



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Pedro Antônio Castelo Teixeira

**Estudo da virulência, adesão e características fenotípicas de
isolados do complexo *Sporothrix***

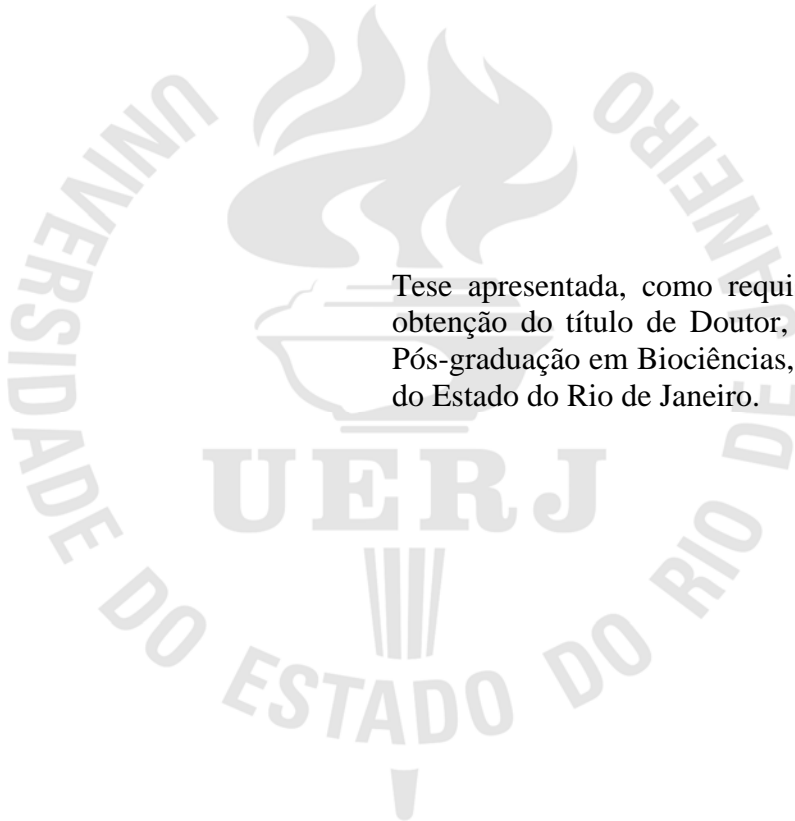
Rio de Janeiro

2011

Pedro Antônio Castelo Teixeira

Estudo da virulência, adesão e características fenotípicas de isolados do complexo

Sporothrix



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Leila Maria Lopes Bezerra

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T266 Teixeira, Pedro Antônio Castelo.
Estudo da virulência, adesão e características fenotípicas de isolados do complexo Sporothrix / Pedro Antônio Castelo Teixeira. - 2011.
150 f.

Orientador : Leila Maria Lopes Bezerra.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biociências.

1. Sporothrix - Teses. 2. Morfologia (Biologia) - Teses. 3. Virulência (Microbiologia) - Teses. 4. Células - Adesão - Teses. I. Bezerra, Leila Maria Lopes. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 582.28

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Pedro Antônio Castelo Teixeira

Estudo da virulência, adesão e características fenotípicas de isolados do complexo
Sporothrix

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2011.

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Leila Maria Lopes Bezerra
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Maria Cristina Maciel Plotkowski
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^ª. Dra. Tecia Maria Ulisses de Carvalho
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Prof^ª. Dra. Márcia dos Santos Lazéra
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz

Prof^ª. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese de Doutorado à minha esposa Carla e ao nosso filho Rafael pelo amor incondicional. Dedico também aos meus pais Pedro e Liduina e ao meu irmão João, por fazerem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Leila Maria Lopes Bezerra, pelo exemplo de dedicação a ciência, seriedade e profissionalismo. Pela atenção, apoio e tempo a mim dedicados durante o processo de elaboração desta tese.

Aos componentes da banca examinadora, Prof^ª. Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho, Prof^ª. Dra. Maria Cristina Maciel Plotkowski, Prof^ª. Dra. Tecia Maria Ulisses de Carvalho, Prof^ª. Dra. Márcia dos Santos Lazera, Prof^ª. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff e aos suplentes Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues e Prof. Dr. Márcio Neves Bóia, por terem aceitado participar deste trabalho com suas críticas e sugestões.

Ao Prof. Dr. Geraldo e às técnicas Simone e Mônica, pelo apoio técnico na operação do citômetro de fluxo.

À Prof^ª. Dra. Márcia dos Santos Lazera, por ter cedido os isolados IPEC 15383, IPEC 17943 e FMR 8337.

À Dra. Tânia Schubach, pela cessão do isolado felino 5110.

Ao Prof. Dr. Sandro Almeida, por ter cedido o isolado M64.

Ao Prof. Dr. Jean-Philippe Bouchara, da Université d'Angers, por abrir as portas do Laboratoire de Parasitologie-Mycologie em Angers, na França, para que eu pudesse realizar os ensaios de microscopia confocal e pela grande ajuda na elaboração do artigo resultante desta colaboração.

Ao Prof. Dr. Guy Tronchin, da Université d'Angers, pelo apoio dado durante os ensaios de imunocitoquímica e na captura das imagens feitas no microscópio confocal do Groupe d'Étude des Interactions Hôte-Pathogène.

À Prof^ª. Dra. Sonia Rosental, à Dr^ª. Kelly Ishida e ao Dr. Marcel Cunha, pela colaboração nos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão e elaboração de um artigo resultante desta colaboração.

À Dra. Rosana Nascimento, pelo companheirismo e grande apoio intelectual e técnico para elaboração desta tese, além de colaboração em trabalhos anteriores.

Ao Prof. Dr. Wanderley de Souza, por abrir as portas do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer e pela colaboração para realização dos ensaios de microscopia eletrônica.

À Prof^a. Dra. Márcia Attias, aos alunos Lúcio, Tatiana, Eduardo, às técnicas Noêmia e Rachel, pelo apoio direto na elaboração dos ensaios de imunocitoquímica, processamento das amostras e captura das imagens nos microscópios eletrônicos.

À aluna de doutorado Rafaela Castro, pela amizade, companheirismo e ajuda intelectual e técnica, que foi de grande valia para o desenvolvimento desta tese.

