerantes a 37°C, com conversão, pelo menos parcialmente nesta temperatura, da forma filamentosa para leveduriforme com brotamentos em forma de charuto.

Quanto à assimilação de carboidratos, a leitura da turvação realizada no quinto dia mostrava algum crescimento fúngico frente à glicose e aos outros açúcares. Já no 10º dia todos os isolados, inclusive os controles, apresentaram crescimento frente à glicose, 15 isolados (6%) assimilaram, além da glicose, sacarose e rafinose, e 23 (9,3%) assimilaram somente sacarose

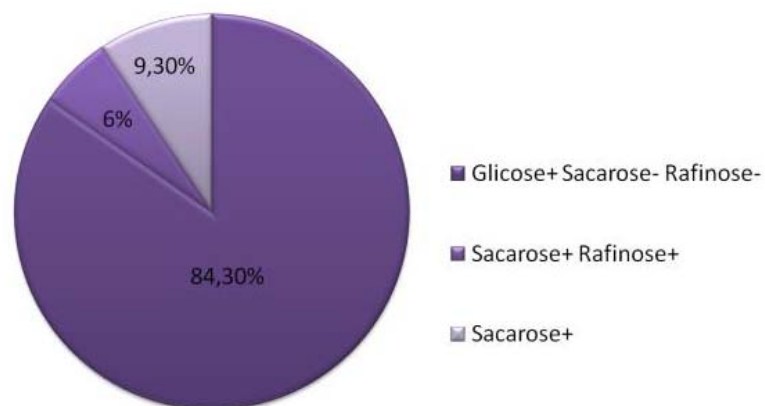


Figura 5. Porcentagem de assimilação de carboidratos por *Sporothrix* spp

Tabela 4. Caracterização de *Sporothrix* spp acordo com a chave de identificação

ESPÉCIES	ISOLADOS (N)	PERCENTAGEM VÁLIDA (%)	% ACUMULADA
<i>S. brasiliensis</i>	206	83,1	83,1
<i>Sporothrix</i> spp	26	10,5	93,6
<i>S. mexicana</i>	01	0,4	94,0
<i>S. schenckii</i>	15	6,0	100,0
TOTAL	248	100,0	

(Fig.5). Nenhum isolado assimilou somente rafinose e nenhum foi capaz de crescer no controle sem carboidrato.

8.1.5. Caracterização fenotípica da cepa tipo e controles

A cepa padrão ou tipo 16490, caracterizada como *S. brasiliensis* por Marimon e colaboradores (2007), foi re-avaliada pelos testes fenotípicos propostos para caracterização de espécies pelos autores acima citados. Essa cepa tipo apresentou diâmetro da colônia em meio PDA à 30°C de 35 mm e à 37°C de 13 mm e foi incapaz de assimilar sacarose e rafinose. Estes dados fenotípicos são característicos de *S. brasiliensis*. Entretanto, microscopicamente, foi verificado que esta cepa produziu conídios demáceos triangulares (Fig.4). Todas as cepas controles (23251, 23252, IOC1113 e IOC1824) incluídas no estudo apresentaram colônias em meio PDA com diâmetro de 38 mm, 41 mm, 45 mm e 38 mm respectivamente, à 30°C e de 13 mm, 13 mm, 10 mm e 9 mm de diâmetro à 37°C, com conídios demáceos triangulares em todas as cepas. Todas assimilaram sacarose e rafinose. Estas características fenotípicas são condizentes com a espécie *S. schenckii*.

8.1.6. Identificação de espécies

Marimon e colaboradores (2007) propuseram uma chave de identificação de espécie baseada nas características fenotípicas descritas na tabela 1.

A Tabela 4 descreve as espécies de *Sporothrix* encontradas entre os 248 isolados incluídos neste estudo. De acordo com as características descritas na chave de identificação 206 isolados (83,1%) foram caracterizadas como *S. brasiliensis*, 01 isolado (0,4%) como *S.*

mexicana, 15 (6,0%) como *S. schenckii* e em 26 isolados (10,5%) não foi possível caracterizar a espécie.

As cepas caracterizadas como *S. brasiliensis* apresentaram ausência de assimilação dos açúcares testados rafinose e sacarose, com presença de conídios demáceos, ovalados, com diâmetro das colônias à 30°C não excedendo 50 mm após 21 dias, e crescimento à 37°C. Já *S.schenckii* produz conídios demáceos, com diâmetro das colônias não excedendo 50 mm em PDA à 30°C após 21 dias de incubação, termotolerância e assimilação de sacarose e rafinose após 10 dias na realização do auxonograma, conforme protocolo utilizado. Uma cepa (27722) apresentou conídios demáceos, crescimento à 37°C, colônia em meio PDA com diâmetro excedendo 50mm após transcorrido 21 dias e assimilação de sacarose e rafinose após 10 dias no auxonograma, e foi caracterizada como *S. mexicana* (Fig. 6).



Figura 6. Morfologia de colônias do Gênero *Sporothrix* em meio PDA à 30°C. (A) *Sporothrix brasiliensis* (B) *Sporothrix schenckii* (C) *Sporothrix* spp

Em 26 (10,4%) cepas de nosso estudo não foi possível realizar a caracterização das espécies segundo chave de identificação (Tabela 3), podendo ser agrupadas como a seguir:

Grupo A: Este grupo é composto de 23 (9,2%) isolados os quais apresentaram conídios demáceos, diâmetro das colônias não excedendo 50 mm em PDA à 30°C após 21 dias de incubação, crescimento à 37°C, e assimilação somente de sacarose após transcorrido 10 dias no auxonograma. A definição de espécie não foi possível uma vez que as mesmas apresentaram perfil bioquímico de assimilação para espécies de *S. globosa* ou *S. albicans*.

Grupo B: Em 1,2% dos isolados (17692, 18782B e 28790) foi verificada produção somente de conídios hialinos, diâmetro das colônias em PDA à 30°C após 21 dias de

incubação não excedendo 50 mm, termotolerância e ausência de assimilação dos açúcares refinose e sacarose, apresentaram perfil bioquímico de assimilação para espécies de *S. brasiliensis*.