Às alunas do Laboratório de Micologia Celular e Proteômica e amigas Paula, Nathália, Gabriela, Emylli e técnica Jéssica pela ajuda técnica, mas principalmente pela amizade e momentos de descontração tão importantes para o desenvolvimento de um bom trabalho.

Aos técnicos Jorge Cardoso e Cecília Santos, pela amizade e companheirismo nos bons e maus momentos.

Aos amigos de faculdade, Pedro, Charles, João, Fábio, Leo, Marcelo, Zamith, pela descontração no bar depois de um dia exaustivo de trabalho.

Aos meus pais, que me deram amor, educação, muito apoio e incentivo.

Ao meu irmão, João, sempre amigo e companheiro.

À minha mulher, Carla, que tanto amo, pela amizade, companheirismo, amor e por estar ao meu lado sempre, dos momentos mais alegres aos mais difíceis. E por ter me dado a maior alegria da minha vida, nosso filho Rafael.

RESUMO

TEIXEIRA, Pedro Antônio Castelo. *Estudo da virulência, adesão e características fenotípicas de isolados do complexo Sporothrix*. 2011. 150 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A esporotricose é uma doença micótica, infecciosa e crônica, que envolve o tecido cutâneo e subcutâneo, e que pode afetar seres humanos e animais. Esta micose sempre foi atribuída a um único patógeno, o *Sporothrix schenckii*, um fungo termodimórfico, que cresce como levedura a 37 °C e como micélio à temperatura ambiente. No entanto, nos últimos anos, foi demonstrado que isolados identificados como *S. schenckii* apresentavam grande variabilidade genética, sugerindo que este táxon consiste em um complexo de espécies. Esta doença é causada pela implantação traumática do patógeno fúngico, porém, os mecanismos de invasão e disseminação deste microorganismo, bem como as moléculas envolvidas nestes processos, ainda são pouco conhecidos. Com base nessas informações, este trabalho visa identificar moléculas de superfície deste patógeno envolvidas na interação deste fungo com proteínas matriciais, bem como analisar diferenças fenotípicas entre espécies do denominado complexo *Sporothrix*. Foram utilizados, neste estudo, cinco isolados de *Sporothrix spp.*, sendo três isolados clínicos, um isolado ambiental e um isolado de gato. A virulência de cada isolado foi comparada à capacidade adesiva à proteína matricial fibronectina. Foi observado que os isolados com maior capacidade infectiva eram os que apresentavam maior capacidade adesiva à fibronectina. Verificamos então a expressão de adesinas para fibronectina na superfície de cada isolado, por *Western blot*, e observamos que os isolados mais virulentos e com maior capacidade adesiva expressavam mais adesinas para fibronectina. Bandas reativas com o anticorpo monoclonal contra adesina gp70 (mAb P6E7) foram reveladas nos extratos de parede celular dos isolados estudados. Análises por microscopia confocal revelaram a co-localização da gp70 com a adesina para fibronectina na superfície dos isolados. Análises filogenéticas demonstraram que os isolados estudados possuíam diferenças genotípicas capazes de agrupá-los em duas espécies, *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. Esta análise revelou que o isolado avirulento era *S. brasiliensis* e não *S. schenckii*, como se pensava. Este dado novo nos levou a verificar se a virulência e as características fenotípicas estariam relacionadas ao genótipo. A avaliação da virulência mostrou que outro isolado de *S. brasiliensis* era tão virulento quanto os isolados de *S. schenckii*. Além disso, as características morfológicas, como tamanho, forma e perfil de crescimento, das fases miceliana e leveduriforme, e características microscópicas da parede das leveduras também foram avaliadas. Porém, não foi possível correlacionar, de forma clara, a morfologia celular com a especiação do gênero *Sporothrix*. A expressão da gp70 na superfície das duas espécies foi verificada e foi observado que o isolado virulento de *S. brasiliensis* quase não expressa a gp70 na sua superfície em contraste com o isolado avirulento de *S. brasiliensis*, que além de expressar esta glicoproteína em grande quantidade ainda a libera para o meio extracelular. Este estudo mostra que há uma correlação direta entre virulência e expressão de adesinas, porém, sem qualquer relação entre características fenotípicas e genótipo.

Palavras-chave: Complexo *Sporothrix*. Adesinas. Morfologia.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a chronic and infectious disease that involves the cutaneous and subcutaneous tissue, which can affect humans and animals. This mycosis has always been attributed to a single pathogen, the *Sporothrix schenckii*, a dimorphic fungus, that grows as yeast at 37 ° C and as mycelia at room temperature. However, in recent years, some isolates identified as *S. schenckii* showed considerable genetic variability, suggesting that this taxon consists of a complex of species. This disease is caused by the traumatic inoculation of the fungal pathogen, however, the molecules involved in the invasion and dissemination of this microorganism are still poorly understood. The aim of this study is to identify surface molecules involved in the interaction of this fungus with extracellular matrix proteins and to examine phenotypic differences between species in the *Sporothrix* complex. Five isolates were used throughout this study, three clinical isolates, an environmental and one cat isolate. The virulence of each isolate was compared to the adhesive capacity to fibronectin. We observed that the most virulent isolates exhibited the higher capacity to interact with fibronectin. The expression of adhesins for fibronectin on the surface of each isolate was verified by Western blot. This analysis showed that the most virulent isolates expressed more fibronectin adhesins than the avirulent ones. Positive bands for the monoclonal antibody raised against gp70 adhesin (mAb P6E7) were revealed in cell wall extracts of the isolates studied. Confocal microscopy confirmed the colocalization of fibronectin and mAb P6E7 on the yeast cell surface. Molecular analysis showed genotypic differences between isolates used in this study, that can cluster them into two species, *S. schenckii* and *S. brasiliensis*. This phylogenetic analysis revealed that the avirulent isolate was *S. brasiliensis* and not *S. schenckii* as previously thought. This new data led us to determine whether the virulence and phenotypic characteristics were related to genotype. The virulence analysis showed that another *S. brasiliensis* isolate was as virulent as the *S. schenckii* isolates. Moreover, morphological characteristics, such as, size, shape and growth profile of mycelial and yeast were also evaluated. However, no connection was observed between cell morphology with the speciation of the genus *Sporothrix*. The cell wall expression of gp70 was evaluated in the two species. We observed that the virulent isolate of *S. brasiliensis* almost do not express gp70 in contrast with the avirulent isolate of the same specie. This study shows that there is a direct correlation between virulence and adhesins expression, however, no relationship between genotype and phenotypic characteristics was observed.