Quando correlacionamos às características fenotípicas, como a produção de conídios entre as diferentes espécies do Gênero *Sporothrix* observamos que entre as 248 cepas estudadas quanto à morfologia de conídios, em meio Corn Meal Agar por 12 dias à temperatura de 30°C, a maioria destas 94,8%(235) apresentaram conídios demáceos com morfologia ovalada e ou alongada e 2,8%(7) conídios triangulares (Tabela 5). Duzentos e dois isolados de *S. brasiliensis* (98%) apresentaram conídios ovalados demáceos e dois isolados (1,0%) conídios triangulares (Tabela 5). A maioria das cepas (60%) caracterizadas como *S. schenckii* produziram conídios ovalados demáceos sem a presença de conídios triangulares, os quais segundo estudo de Marimon e colaboradores (2007) seria uma característica peculiar das cepas caracterizadas como pertencentes à espécie *S. schenckii*.

Tabela 5. Conídios produzidos por espécies do Gênero *Sporothrix*

ESPÉCIE	CONÍDIOS DEMÁCEOS			HIALINOS N(%)
	Ovalados N(%)	Triangulares N(%)	Alongados N(%)	
<i>S. brasiliensis</i>	202 (98)	2 (1)	2 (1)	0
<i>Sporothrix spp</i>	23 (88)	0	0	3(12)
<i>S. mexicana</i>	1 (100)	0	0	0
<i>S.schenckii</i>	9 (60)	5 (33)	1 (7)	0

Outra cepa, também caracterizada como *S. schenckii*, produziu conídios ovalados, alongados e pigmentados, morfologia também demonstrada em trabalho anterior como característica desta espécie.

A correlação entre as cepas caracterizadas como *S. schenckii* e presença de conídios triangulares foi realizada utilizando o teste estatístico de Mc Nemar's (Tabela 6). Foram obtidos valores de p (p -valor)=0,961, χ^2 (chi-quadrado) =2,769, OR(Odds Ratio) = 0,300 com IC (Intervalo de Confiança)95%.

Tabela 6. Teste de McNemar's

Conídios Triangulares	SPOROTHRIX SCHENCKII		
	Positivo	Negativo	Total
Presentes	05	03	08
Ausentes	10	230	240
TOTAL	15	233	248

Uma das cepas (27722), caracterizada como *S. mexicana*, produziu conídios ovalados demáceos característicos dessa espécie segundo estudo de Marimon e colaboradores (2007).

Nossas cepas-controle ou tipo também foram re-avaliadas quanto a este aspecto morfológico. A cepa padrão ou tipo 16490 caracterizada como *S. brasiliensis* previamente (Marimon et al, 2007), bem como os outros isolados controles produziram conídios demáceos triangulares.

A correlação do crescimento colonial em meio PDA à 30°C e 37°C por 21 dias entre as espécies está representada na Figura 7. Observa-se que a média dos diâmetros de colônia

à 30°C foi maior em todas as cepas estudadas quando comparados com a média dos diâmetros obtidos após o crescimento à 37°C. *S. mexicana* apresentou o maior diâmetro à 30°C e o menor à 37°C. Já o crescimento de *S. schenckii* foi o maior à 37°C, embora não seja estatisticamente diferente do

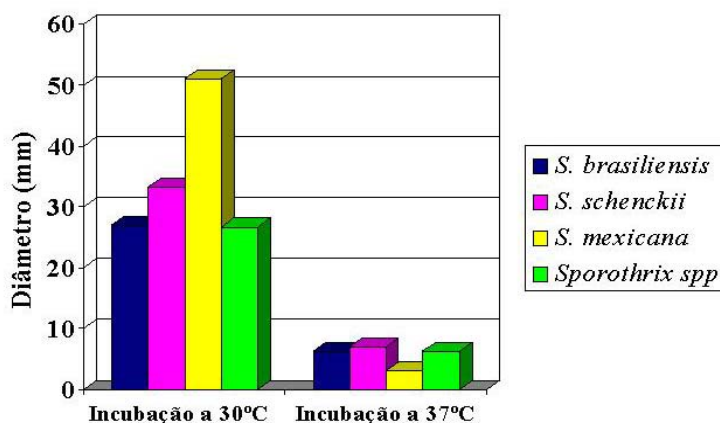


Figura 7. Comparação do crescimento colonial (média dos diâmetros das colônias) em PDA entre as espécies do Gênero *Sporothrix* em duas temperaturas de incubação

crescimento de *S. brasiliensis* ($p=0,57$). Tanto *S. brasiliensis* assim como *Sporothrix* não identificados em nível de espécie apresentaram crescimento colonial semelhante à 30°C ($p=0,79$) e à 37°C ($p=0,58$), com as $\chi = 26,9$ e $26,8$ mm a 30°C e $\chi = 6,3$ à 37°C. O crescimento à 30°C dos isolados de *S. schenckii* e os isolados de *S. brasiliensis* quando comparados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,012$).

8.2. Caracterização Molecular

Em 26 (10,4%) isolados de *Sporothrix* spp. de nosso estudo não foi possível realizar a identificação das espécies segundo chave de identificação (Tabela 4). Destes isolados 8 (31%) foram analisadas por método molecular em uma tentativa de identificar as espécies. Após a extração de DNA destes isolados, e execução da PCR utilizando “primers” senso CL1 e antisenso CL2A foram amplificados fragmentos com aproximadamente 785 pares de base (pb) do gene CAL (Fig 8). Posteriormente, o seqüenciamento foi realizado de acordo com o método de Sanger e colaboradores (1977) no Laboratório de Seqüenciamento da Plataforma de Seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

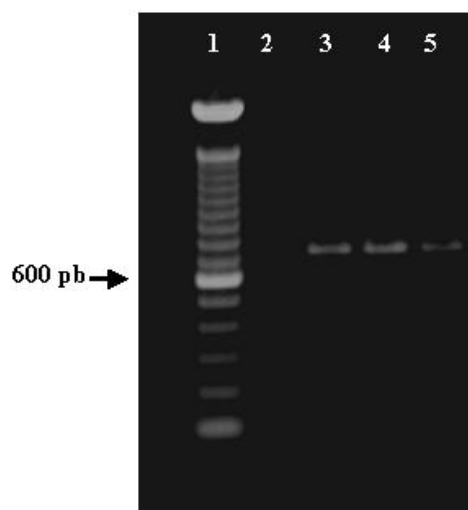


Figura 8. Produto da PCR obtido após amplificação parcial do gene calmodulina de DNA genômica utilizando os “primers” senso CL1 e antisenso CL2A. 1) Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder-Invitrogen; 2) Controle da PCR;3) *Sporothrix* isolado 27417;4) *Sporothrix* isolado 27052; 5) *Sporothrix* isolado 25011.