Keywords: *Sporothrix* complex. Adhesins. Morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas clínicas da esporotricose. Cutâneas: linfocutânea (L), cutâneas fixa (F) e disseminada (D); Mucosa: ocular (M); Extracutânea: osteoarticular (E). Adaptado de: Mycology Online - The University of Adelaide (www.mycology.adelaide.edu.au/); Montes *et al.*, 2009 (www.dermato-santacasa.com.br); Carvalho *et al.* 2002; Jones *et al.*, 1999 e Lopes-Bezerra *et al.*, 2006.....29

Figura 2. Modelo estrutural da fibronectina (adaptado de White *et al.*, 2008). A fibronectina consiste na repetição dos módulos do tipo I (rosas), tipo II (cinzas) e tipo III (azuis). Esta série de repetições constituem os domínios de ligação a fibrina, fibronectina, colágeno, células e heparina, como indicado. SS indica o par de pontes de disulfeto na extremidade C-terminal que une as duas subunidades da fibronectina formando um homodímero.....39

Figura 3. Composição e estrutura de polissacarídeos da parede celular dos fungos. Em A, microscopia eletrônica de transmissão do material insolúvel recuperado após tratamento da parede celular do zigomiceto *Conidiobolus obscurus* com NaOH a 1N, frio; B, microscopia eletrônica de transmissão do material insolúvel da parede celular de *C. obscurus* recuperado após tratamento à quente com NaOH 1N e ácido acético 0,5 N. Em C, modelo ilustrativo da composição polissacarídica da parede celular do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os componentes das frações insolúveis e solúveis em meio alcalino estão apresentados como: α -1,3 (⊗) e α -1,4 (⊛) glucanas; β -1,3 (○), β -1,4 (●) e β -1,6 (●) glucanas; quitina (□); α -1,2 (▲), α -1,3 (▲) e α -1,6 (Δ) mananas e β -1,5 galactofurana (▽). O núcleo comum a maioria dos fungos está marcado em cinza. Figura adaptada de Latgé *et al.*, 2007.....42

Figura 4. Diagrama esquemático da estrutura da parede celular de *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Os polissacarídeos da parede celular estão representados em diferentes cores: quitina (vermelho), β -1,3-glucanas (verde), β -1,6-glucanas (azul) e mananas (preto). As proteínas estão representadas por retângulos de cor laranja. As subunidades da β -1,3-glucana sintase estão na membrana plasmática em verde. Figura adaptada de Pontón, 2008.....43

Figura 5. Árvore filogenética dos isolados do complexo *Sporothrix* para os loci ITS 1/2 e CAL. As setas vermelhas indicam os isolados utilizados neste estudo. Figura adaptada de Castro, 2010.....53

Figura 6. Perfil de virulência da fase leveduriforme de quatro isolados do *S. schenckii*. (A) Curvas de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 inoculados por via endovenosa com 5×10^6 células de levedura do *S. schenckii*. (B) Carga fúngica no baço, pulmões, fígado e rins de camundongos sacrificados 10 dias após infecção. * $p < 0,05$ comparado a cada isolado. Estes resultados representam a média de três experimentos independentes.....62

Figura 7. Aspecto macroscópico dos órgãos de camundongos C57BL/6 infectados com células de levedura dos isolados IPEC 17943 (A, B), FMR 8337 (C, F), 1099-18 (D) e IPEC 15383 (E), e sacrificados 10 dias após a infecção. O aspecto do fígado está representado pelas setas brancas (A, C, D, E e F) e a esplenomegalia pela cabeça de seta branca (F). Os camundongos infectados com o isolado IPEC 17943 apresentaram lesões cutâneas disseminadas (cabeça de seta preta em B) associadas a esporotricose osteoarticular (seta preta em B).....63

Figura 8. Quantificação por citometria de fluxo da ligação da fibronectina às células de levedura dos diferentes isolados de *S. schenckii*. (A) Intensidade de fluorescência das células de levedura dos quatro isolados incubados com fibronectina conjugada a FITC. (B) Média da fluorescência da superfície celular das cepas IPEC 15383 (51,31), 1099-18 (49,06), FMR 8337 (50,07) e IPEC 17943 (27,18). * $p < 0,05$ comparado a cada isolado.....65

Figura 9. SDS-PAGE e *Western immunoblot* de extratos de parede celular do *S. schenckii* revelados para fibronectina. As colunas de 1 a 4 correspondem aos extratos de parede celular dos isolados IPEC 15383, 1099-18, FMR 8337 e IPEC 17943, respectivamente. (A) SDS-PAGE dos extratos de parede celular em gel de poliacrilamida 10%. (B). Padrão de bandas positivas para fibronectina (adesinas) presentes nos extratos de parede celular dos diferentes isolados de *S. schenckii*. Os controles negativos são apresentados nas colunas 5 e 6 onde foi suprimida a fibronectina e a anti-fibronectina, respectivamente.....67

Figura 10. <i>Western immunoblot</i> de extratos de parede celular do <i>S. schenckii</i> revelados para o mAb P6E7. As colunas de 1 a 4 correspondem aos extratos de parede celular dos isolados IPEC 15383, 1099-18, FMR 8337 e IPEC 17943, respectivamente. A coluna 5 representa o controle positivo realizado com a gp70 purificada ensaiada com o mAb P6E7, e as colunas 6 e 7 os controles negativos, sem o mAb P6E7 e o anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase, respectivamente.....	70
Figura 11. Microscopia confocal mostrando a ligação do mAb P6E7 as células de levedura do isolado M64 (A). Em B o respectivo campo é visualizado em contraste de interferência diferencial (DIC). Barra: 5 µm.....	71
Figura 12. Microscopia confocal revelando a ligação do mAb P6E7 (A, D) e da fibronectina (B, E) as células de levedura dos isolados IPEC 15383 (A a C) e IPEC 17943 (D a F). Em C e F os respectivos campos são visualizados em contraste de interferência diferencial (DIC). Barra: 8 µm.....	72
Figura 13. Microscopia confocal mostrando a ligação do mAb P6E7 (fluorescência verde) e da fibronectina (fluorescência vermelha) as células de levedura dos isolados IPEC 15383 (A) e IPEC 17943 (B). As imagens correspondem superposição da fluorescência e revelam a colocalização dos marcadores. Os campos em destaque foram produzidos por aumento digital. A seta indica alguns sítios de ligação apenas para fibronectina (fluorescência vermelha). Barra: 8 µm.....	73
Figura 14. Curvas de sobrevivência dos camundongos BALC/c inoculados por via endovenosa com 2×10^7 células de levedura do <i>S. schenckii</i> (IPEC 15383 e 1099-18) e do <i>S. brasiliensis</i> (IPEC 17943 e 5110).....	76
Figura 15. Análise morfológica de conídios das espécies <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i> . (I) representa a microscopia eletrônica de varredura da fase miceliana de <i>S. schenckii</i> (A - 1099-18; B - IPEC 15383) e <i>S. brasiliensis</i> (C - IPEC 17943; D - 5110). (II) representa a área dos conídios das cepas das duas espécies. *, ** $p < 0,05$, comparado a cada isolado.....	79