De posse do mapa do seqüenciamento, as seqüências nucleotídicas foram analisadas com os programas Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation), e enviadas ao programa BLAST para análise de similaridade. A identificação de espécie foi realizada através da submissão das mesmas no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool- NIH). Análises filogenéticas foram realizadas através do software Mega 4 (Tamura et al, 2007).

Conceitualmente, filogenia é a relação histórica, resultante da evolução, entre *taxa* terminais, representada em forma de uma árvore. Para tanto, em nosso estudo, primeiramente

foi feito um alinhamento para estabelecimento das posições homólogas entre as seqüências analisadas. Para este fim, foi utilizado programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool- NIH) através da submissão das seqüências nucleotídicas obtidas em nossos 8 isolados e comparação com seqüências do Gênero *Sporothrix* (AM 398382/ AM 398393/ AM 399012/ AM 116899) depositadas no GenBank. Posteriormente, para a análise fenética foi gerado um fenograma (árvore evolutiva baseada em similaridades) utilizando o método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), onde a análise resultante demonstrou que 7 isolados de nossa amostragem apresentaram entre 90 a 100% de similaridade com *S. brasiliensis* AM116899, formando um grande grupo composto somente por *S. brasiliensis*. Um de nossos isolados não foi inserido neste grupo, e também não apresentou similaridade com as outras espécies incluídas na análise (Fig. 9). A avaliação da significância da árvore foi realizada através do teste de confiança conhecido como “Bootstrap” que é um teste estatístico que mede o grau de suporte dos nós formados nas árvores filogenéticas (Felsenstein, 1985). Em nossa avaliação, em 1.000 replicatas, o nível de confiança de ocorrência dos nós onde nossos isolados foram incluídos foi de 79%.

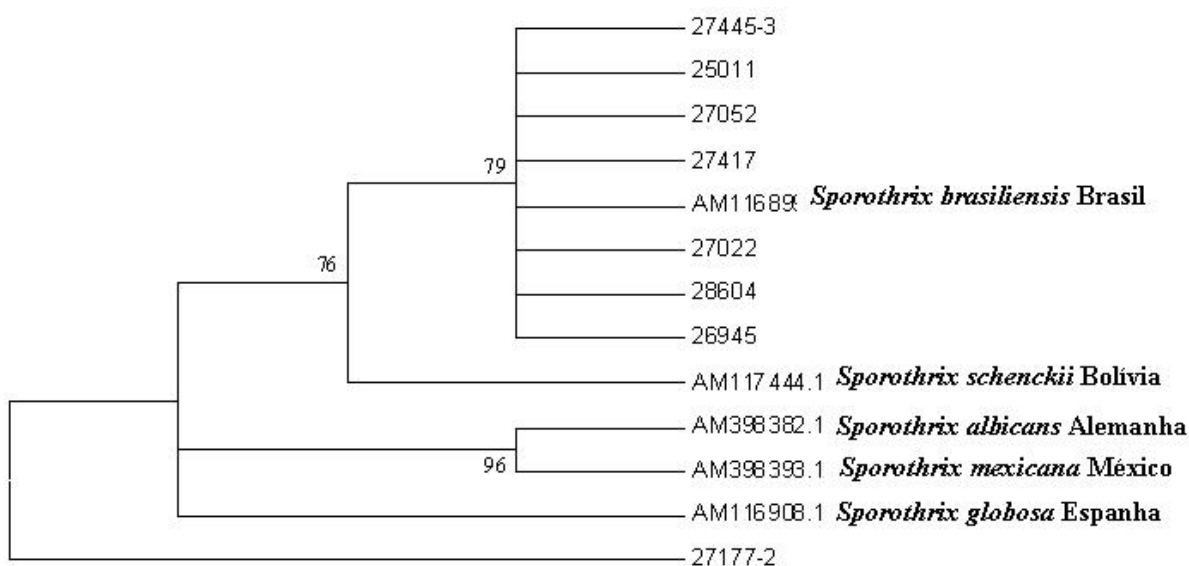


Figura 9. Fenograma resultante da evolução entre 13 taxa utilizando o método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Os valores de “bootstrap” em 1.00 replicatas são indicados nos nós formados na árvores filogenética. Análises filogenéticas foram realizadas pelo MEGA4 (Tamura et al., 2007)

9. DISCUSSÃO

A esporotricose tem aumentado significativamente no Brasil em especial no Estado do Rio de Janeiro, na última década, com a ocorrência de uma endemia relacionada à transmissão zoonótica de gatos para humanos, ocasionando pequenos surtos domésticos e de profissionais (Schubach et al, 2008). Sabe-se que os pacientes envolvidos nesta endemia habitam áreas com condições sócio-econômicas desfavoráveis e contam com um precário serviço de saúde. Além disso, o aumento do número de casos em nosso Estado nos últimos anos está diretamente relacionado à íntima relação de humanos com gatos infectados (Schubach et al, 2008). Esta forma de transmissão zoonótica da doença tem acarretado em mudanças nas manifestações clínicas usuais da esporotricose, tal como o acometimento primário da mucosa nasal (Schubach et al, 2003), eritema nodoso (Gutierrez-Galhardo et al, 2002), eritema multiforme (Gutierrez-Galhardo et al, 2005), conjuntivite primária (Schubach et al, 2005a). Também é elevado o número de casos de esporotricose cutânea disseminada, uma forma clínica menos comum da doença (Barros et al, 2003).

Até 2007 têm-se nomeado *Sporothrix schenckii* como agente etiológico da esporotricose, sendo considerada a única espécie patogênica para o homem e animais (Schubach et al, 2005b) embora o Gênero *Sporothrix* englobe várias espécies morfológicamente semelhantes.

Análises prévias utilizando metodologias baseadas na análise de ácidos nucléicos, tais como RAPD e seqüenciamento parcial de alguns genes (Reis, 2004; Marimon et al, 2006; Gutierrez-Galhardo et al, 2008) demonstraram o agrupamento de *Sporothrix* isolados durante a epidemia do Estado do Rio de Janeiro em clados diferenciados de outros isolados provenientes de outras regiões geográficas no Brasil e de outros países. Alto grau de similaridade genética foi observado entre os isolados provenientes da epidemia, embora tenha sido possível discriminar entre 5 a 10 perfis genotípicos, sugerindo-se mais de uma população de *S. schenckii* circulante (Reis, 2004). Estes resultados sugeriram uma fonte comum de infecção entre humanos e gatos e que estes atuam como vetores de transmissão do fungo. Mais recentemente, foram demonstrados alguns padrões fenotípicos e genotípicos dos isolados de *S. schenckii* provenientes da endemia do Rio de Janeiro, associados a manifestações clínicas

raras da esporotricose e sua correlação com as diferentes formas clínicas (Gutierrez-Galhardo et al, 2008). Novamente, estes dados sugeriram uma fonte comum de infecção.

Recentemente, Marimon e colaboradores (2007) sugeriram que *S. schenckii* não deveria ser considerada a única espécie causadora da esporotricose uma vez que através da combinação de características fenotípicas e genéticas estudadas em 127 isolados de *S. schenckii* foi proposta à criação de três novas espécies dentro deste complexo: *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*, sendo que *S. brasiliensis* seria a cepa circulante responsável pela ocorrência da endemia em nosso Estado. Posteriormente, o mesmo grupo descreve *S. luriei* como uma nova espécie (Marimon et al,2008b). Entretanto, apenas 25 isolados oriundos de pacientes com esporotricose provenientes desta endemia foram incluídas no estudo relacionado. Esta amostragem não é representativa da endemia de esporotricose do Estado do Rio de Janeiro, uma vez que até o presente, 2094 isolados estão sendo mantidos em nosso laboratório. Com isso, o nosso grupo percebeu a importância da confirmação taxonômica destes isolados relacionadas à endemia de esporotricose que vem ocorrendo no Estado do Rio de Janeiro, e sua(s) circulações em nosso meio, fazendo um estudo contínuo inicialmente, de caracterização em nível de fenótipo utilizando características macroscópicas e microscópicas dos cultivos, e através caracterização fisiológica e bioquímica, os quais segundo Marimon e colaboradores (2007, 2008) permitem a caracterização de espécies do gênero *Sporothrix*.

No conjunto de 248 isolados analisados, o que corresponde a 11,84% dos isolados mantidos em nosso laboratório, predominou a espécie *S. brasiliensis* (83,1%), o que corrobora os dados prévios que cepas de *S. brasiliensis* estão associadas à endemia (Marimon et al 2007). Entretanto, *S. schenckii* e *S. mexicana* também foram isoladas de pacientes envolvidos nesta endemia, sugerindo que, embora *S. brasiliensis* seja a espécie responsável pela ocorrência da epidemia, outras populações de *Sporothrix* também estão contribuindo para a persistência desta endemia no Estado do Rio de Janeiro.

A forma saprofítica de *S. schenckii* é normalmente caracterizada pelos tipos de conídios demáceos, sésseis e simpodial (Mariat et al, 1962; deHoog & deVries, 1973), com formas variadas. Cabe salientar, que na descrição das novas espécies por Marimon e colaboradores (2007) foram observados conídios intercalares ou terminais em conidióforos do tipo simpodial dispostos ao longo da hifa, hialinos ou levemente pigmentados, usualmente ovalados ou em forma de pêra. Além destes também foram observados conídios sésseis,

escuras, de parede espessa, ligados individualmente ao longo das hifas por minúsculos denticulos, e conídios demáceos com morfologia triangular, sendo os últimos somente observados em *S. schenckii*. Baseado nos conídios encontrados nos isolados incluídos em nossos estudos, três (25406, 28329, 28487) apresentaram conídios demáceos alongados e ovalados, típicos de *S. schenckii*. Entretanto, somente o isolado 28329 foi caracterizado e confirmado pelos outros caracteres estudados como *S. schenckii* corroborando dados apresentados anteriormente no qual a presença de conídios com essa morfologia estava associada à espécie *S. schenckii* (Marimon et al, 2007). Surpreendentemente, a presença desse tipo de conídio também foi observada nos isolados 25406 e 28487 caracterizados como *S. brasiliensis* pelas outras provas fenotípicas. O mesmo foi observado quando re-analisamos a cepa tipo 16490 caracterizada previamente como *S. brasiliensis* por apresentar diâmetro da colônia em meio PDA à 30°C de 35mm e à 37°C de 13mm, incapaz de assimilar sacarose e rafinose. Estes dados fenotípicos são característicos de *S. brasiliensis*. Entretanto, microscopicamente, foi verificado que esta cepa produziu conídios demáceos triangulares, estruturas anteriormente não descritas nesta cepa, e associadas somente a isolados de *S. schenckii*. Dados semelhantes foram também descritos por Marimon e colaboradores (2007) em suas análises onde a cepa tipo *S. schenckii* (CBS 359.36), tradicionalmente produtora de conídios pigmentados, formou somente conídios do tipo simpodial e hialinos. Estes dados sugerem que a classificação de espécies utilizando apenas a morfologia de conídios como parâmetro classificatório deve ser empregada com restrições, e a associação com as demais provas fenotípicas é obrigatória, uma vez que os isolados podem perder sua capacidade de produzir algumas estruturas morfológicas ou modificá-las devido a algum fator externo ou mesmo após cultivos sucessivos. Este fato foi recentemente demonstrado na Itália, onde um isolado fúngico de um paciente imunocompetente, com esporotricose linfocutânea, foi caracterizado como *S. schenckii* por apresentar morfologia convencional na forma filamentosa e converter à forma leveduriforme quando cultivado em meio BHI a 37°C (Criseo et al, 2008a). Este isolado foi subcultivado várias vezes para ser utilizado como cepa padrão em estudos ambientais. Após estes subcultivos, a fase filamentosa deste isolado sofreu alterações morfológicas e permaneceu na forma leveduriforme mesmo quando cultivada na temperatura ambiente (Criseo et al, 2008b).