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura dos isolados 1099-18 (A) e IPEC 15383 (B) de *S. schenckii*, e IPEC 17943 (C) e 5110 (D) de *S. brasiliensis*. A seta indica a matriz interligando os conídios do isolado IPEC 17943 (C).....80

Figura 17. Análise morfológica de leveduras das espécies *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. (I) representa a microscopia eletrônica de varredura da fase leveduriforme de *S. schenckii* (A - 1099-18; B - IPEC 15383) e *S. brasiliensis* (C - IPEC 17943; D - 5110). (II) representa a área das leveduras das cepas das duas espécies. * $p < 0,05$, comparado a cada isolado.....81

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura dos isolados 1099-18 (A e E) e IPEC 15383 (B e F) de *S. schenckii*, e IPEC 17943 (C e G) e 5110 (D e H) de *S. brasiliensis*. As imagens de E a H mostram maiores detalhes da superfície celular das quatro cepas. A seta indica a descamação da parede celular da levedura da cepa IPEC 17943 (G). As barras de A a D correspondem a 1 μm85

Figura 19. Microscopia eletrônica de transmissão da levedura do *S. schenckii*. A seta indica a camada microfibrilar amorfa externa à parede celular e a cabeça de seta mostra os grânulos eletrondenso na parede celular (A e B). Maior detalhe da parede celular é mostrado em B.....86

Figura 20. Expressão do antígeno gp70 na parede celular das leveduras de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. Os extratos de parede celular dos isolados 1099-18 (A, E e I), IPEC 15383 (B, F e J), IPEC 17943 (C, G e L), 5110 (D, H e M) foram analisados por *Western blot* (A-D). As leveduras destes isolados, incubadas com mAb P6E7 e anti-IgG de camundongo conjugado a ouro coloidal, foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (E-M). As imagens obtidas por elétrons secundários são mostradas de E a H, e as imagens de elétrons retroespalhados de I a M. As setas indicam a marcação positiva, partículas de ouro. As barras de E a H correspondem a 1 μm88

Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a expressão do antígeno gp70 por leveduras de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. Os isolados 1099-18, IPEC 15383, IPEC 17943 e 5110 são representados em A, B, C e D, respectivamente. As setas pretas indicam a localização das partículas de ouro na parede celular, as brancas no meio intracelular e as

cabeças de seta no meio extracelular. O campo em destaque em A e B foi produzido por aumento digital.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxonomia do <i>S. schenckii</i>	19
Tabela 2. Formas clínicas da esporotricose (adaptado de Lopes-Bezerra <i>et al.</i> , 2006).....	27
Tabela 3. Dados de origem dos isolados utilizados neste estudo.....	52
Tabela 4. Morfologia da fase miceliana de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i>	82
Tabela 5. Morfologia das leveduras de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549 –	Células de carcinoma pulmonar humano
ALA1 –	adesina semelhante à aglutinina (<i>agglutinin-like adhesin</i>)
ALS –	sequencia semelhante à aglutinina (<i>agglutinin-like sequence</i>)
BHI –	infusão de cérebro e coração (<i>brain heart infusion</i>)
BSA –	albumina de soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CAL –	Calmodulina
Con A –	concanavalina A
CWP –	proteína de parede celular
DNA –	Ácido desoxirribonucléico
DTT –	Ditiotreitol
EAP1 –	proteína de adesão extracelular (<i>extracellular adherence protein</i>)
EDTA –	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC –	isocianato de fluoresceína
FnBP –	proteína ligadora de fibronectina (<i>fibronectin binding protein</i>)
GPI –	âncora de glicosilfosfatidilinositol
HIV –	Vírus da imunodeficiência humana
HUVEC –	célula endotelial da veia umbilical humana (<i>human umbilical vein endothelial cell</i>)
HWP1 –	proteína da parede da hifa (<i>hyphal wall protein</i>)
IgG –	imunoglobulina G
IPEC –	Instituto de Pesquisa Evandro Chagas
ITIS –	Sistema Integrado de Informação Taxonômica
ITS –	Internal transcribed spacer
mAb –	Anticorpo monoclonal

PAGE –	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMP –	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS –	salina tamponada com fosfato
Pir-CWP –	Proteína de parede celular com seqüência interna repetitiva
PMSF –	phenilmetanosulfonil fluorido
PRR –	Receptor de reconhecimento padrão
RGD –	tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico
rpm –	rotações por minuto
SDS –	dodecil sulfato de sódio
TRIS –	tri-hidroxi-amino-metano
TTBS –	Tampão Tris/salina-Tween-20
YIGSR –	peptídeo tirosina-isoleucina-glicina-arginina-serina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
	<i>Sporothrix schenckii</i>	18
	Aspectos históricos.....	18
	Taxonomia.....	18
	Agente etiológico.....	19
	Complexo <i>Sporothrix</i>	21
	Esporotricose.....	24
	Formas clínicas.....	26
	Epidemiologia.....	30
	Virulência.....	32
	Interação fungo-hospedeiro.....	35
	Matriz extracelular.....	36
	Fibronectina.....	37
	Parede celular e adesão.....	40
	Estrutura da parede celular.....	40
	Adesinas.....	45
1	OBJETIVOS	50
2	METODOLOGIA	51
2.1	Microorganismo	51
2.2	Condições de cultivo	52
2.3	Animais	54
2.4	Infecção experimental	54
2.5	Citometria de fluxo	55
2.6	Obtenção dos extratos de parede celular	55
2.7	SDS-PAGE e Western blot	56
2.8	Microscopia Confocal	57
2.9	Microscopia eletrônica de varredura	57
2.10	Microscopia eletrônica de transmissão	58
2.11	Análise estatística	59
3	RESULTADOS	60