Segundo Marimon e colaboradores (2007) a morfologia dos conídios seria um parâmetro a ser considerado na caracterização de espécies de *S. schenckii*, uma vez que os isolados incluídos em seus estudos apresentaram conídios triangulares e poderiam ser considerados particulares dessa espécie. Nossos dados contradizem esta proposição uma vez que análises estatísticas pelo método de Mc Nemar's não demonstrou correlação entre as cepas caracterizadas como *S. schenckii* e a morfologia dos conídios.

Poucos estudos têm sido direcionados à fisiologia do complexo *S. schenckii* e têm apresentado resultados discrepantes, uma vez que as metodologias utilizadas não são as mesmas (Ghosh et al, 2002; Mendonza et al, 2005; Marimon et al, 2007). Nossos resultados são totalmente concordantes com os observados por Marimon e colaboradores (2007) que afirmam que somente a assimilação de sacarose, rafinose e ribitol são úteis na discriminação complexo *S. schenckii* uma vez que todos os nossos isolados, inclusive os controles, apresentaram crescimento frente à glicose, 15 isolados (6%) assimilaram, além da glicose, sacarose e rafinose, e 23 (9,3%) assimilaram somente sacarose (Fig.5). Nenhum isolado assimilou somente rafinose e nenhum foi capaz de crescer no controle sem carboidrato. Todos os isolados incluídos neste estudo apresentaram crescimento ótimo a 30°C, e foram termotolerantes a 37°C, com conversão, pelo menos parcialmente nesta temperatura, em leveduras com brotamentos em forma de charuto.

Em 23 isolados não foi possível realizar a identificação das espécies, uma vez que apresentaram perfil bioquímico de assimilação de carboidratos para as espécies *S. globosa* ou *S. albicans*. Entretanto, o diâmetro médio de $26,8 \pm 7,5$ da colônia à 30°C excluiria *S. albicans* uma vez que é proposto que esta espécie apresente uma média de crescimento colonial de aproximadamente $67,5 \pm 2,1$ (Marimon et al, 2007), além de que foi verificada produção de conídios demáceos nestes isolados. Também não poderiam ser identificadas como *S. globosa* por serem termotolerantes.

Os isolados 17692, 18782B e 28790, onde a caracterização de espécie foi inconclusiva por somente apresentarem conídios hialinos, estruturas características da espécie *S. albicans* ou de *Sporothrix luriei* (Marimon et al 2007, 2008), não apresentaram perfil fenotípico condizente com o apresentado por estas espécies no auxonograma, e sim com perfil de *S. brasiliensis*. Possivelmente, estes isolados sofreram alguma alteração, reversível ou não, em nível de fenótipo. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o isolado 18782B não produzia

conídios demáceos, mesmo sendo verificada a produção de melanina quando cultivado à 37°C. Já a produção de melanina à 30°C ocorreu em pequena intensidade, sendo insuficiente para a visualização de coloração escura na colônia e nas estruturas das células fúngicas (Almeida-Paes et al, 2009). Com isso, sugere-se que estes isolados perderam sua capacidade de produzir quantidades visíveis de melanina durante seu crescimento. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de estarmos frente a uma variedade dentro da espécie *S. brasiliensis*. Estudos estão em andamento em nosso laboratório para esclarecer estas hipóteses. Outros três isolados, classificados como *S. brasiliensis* (16919, 27022 e 27087) não apresentaram colônias pigmentadas macroscopicamente, mas foram observados microscopicamente conídios demáceos ovalados. Estes resultados novamente sugerem variabilidade fenotípica dentro desta espécie, e que a verificação da produção de melanina pelos conídios para diferenciação das espécies deve ser feita microscopicamente, e não somente pelo aspecto macroscópico da colônia.

Estes resultados nos sugeriram inicialmente que a variação no perfil de assimilação de açúcares poderia estar associada à forma de armazenamento destes isolados. Entretanto, descartamos esta hipótese uma vez, que dentro desse grupo dois isolados foram obtidos de uma mesma paciente em tempos diferentes (o segundo isolado foi obtido após três anos de isolamento da primeira amostra), e ambos apresentaram o mesmo perfil de assimilação, sendo que o isolado obtido no ano de 2008 foi estudado logo após seu isolamento e sua identificação micológica sem passar por processo de conservação. Mendonza e colaboradores (2005) demonstraram alterações na atividade enzimática e capacidade de hidrolisar amido em isolados de *S. schenckii* mantidos por 18 anos em dois métodos de conservação, mas não avaliaram a assimilação dos mesmos carboidratos utilizados em nosso estudo. Além disso, o primeiro de nossos isolados ficou armazenado somente por três anos. Com isso, nossos resultados não podem ser comparados a este estudo prévio. Com embasamento destes dados, podemos sugerir que a assimilação de carboidratos e a avaliação da termotolerância são excelentes metodologias na classificação de espécies do complexo *S. schenckii* e deveriam ser utilizadas nos laboratórios de diagnóstico micológico.

Alguns isolados do nosso estudo merecem atenção especial. O isolado 27722, caracterizado como *S. mexicana*, e tendo sido incluído em nossa casuística como sendo uma cepa oriunda da epidemia, foi isolada de um paciente morador de Barra do Piraí, região sul do

Estado do Rio de Janeiro, localizada aproximadamente a 127 km da capital do Estado, região onde a esporotricose é menos diagnosticada ou documentada. Inicialmente, este paciente teve seu diagnóstico de histoplasmose mucocutânea em dezembro de 2001, tendo sido tratado e curado desta infecção (Valle et al, 2006). Após quatro anos (2005) apresentou lesões ulceradas em antebraço que surgiram em outubro de 2004, e que foram curadas espontaneamente. Não houve relato de atividades de jardinagem, contato com gatos ou outros animais doentes na época do isolamento da cepa do gênero *Sporothrix*. Entretanto, a mesma foi incluída em nosso estudo uma vez que apresentava características fenotípicas diferenciadas de *S. schenckii*. Têm-se descrito que *S. mexicana* apresenta crescimento colonial à 30°C maior que 50 mm, estando o mesmo em seu estudo variando entre 66 a 69 mm e à 37°C 1,8 a 2,2mm (Marimon et al, 2007). Nosso isolado 27722 apresentou diâmetro superior a 50 mm (51 mm) à 30°C e 3 mm à 37°C, coincidentes com os propostos para a classificação desta espécie. Além disso, as características fisiológicas também inferiram a favor da caracterização deste isolado como *S. mexicana*. Entretanto, novas análises em nível de genótipo deverão ser realizadas para confirmação taxonômica, uma vez que se têm relatado que esta espécie somente foi isolada de fontes ambientais - solo com roseira e solo com cravos - sendo consideradas não patogênicas ao homem (Marimon et al, 2007). Em nosso estudo, nosso isolado foi proveniente de lesão de antebraço de um paciente sugerindo que *S. mexicana* seria uma espécie patogênica. Entretanto, o mesmo apresentava comprometimento de seu sistema imune devido ao alcoolismo, já tinha previamente forma incomum de histoplasmose, e a esporotricose regrediu espontaneamente, corroborando dados anteriores que esta espécie atue mais como oportunista, apresentando baixa patogenicidade, mesmo tendo ocorrido à doença.

A análise molecular de 8 (31%) isolados que apresentaram resultados inconclusivos nos estudos fenotípicos possibilitou a formação de um grande grupo constituído por 7 isolados todos caracterizados genotipicamente como pertencentes à espécie *S. brasiliensis* demonstrando, novamente, a importância da análise, a nível de genótipo, na identificação de espécie. Entretanto, um de nossos isolados (27177-2) não foi agrupado neste clado, e também não apresentou similaridade com as outras espécies incluídas na análise sugerindo, novamente a possibilidade de estarmos frente a uma variedade dentro da espécie *S. brasiliensis* ou mesmo de uma nova espécie. Embora Marimon e colaboradores afirmem que o gene CAL é um bom marcador genético a ser utilizado na identificação de espécies do complexo *Sporothrix*, não

podemos descartar resultados apresentados anteriormente na utilização deste marcador na análise filogenética de outras espécies fúngicas, onde foi sugerido que estas análises poderiam estar comprometidas, especialmente quando aparente “autamorphies” (características especializadas que estão presentes em somente um único *táxon*) são incluídos nas análises (O’Donnell et al, 2000). Portanto, outros marcadores genéticos também deveriam ser avaliados em estudos taxonômicos do complexo *Sporothrix*.

Embora nossos resultados sejam preliminares, uma vez que somente 10% de nossa coleção de isolados de *Sporothrix* associados a endemia de esporotricose do estado do Rio de Janeiro, discordamos que a diferenciação de espécies dentro do complexo *Sporothrix* possa ser facilmente realizada sem o envolvimento de métodos moleculares, como da proposto por Marimon e colaboradores (2007). Acreditamos sim, que a correlação entre dados moleculares e características fenotípicas é fundamental na identificação destas espécies.

10. CONCLUSÕES

1. Foram caracterizados fenotipicamente 248 *Sporothrix* spp isolados provenientes da endemia de esporotricose do Estado do Rio de Janeiro.
2. A espécie *S. brasiliensis* (83,1%) foi a mais predominante entre os isolados estudados.
3. *S. schenckii* e *S. mexicana* também foram identificadas e estão contribuindo para a persistência desta endemia no Estado do Rio de Janeiro.
4. A classificação de espécies no complexo *Sporothrix* utilizando apenas a morfologia de conídios como parâmetro classificatório deve ser empregada com restrições, e a associação com as demais provas fenotípicas é obrigatória.
5. Não houve correlação estatística entre as cepas caracterizadas como *S. schenckii* e a morfologia dos conídios nos isolados estudados.
6. Conídios triangulares não deveriam ser considerados como um parâmetro obrigatório na caracterização de espécies de *S. schenckii*, na que a assimilação de carboidratos e a avaliação da termotolerância foram excelentes metodologias para classificação de espécies do complexo *S. schenckii*.
7. A análise em nível de genótipo deve ser usada como ferramenta complementar na identificação de espécies do complexo *Sporothrix*.
8. A correlação entre dados moleculares e características fenotípicas é fundamental na identificação de espécies complexo *Sporothrix*, possibilitando a implementação da taxonomia polifásica.

11. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Caracterização molecular dos 18 isolados que não foram identificados através dos métodos fenotípicos;
2. Análise fenotípica de outros isolados do complexo *S.schenckii* associados à epidemia;
3. Caracterização molecular dos isolados que não forem identificados através dos métodos fenotípicos;
4. Inclusão de novas metodologias utilizadas na caracterização de espécies, entre elas análises proteômicas.

11. REFERÊNCIAS

Albornoz MB, Villanueva E, Torres ED. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. *Mycopathologia* 1984; 85: 177-183.

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV, Monteiro PC, Peralta JM, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. *Clin Vaccine Immunol* 2007a; 14(3):244-249.

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Monteiro PC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. *Clin Vaccine Immunol* 2007b; 14(9):1149-1157.

Almeida-Paes R, Frases S, Monteiro PC, Gutierrez Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influencemelanization of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Microb Infect* 2009; In press.

Azulay RD, Azulay DR. Esporotricose. In: Azulay RD, Azulay DR. *Dermatologia*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. p.213-214.

Barros MBL, Schubach TMP, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, Lazéra MS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Marzochi KBF, Wanke B, Valle ACF. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 777-779.

Barros MBL, Schubach AO, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Reis RS, Conceição MJ, Valle ACF. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol* 2003, 42: 677- 681.

Barros MBL, Schubach AO, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach TMP, Reis RS, Wanke B, Marzochi KBF, Conceição MJ. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. *Cin Infect Dis* 2004, 38: 529-535.

Berbee ML, Taylor JW. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Exp Mycol* 1992; 16: 87-91.

Bernardes-Engemann AR, Costa RC, Miguens BR, Penha CV, Neves E, Pereira BA, Dias CM, Mattos M, Gutierrez MC, Schubach A, Oliveira Neto MP, Lazéra M, Lopes-Bezerra LM. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. *Med Mycol* 2005; 43(6):487-493.