3.1	Capítulo 1	60
3.1.1	<u>Diferenças na virulência entre isolados do <i>S. schenckii</i></u>	60
3.1.2	<u>Interação de células de levedura de diferentes cepas com a proteína da matriz extracelular, fibronectina</u>	64
3.1.3	<u>Identificação de adesinas para fibronectina na parede celular de diferentes isolados do <i>S. schenckii</i></u>	66
3.1.4	<u>Caracterização da adesina de 70 kDa na superfície do <i>S. schenckii</i></u>	68
3.2	Capítulo 2	74
3.2.1	<u>Virulência de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i></u>	74
3.2.2	<u>Análise morfológica de conídios e de leveduras de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i></u>	77
3.2.3	<u>Avaliação de diferenças microscópicas na superfície celular das células de levedura de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i></u>	83
3.2.2	<u>Expressão do antígeno de superfície gp70 na parede celular das células de levedura de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i></u>	87
4	DISCUSSÃO	90
5	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	104
	ANEXOS	123

INTRODUÇÃO

Sporothrix schenckii

Aspectos históricos

Sporothrix schenckii é um fungo dimórfico, agente etiológico da esporotricose humana e animal. Este patógeno foi descrito pela primeira vez em 1898 por Schenck, a partir de um espécime clínico de lesões cutâneas de um paciente do Hospital John Hopkins, Baltimore, Estados Unidos. Schenck isolou o microrganismo de lesões do dedo indicador e do antebraço de um paciente de 36 anos do sexo masculino que apresentava múltiplas lesões ascendentes e nódulos ulcerados. Depois de isolado o agente etiológico, o mesmo enviou a amostra para o micologista Erwin Smith, que concluiu se tratar de fungo do gênero *Sporotrichum*. Em 1900 a doença foi descrita pela segunda vez, quando Hektoen e Perkins isolaram este patógeno de lesão cutânea no dedo de uma criança que se ferira com um martelo, classificando-o como *Sporotrichum schenckii* (Hektoen & Perkins, 1900). Na Europa, o primeiro caso foi descrito em 1903 e mais de 200 casos foram reportados nos 10 anos seguintes (Mariat 1968). O primeiro caso de esporotricose no Brasil foi descrito em 1907 por Lutz e Splendore, que também descreveram o cultivo *in vitro* da fase parasitária, a fase leveduriforme (Lutz & Splendore, 1907). Em 1962 o gênero passou a ser denominado *Sporothrix* após Carmichael comparar isolados de *Sporotrichum* e *Sporothrix* e concluir que os dois isolados pertenciam ao mesmo gênero (*apud* Kwon-Chung & Bennet, 1992). O fungo passou então a ser descrito em todos os continentes, sendo a maioria dos relatos nas Américas, principalmente México, Colômbia, Uruguai e Brasil (D'Alessio *et al.*, 1965; Velasco-Catrejón & Gonzalez-Ochoa, 1976).

Taxonomia

Este fungo foi descrito como pertencente ao filo *Ascomycota* (sub-divisão Deuteromycotina), classe *Hyphomycetes* (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Entretanto, segundo Guarro, este fungo pertence a classe *Pyrenomycetes*, ordem *Ophiostomales*, e a família *Ophiostomataceae* (Guarro *et al.*, 1999). Além disso, segundo o *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS – número taxonômico serial: 181714) (Tabela 1) *S. schenckii* pertence a divisão *Ascomycota*, subdivisão *Pezizomycotina*, classe *Sordariomycetes*,

subclasse *Sordariomycetidae*, ordem *Sordariales*, família *Cephalothecaceae*, gênero *Sporothrix*, espécie *Sporothrix schenckii*. Apesar da forma sexuada do *S. schenckii* não ser conhecida, alguns estudos demonstraram que o fungo *Ceratocystes stenoceras* (*Ophiostoma stenoceras*) apresenta estágio conidial semelhante ao do *S. schenckii* (Mariat, 1971; Travassos, 1975), sugerindo que este possa representar o estágio teleomorfo de *S. schenckii* (Lacaz *et al.*, 2002). No entanto, outros grupos estão em desacordo com esta hipótese (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

Tabela 1. Taxonomia do *S. schenckii*.

Reino – *Fungi*

Divisão – *Ascomycota*

Subdivisão – *Pezizomycotina*

Classe – *Sordariomycetes*

Subclasse – *Sordariomycetidae*

Ordem – *Sordariales*

Família – *Cephalothecaceae*

Gênero – *Sporothrix*

Espécie – *Sporothrix schenckii*

(*Integrated Taxonomic Information System*, serial: 181714, <http://www.itis.gov>)¹

Agente etiológico

O *S. schenckii* apresenta hábitos saprófitos na natureza e é geralmente encontrado sobre o solo, vegetais em decomposição, em plantas ornamentais tais como bonsais, em musgos utilizados em horticultura do gênero *Sphagnum*, e outros (Dong *et al.*, 1995; Vieira-Dias *et al.*, 1997; Kauffman, 1999; Trent & Kirsner, 2003). Foi também descrita a sua presença em alimentos. No entanto, a via digestiva não parece ser uma via de contaminação (Trent & Kirsner, 2003; Campos *et al.*, 1994).

¹ O *Integrated Taxonomic Information System* – ITIS (Sistema Integrado de Informação Taxonômica) é uma parceria que visa fornecer informação precisa e confiável sobre a taxonomia das espécies biológicas. O ITIS foi inicialmente constituído em 1996 como um grupo de agências dentro do governo federal dos Estados Unidos, integrando agências do Departamento do Comércio dos EUA e o Instituto Smithsonian. Recentemente tornou-se um organismo internacional, com a participação de agências governamentais canadenses e mexicanas. O ITIS oferece uma base de dados de referência automatizada com os nomes científicos e comuns das espécies. Em abril de 2006, continha cerca de 415.660 nomes científicos, sinônimos e nomes comuns para taxa terrestres e aquáticos de todos os reinos biológicos (animais, plantas, fungos e micróbios).

Outra característica do *S. schenckii*, que também é compartilhada com outros fungos patogênicos, é o dimorfismo que ocorre de acordo com as condições de crescimento (ou cultivo). Desta forma, são observadas mudanças em sua morfologia como parte do processo infeccioso. Este fungo é encontrado sob a forma de micélio na no meio ambiente (fase saprofítica), enquanto nas lesões apresenta-se na fase leveduriforme (parasitária). A sua morfologia varia dependendo de uma série de fatores ambientais tais como aeração, tensão de CO₂, fonte de carbono, pH e temperatura. A adição de tiamina e biotina aos meios de cultivo, bem como a baixa tensão de CO₂ facilitam a conversão da forma miceliana para a leveduriforme (Lacaz et al., 2002). No entanto, a temperatura é um fator determinante na transição morfológica. *In vitro*, a fase leveduriforme pode ser obtida por cultivo a 37 °C ou utilizando-se um meio definido, e a forma de micélio pode ser obtida por cultivo a 25°C (Mendonça et al., 1976). Quando submetido a temperaturas acima de 38,5 °C este fungo não consegue crescer (termotolerância). Sendo assim, o uso de calor local é empregado como uma forma de terapia no tratamento de lesões cutâneas (Trent & Kirsner, 2003).

A fase miceliana (pluricelular) caracteriza-se pela presença de hifas delgadas, hialinas, septadas e ramificadas, que contêm finos conidióforos com dentículos no ápice. Cada dentículo dá origem a um conídio hialino, unicelular, de formato globoso a ovóide (alguns isolados apresentam conídios triangulares), de aproximadamente 2 a 4 µm, que agrupados na extremidade dos conidióforos formam estruturas características, em forma de margarida ou crisântemo. Estes conídios podem ainda crescer diretamente sobre a hifa e se dispor bilateralmente às mesmas. Na fase parasitária (unicelular), as leveduras pleomórficas se reproduzem por mitose e apresentam o formato fusiforme característico deste fungo, semelhante a um charuto, bem como, células arredondadas, medindo cerca de 2,5 a 5 µm, com pequenas células em brotamento (Taylor, 1970; Travassos, 1985; Brooks et al., 2000).

O aspecto macroscópico da colônia de micélio de *S. schenckii* é geralmente membranoso, com a superfície enrugada ou atapetada, de cor clara, podendo apresentar pigmentação escura ou acinzentada com o envelhecimento. Após sucessivos subcultivos a colônia pode perder a pigmentação, irreversivelmente, tornando-se branca-creme (Lacaz, 1998). Já as colônias da fase leveduriforme possuem aspecto pastoso, com coloração variando de branco a creme, apresentando superfície irregular, por cultivo em meio BHI-ágar a 37 °C (Rippon, 1988; Lacaz et al., 2002).

Complexo *Sporothrix*

Na última década, o que antes era conhecido como uma única espécie (*S. schenckii*) provou-se tratar de várias espécies crípticas, dando origem ao que vamos chamar neste trabalho de complexo *Sporothrix*, que descrevemos a seguir.

Os critérios para definição de espécies ainda são controversos. Porém, segundo Mayden (1977), dentre os conceitos existentes os mais empregados são: conceito fenético ou morfológico (morfológicos, fenotípicos), conceito biológico (cruzamentos) e conceito cladístico (filogenética evolutiva). A definição de espécies com base na sua morfologia é um enfoque clássico utilizado pelos micologistas. Porém, esse conceito é problemático porque pode ser de difícil aplicação para os microrganismos crípticos que possuem diferenças fenotípicas indistinguíveis entre as espécies relacionadas. O conceito biológico, que foi desenvolvido antes do advento da análise filogenética moderna, enfatiza a troca gênica (reprodução sexual) entre as espécies e a presença de barreiras que previnam o intercruzamento de espécies. Contudo, esse conceito exige o entendimento dos requerimentos para a reprodução sexual, os quais são desconhecidos para um grande número de fungos, incluindo *Sporothrix spp.* O conceito filogenético de espécie considera que os indivíduos que pertencem a uma espécie contêm todos os descendentes de uma única população de ancestrais, ou seja, são monofiléticos. Esse conceito é aplicável para todos os organismos e tem sido utilizado para caracterizar a organização de espécies de diversos fungos de importância médica (Barker *et al.*, 2007) incluindo *H. capsulatum* (Kasuga *et al.*, 2003), *C. neoformans* (Know-Chung & Varma, 2006), *P. brasiliensis* (Matute *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2009), *A. fumigatus* (Pringle *et al.*, 2005), *Coccidioides immitis* (Koufopanou, 2001; Fischer *et al.*, 2002), *Pseudallescheria boydii* (Gilgado *et al.*, 2005), *Candida parapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005), *Fonsecaea nubica* (Najafzadeh *et al.*, 2010), *Pneumocystis carinii* (Beard *et al.*, 2000) entre outros.

Estudos genotípicos e fenotípicos de *S. schenckii* foram realizados, revelando a existência de grupos com alta variabilidade genotípica entre isolados deste fungo (Kong *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Marimon *et al.*, 2006; 2007). Porém, as tentativas de classificar esses grupos de acordo com a origem geográfica ou forma clínica são contraditórias. Suzuki e colaboradores (1988) analisaram o perfil de restrição do DNA mitocondrial de isolados de *S. schenckii*, de variantes desta espécie e de algumas espécies do gênero *Ceratocystis*, observando um único perfil de restrição entre todos os isolados analisados. Em trabalho posterior, no entanto, outro grupo comparou vários isolados ambientais e clínicos de *S.*

schenckii, de diferentes origens geográficas, demonstrando a existência de grupos geneticamente distintos entre os isolados ambientais. Todos os 500 isolados clínicos analisados e dois isolados ambientais, dos 14 estudados, foram identificados como *S. schenckii* (Ishizaki, 2003). Outro estudo com isolados clínicos do México, Guatemala e Colômbia revelou padrões fenotípicos e genotípicos distintos, de acordo com a origem geográfica. Isolados ambientais do México formaram um grupo distinto dos isolados clínicos (Mesa-Arango *et al.*, 2002). Ademais, agrupamento genético também foi relacionado à origem geográfica em isolados de *S. schenckii* do Japão, China e América (Liu *et al.*, 2003). Em 2006, Kong e colaboradores, utilizando os *primers* OPBG01 e OPBG14 para amplificar o DNA genômico de 15 isolados, observaram agrupamento por similaridade genética de acordo com a forma clínica da doença. Ainda em 2006, Zhang e colaboradores estudaram o polimorfismo de 31 isolados de *S. schenckii* provenientes da China. Obtiveram 15 padrões genotípicos distintos e observaram correlação do padrão genotípico com a origem geográfica e a forma clínica da esporotricose.