Blumer SO, Kaufman L, Kaplan W, McLaughlin DW, Kraft DE. Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis. *Appl Microbiol* 1973; 26: 4-8.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Angkuster J, Alviano CS, Silva CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia* 1992; 117: 139-144.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Praceres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Scand J Immunol* 2003; 57: 214-220.

Carrada-Bravo T. New observations on the epidemiology and pathogenesis of sporotrichosis. *Ann Trop Med Parasitol* 1975; 69:267-273.

Carvalho MT, de Castro AP, Baby C, Werner B, Filus Neto J, Queiroz-Telles F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(6): 655-659.

Casserone S, Conti-Diaz IA, Zanetta E, Pereira MEP. Serologia de la esporotricosis cutânea. *Sabouraudia* 1983; 21: 317-321.

Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. *A Colour Atlas and Textbook of Histopathology of Mycotic Diseases*. Wolfe Medical Publications Ltd 1980; pp. 112-115.

Chua SS, Momany M, Mendoza L, Szaniszlo PJ. Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen *Sporothrix schenckii*. *Curr Microbiol* 1994; 29: 151-156.

Coles FB, Schuchat A, Hibbs JR, Kondracki SF, Salkin IF, Dixon DM, Chang HG, Duncan RA, Hurd NJ, Morse DL. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 475-487.

Conti-Diaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia* 1989; 108: 113-116.

Cooper CR, Dixon DM, Salkin IF. Laboratory-acquired sporotrichosis. *J Med Vet Mycol* 1992a; 30: 169-171.

Cooper CR, Breslin BJ, Dixon DM, Salkin IF. DNA typing of isolates associated with the 1998 sporotrichosis epidemic. *J Clin Microbiol* 1992b; 30: 1631-1635.

Criseo G, Malara G, Romeo O, Puglisi Guerra A. Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. *Mycopathologia* 2008a; 166(3): 159- 162.

Criseo G, Zungri D, Romeo O. Stable yeast-like form of *Sporothrix schenckii*: lack of dimorphic stage. J Clin Microbiol 2008b; 46(11): 3870- 3871.

Davis JL. Species concepts and phylogenetic analysis. Introduction. Syst Bot 1995; 20: 555-559.

deHoog GS, de Vries GA. Two new species of *Sporothrix* and their relation to *Blastobotrys nivea*. Antonie Van Leeuwenhoek 1973; 39(3): 515-520.

Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, Coles FB. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 1106-1113.

Dixon DM, Duncan RA, Hurd NJ. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp.* from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J Clin Microbiol 1992; 30: 951-954.

Dooley DP, Bostic PS, Beckius ML. Spook house sporotrichosis. A point-source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in Halloween haunted-house. Arch Intern Med 1997; 157: 1885-1887.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 1985; 39: 783-791.

Figueiredo MB. Métodos de preservação de fungos patogênicos. Biológico 2001; 63: 73-82.

Freitas D, Moreno G, Saliba A, Bottino J, Mós E. Esporotricose em cães e gatos. Rev Fac Med Vet S Paulo 1965; 7: 381-387.

Frisvad JC. Secondary metabolites and species models in *Penicillium* and *Aspergillus*. Department of Biotechnology (now BioCentrum-DTU). Technical University of Denmark 1998. apud Smedsgaard J, Nielsen J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J Exp Bot* 2004; 56(410): 273- 286.

Frisvad JC, Samson RA. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1. *Syst Appl Microbiol* 2004; 27(6): 672-680.

Gosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 2002; 45:449- 454.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(3):454-500.

Gutierrez-Galhardo MC, de Oliveira Schubach A, de Lima Barros MB, Moita Blanco TC, Cuzzi-Maya T, Pacheco Schubach TM, dos Santos Lazéra M, do Valle AC. Erythema nodosum associated with sporotrichosis. *Int J Dermatol* 2002; 41(2): 114-116.

Gutierrez-Galhardo MC, Barros MB, Schubach AO, Cuzzi T, Schubach TM, Lazéra MS, Valle AC. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19(4):507-509.

Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Valle AC, Almeida-Paes R, Silva-Tavares PM, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2008. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol* 2008; 46:141-151.

Hajjeh R, McDonnell S, Reef S, Licitra C, Hankins M, Toth B, Padhye A, Kaufman L, Passarell L, Cooper CR, Hutwagner L, Hopkins R, McNeil M. Outbreak of sporotrichosis among three nursery workers. *J Infect Dis* 1997; 176: 499-504.

Halloran ME. Concepts of transmission and dynamics In: Tomas JC, Weber DJ. *Epidemiologic methods for the study of infectious diseases*. 1ed. Oxford, NY: Oxford University Press; 2001. p.71-72.

Hay RJ, Morris-Jones R. Outbreaks of sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21(2): 129-133.

Hekton L, Perkins CF. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. *J Exp Med* 1900; 5: 77-91.

Hintz WE. Sequence analysis of the chitin synthase A gene of the Dutch elm pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* indicates a close association with the human pathogen *Sporothrix schenckii*. *Gene* 1999; 237: 215- 221.

Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 469-488.

Itoh M, Okamoto S, Kariya H. Survey of 200 cases of sporotrichosis. *Dermatologica* 1986; 172: 209-213.

Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 708-717.

Jin X, Zhang H, Hiruma M, Yamamoto I. Mother-and-child cases of sporotrichosis infection. *Mycoses* 1990; 33: 33-36.

Karlin JV, Nielsen HS. Serologic aspects of sporotrichosis. *J Infec Dis* 1970; 121: 316-327.

Kohn LM. Developing new characteres for fungal systematics an experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* 1992; 84: 139-153.

Korf RP. Reinventing taxonomy: a curmudgeon's view of 250 years of fungal taxonomy, the crisis in biodiversity, and the pitfalls of the phylogenetic age. *Mycotaxon* 2005; 93: 407-415.

Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol* 2008; 46:53-56.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Sporotrichosis In: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1992; p 707-729.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?. *FEMS Yeast Res* 2006; 6(4): 574-587.

Lynch PJ, Voorhes JJ, Harrell RE. Systemic sporotrichosis. *Ann Intern Med* 1970; 73: 23-30.

Lopes-Alves L, Travassos LR, Previato JO, Mendonça-Previato L. Novel antigenic determinants from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. *Glycobiology* 1994; 4: 281-288.

Lopes J, Alves S, Mari C, Brum L, Westphalen J, Altermann M, Prates F. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32: 541-545.

Lutz A, Splendore A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. *Rev Med S Paulo* 1907; 21: 433-450.

Maia DC, Sassa MF, Placeres MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. Mycopathologia. 2006; 161(1): 11-19.

Malliaris DS, Steenbergen JN, Casadevall AC. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. Med Mycol 2004; 42: 149-158.

Mariat F. Criteria for the determination of the principal species of aerobic pathogenic actinomycetes. Ann Soc Belg Med Trop 1962; 42: 651-674.

Marimon R, Gené J, Cano J, Sutton DA, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 2006; 44(9): 3251-3256.

Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol 2007; 45(10): 3198-3206.

Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *sporothrix*. Antimicrob Agents Chemother 2008a; 52(2):732-734.

Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: rare fungus from clinical origin. Med Mycol 2008b; 46(6):621-625.

Marques SA, Franco SRVS, Camargo RMP, Dias LDF, Naddad-Junior V, Fabris VE. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): Transmissão humana. Rev Inst Med Trop S Paulo 1993; 35: 327-30.

McGinnis MR. Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York: Academic Press; 1980. p. 133-136.

Mendoza M, Alvarado P, Dias de Torres E, Lucena L, de Albornoz MC. Physiological compartment and in vivo sensitivity of *Sporothrix schenckii* isolates maintained for 18 years by two preservation methods. Rev Iberoam Micol 2005; 22(3): 151- 156.

Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zúñiga G, Toriello C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. J Clin Microbiol 2002; 40: 3004-3011.

Morris-Jones R. Sporotrichosis. Clin Exp Dermatology 2002; 27: 427-431.

Morris-Jones R, Youngchim S, Gomes BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuck JD, Casadevall A, Hamilton AJ. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. Infect Immun 2003; 71: 4026-4033.

Nascimento RC, Almeida SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 43: 241-247.

O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. Mycoscience 2000; 41: 61-78.

O'Hara RJ. Population thinking and tree thinking in systematics. Zoologica Scripta 1997; 26(4): 323-329.

O'Reilly LC, Altman SA. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 2006; 44: 2547-2552.

Pappas PG, Tellez I, Deep A E, Nolasco D, Holgado W, Bustamanate B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. Clin Infect Dis 2000; 30: 65-70.

Pupo JA. Frequência da Sporotrichose em São Paulo. Annaes Paulista de Medicina e Cirurgia 1917; 8(3): 53-68.

Quintal D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. *J Cutan Med Surg* 2000; 4: 51-54.

Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol* 2007; 25(2):181-187.

Reed KD, Moore FM, Geiger GE. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 384-387.

Reis RS. Análise genotípica de amostras de *Sporothrix schenckii* isoladas em epidemias de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] Fundação Oswaldo Cruz; 2004.

Rippon JW. Sporotrichosis. In: *Medical Mycology*. Philadelphia: WB Saunders Company 1998; p. 325- 352.

Rodrigues MT, Resende MA. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin among gold mine workes of Morro Velho Mining, Brazil. *Mycopathologia* 1996; 135: 89-98.

Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* 2000; 68: 3696-3703.

Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52(3): 451-459.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec Biol and Evol* 1987; 4:406-425.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor University Press; 1989.

Sampaio SAP, Lacaz CS. Klinische und statische Untersuchungen uber Sporotrichose in São Paulo. Hautarzt 1959; 10:490- 493 apud Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T.. Sporotrichosis. Clin Dermatol 2007; 25(2): 181-187.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74, 5463-5467.

Schenck BR. Refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. Bull Johns Hopkins Hosp 1898; 9:286-290.

Schubach A, de Lima Barros MB, Schubach TM, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Sued M, de Matos Salgueiro M, Fialho-Monteiro PC, Reis RS, Marzochi KB, Wanke B, Conceição-Silva F. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. Cornea 2005a; 24(4):491-493.

Schubach AO, Schubach TMP, Barros MBL, Wanke B. Esporotricose In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005b. p. 1161- 1162.

Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. Curr Opin Infect Dis 2008; 21(2):129-133.

Schubach TMP, Schubach AO, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Monteiro DF, Barros MBL, Brustein R, Zancopé-Oliveira RM, Monteiro PCF, Wanke B. Sporothrix schenckii isolated from domestic cats with na without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. Mycophatologia 2002; 153: 83- 86.

Schubach TMP, Schubach AO, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Reis RS, Monteiro PCF, Gutierrez-Galhardo MC, Wanke B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats of Rio de Janeiro. *Vet Rec* 2003; 152: 172- 17.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FB, Cuzzi T, Monteiro PCF, Reis RS, Peres MA, Wanke B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 1623- 1629.

Sigler L, Harris JL, Dixon DM, Flis AL, Salkin IF, Kemna M, Duncan RA. Microbiology and potential virulence of *Sporothrix cyanescens*, a fungus rarely isolated from blood and skin. *J Clin Microbiol* 1990; 28(5): 1009-15.

Smedsgaard J, Nielsen J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J Exp Bot* 2004; 56(410): 273- 286.

Smith TM, Batenburg-van der Vegte WH. Ultrastructure . *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1985; 51(1): 121-128.

Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. Interacion of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 2004; 72:3478-3488.

St-Germain G, Summerbell R. Identifying filamentous fungi. In: *A clinical laboratory handbook*. California: Star Publishing Company 1996.

Susca A, Stea G, Mulé G, Perrone G. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Addit Contam* 2007; 24(10): 1154-1160.

Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol* 1999; 37: 397-404.

Talhari S, Cunha MGS, Schettini APM, Talhari AC. Deep Mycoses in Amazon Region. *Int J Dermatol* 1988; 27(7): 481- 484.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24(8): 1596- 1599.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 2000; 31(1): 21-32.

Valle AC, Moreira LC, Almeida-Paes R, Moreira JS, Pizzini CV, Muniz MdeM, Zancopé-Oliveira RM. Chronic disseminated histoplasmosis with lesions restricted to the mouth: case report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48(2): 113-116.