Após uma comparação entre isolados de *S. schenckii* e de *Ophiostoma stenoceras* De Beer e colaboradores (2003) sugeriram, inicialmente, a existência de outras espécies dentro do que foi denominado complexo *S. schenckii*. Em outros estudos moleculares mais recentes, autores que observaram diferenças genotípicas entre isolados do fungo também têm considerado a existência de espécies crípticas dentro deste complexo. Como por exemplo, Marimon e colaboradores (2006), que realizaram estudo sobre a filogenia molecular de 60 isolados de *S. schenckii* sendo 59 clínicos e 01 de origem ambiental, de vários países e diferentes continentes. Os autores observaram polimorfismos nos genes da calmodulina, β -tubulina e quitina sintase. A partir disso, descreveram três grandes ramos (clados): um agrupando todos os isolados da Europa, o segundo apenas com isolados brasileiros e um terceiro agrupando os isolados da América do Sul e África. Com isso, observaram que o agrupamento genético dos isolados estava relacionado à sua origem geográfica. Porém, os isolados brasileiros, do Rio de Janeiro, foram agrupados em seis prováveis espécies filogenéticas, demonstrando uma alta variabilidade genética, uma vez que estes são de uma área muito restrita do país. Além disso, este trabalho sugere que a espécie *S. schenckii* seja formada por um complexo de espécies filogeneticamente relacionadas, já que as populações deste fungo podem estar em processo de divergência evolutiva. No ano seguinte, o mesmo grupo (Marimon *et al.*, 2007) propõe a criação de três novas espécies, sendo duas de interesse clínico, baseando-se em estudos da variabilidade do gene da calmodulina e de aspectos fenotípicos. Morfologia, padrão de pigmentação, diâmetro dos conídios, perfil de crescimento

a 30, 35 e 37 °C e padrão de assimilação dos açúcares sacarose e rafinose foram utilizados como ferramentas para elaborar uma chave taxonômica para identificação das espécies filogenéticas novas. As novas espécies propostas são *S. brasiliensis*, *S. globosa*, e *S. mexicana*. Segundo a chave taxonômica proposta por Marimon e colaboradores (2007), *S. brasiliensis* apresenta conídios sésseis pigmentados, não cresce mais de 50 mm em 21 dias em ágar batata, é capaz de crescer a 37 °C, não assimila rafinose e é a única espécie que não assimila sacarose. Além disso, esta espécie é a que apresenta o menor crescimento em ágar batata, a 20 e 30 °C, enquanto que *S. mexicana* é a espécie que mais cresce. Já a 37 °C, *S. brasiliensis* é a espécie que apresenta maior crescimento e *S. globosa* é a que menos cresce. Quanto à resistência a antifúngicos, *S. brasiliensis* é a espécie que melhor responde ao tratamento, enquanto que *S. mexicana* apresenta comportamento oposto. Em seguida, Marimon e colaboradores propuseram, através do mesmo método de análise, que o fungo raro *S. schenckii* var. *luriei* seja uma nova espécie e não uma variedade, denominando-o *S. luriei* (Marimon *et al.*, 2008). Recentemente, um estudo demonstrou que isolados do México, Guatemala e Colômbia, morfológicamente identificados como *S. schenckii*, foram reagrupados no táxon *S. globosa*, anteriormente considerada uma espécie dos EUA, Europa e Ásia (Madrid *et al.*, 2009). Em 2010, foi relatado, pela primeira vez, um caso de esporotricose subcutânea em uma idosa de 77 anos, moradora de Xerém (região metropolitana do Rio de Janeiro), causado por *S. globosa*, demonstrando a presença desta espécie no Brasil (De Oliveira *et al.*, 2010). Ainda em 2010, outro estudo sugeriu a inclusão de dois novos membros no complexo *S. schenckii*. Os isolados, que eram morfológicamente similares a *S. inflata*, foram obtidos de amostras de solo coletadas na Espanha e nos Estados Unidos. A primeira espécie foi denominada *S. brunneoviolacea* e é caracterizada pela produção de pigmento difusível em cultura e produção de blastoconídeo lateral, pigmentado e globoso. Já a segunda espécie, denominada de *S. dimorphospora*, carece de pigmentos difusíveis em cultura e apresenta blastoconídeos laterais, subglobosos a obovóides e pigmentados (Madrid *et al.*, 2010).

Apesar de Marimon e colaboradores terem proposto, em 2007, um único ramo para os isolados brasileiros, recentemente foi descrita variabilidade genotípica entre os isolados clínicos de *S. schenckii* provenientes do surto epidêmico no estado do Rio de Janeiro, tanto para isolados humanos quanto de gatos (Reis *et al.*, 2009). Além disso, isolados de *S. schenckii* obtidos de surto de esporotricose no Rio de Janeiro foram avaliados quanto à diversidade genética, por análise do polimorfismo de regiões micro-satélite, sendo encontrados nove subtipos, evidenciando mais uma vez a variabilidade genética deste fungo,

sem haver relação com a forma clínica da doença (Galhardo *et al.*, 2008). Outro estudo utilizando isolados brasileiros de diversas regiões do país demonstrou haver, além de alta variabilidade genotípica, alta variabilidade fenotípica, onde se inclui o perfil de virulência, a termotolerância e resistência a pH, dentre outros (Sovenhi, 2009; Fernandes *et al.*, 2009). Ademais, em isolados clínicos do Peru, foi observada alta variabilidade genotípica e fenotípica entre os isolados deste fungo. Porém, não foi encontrada correlação determinante com a origem geográfica ou forma clínica da doença (Neyra *et al.*, 2005). Desta forma, parece não ser conclusiva nenhuma especiação baseada na correlação geográfica ou forma clínica da esporotricose.

Trabalho recente de nosso grupo, onde foram comparados 12 isolados zoofílicos, antropofílicos e geofílicos originalmente identificados como *S. schenckii*, revelou que, pela análise dos loci (calmodulina e ITS), se tratavam de isolados de duas espécies, *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (Castro, 2010). Neste caso, todos os isolados de esporotricose felina foram agrupados como *S. brasiliensis* (Castro, 2010). Paralelamente, estes achados foram corroborados pelo trabalho de Rodrigues (2010) que estudando 161 isolados de diversas regiões do Brasil também observou que todos os isolados zoofílicos foram genotipados como *S. brasiliensis*. Neste trabalho foi ainda evidenciada a presença da espécie, *S. globosa*, entre os isolados brasileiros (Rodrigues, 2010), o que corrobora o relato clínico anteriormente citado.

Esporotricose

A esporotricose é uma micose de lesão nodular cutânea e subcutânea com distribuição global, que pode afetar seres humanos e animais. Considerada a micose subcutânea mais freqüente do mundo (Bonifaz & Vázquez-González, 2010), esta se apresenta como uma infecção subaguda ou crônica. Sua gravidade, porém, varia de acordo com a resposta imune do paciente (Kauffman, 1999; Bustamante & Campos, 2004) ou com fatores intrínsecos do patógeno, como a termotolerância e variações de patogenicidade da cepa (Tachibana *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 2001), além do tamanho do inóculo e da profundidade do trauma (Dixon *et al.*, 1992).

A forma mais comum de infecção é por inoculação traumática de conídios ou fragmentos de hifa que são introduzidos na pele (tecido subcutâneo) através de lesões causadas por materiais cortantes como gravetos, espinhos ou pedaços de madeira. Em geral, isso ocorre durante atividades de lazer ou está relacionado a atividades laborais como

floricultura, horticultura, jardinagem, pescaria, caça, agricultura, pecuária, mineração e exploração da madeira (Mackinnon *et al.*, 1969; Mayorga *et al.*, 1978; Mayorga *et al.*, 1979; Read & Sperling, 1982; Rippon, 1988; Kauffman, 1999; Lopes *et al.*, 1999; Pappas *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2003; Bustamante & Campos, 2004). Também podem ocorrer contaminações em pessoas que lidam com palha, feno e tijolos (Neto *et al.*, 1999). Embora alguns autores postulem que possa ocorrer também a contaminação por inalação de conídios (Farley *et al.*, 1991), não existem evidências conclusivas de que esta é uma via de infecção. Outros autores descreveram a contaminação por ingestão do fungo (Al-Tawfiq & Wools, 1998), enquanto outros desconsideram essa hipótese (Campos *et al.*, 1994). Foi descrita também a contaminação de profissionais de laboratório durante a manipulação de culturas de *S. schenckii* (Thompson & Kaplan, 1977, Cooper *et al.*, 1992), o que ocorre com relativa frequência.

Já foi descrita a transmissão zoonótica da esporotricose, em especial, por gatos (*Felis silvestris catus*) e tatus (*Dasypus sp*) (Reed *et al.*, 1993). Os tatus infectados geralmente não desenvolvem a doença. Já nos gatos, a manifestação clínica é mais grave e o fungo tende a se disseminar por via hematológica, levando muitas vezes à morte do animal (Xavier *et al.*, 2008). Estes podem ser contaminados através de arranhões, mordidas ou contato com secreções de outros animais infectados (Rosser & Dunstan, 1998; Kauffman, 1999; Schubach *et al.*, 2004). Apesar dos gatos serem atualmente os principais transmissores zoonóticos da esporotricose, outros animais são suscetíveis a esta micose ou possuem papel de reservatório. Um estudo de casos registrados em mamíferos entre 1987 e 2007, no *Davis - Veterinary Medical Teaching Hospital*, na Universidade da Califórnia, constatou que, embora os gatos sejam os animais mais sensíveis a esporotricose, também foi diagnosticada esta micose em cães e equinos (Crothers *et al.*, 2009). Além disso, a transmissão zoonótica por cães, roedores, pássaros e insetos também já foi descrita (Diaz, 1989; Reed *et al.*, 1993). Em regiões endêmicas no Peru, gatos domésticos contaminados ou doentes são considerados um fator de risco para transmissão desta doença (Kovarik *et al.*, 2008). Atualmente, veterinários, técnicos, treinadores e proprietários de gatos são considerados um novo grupo de risco (Madrid *et al.*, 2009).

A esporotricose é, na maioria das vezes, uma infecção benigna limitada à pele e ao tecido subcutâneo. A lesão inicial, que se desenvolve na forma de nódulo granulomatoso, pode evoluir para formar uma lesão necrótica ou ulcerativa. Durante este período, os vasos linfáticos acometidos tornam-se espessos e de aspecto semelhante a uma corda. Ao longo dos vasos linfáticos são observados múltiplos nódulos subcutâneos e abscessos (Brooks *et al.*,

2000). Geralmente, esta micose apresenta evolução subaguda à crônica em indivíduos hígidos podendo ocorrer formas disseminadas ou extracutâneas em pacientes imunocomprometidos (Lacaz *et al.*, 2002).

Lesões esporotricóides são observadas em outras patologias, devendo-se destacar a leishmaniose cutânea, o que pode confundir o correto diagnóstico clínico desta micose (Castrejón *et al.*, 1995). Casos de co-infecção de esporotricose e leishmaniose já foram relatados (Agudelo *et al.*, 1999). As lesões de tuberculose cutânea são também muito similares às de esporotricose (Sharma *et al.*, 2005).

Formas clínicas

Esta micose possui várias formas clínicas, porém estudos ainda divergem a respeito da melhor forma de classificá-las. De forma geral, as manifestações clínicas da esporotricose podem ser classificadas como formas cutâneas, de mucosa, extracutâneas e atípicas. Na tabela 2 descrevemos uma das classificações propostas para as diferentes formas clínicas desta doença (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

A forma cutânea (Figura 1) é dividida em linfocutânea, cutânea fixa ou cutânea disseminada. A forma clínica mais comum de esporotricose é a linfocutânea, que representa aproximadamente 80% dos casos desta doença (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). Nesta forma, as lesões começam a aparecer dias ou semanas após a inoculação do fungo e a lesão se inicia por uma pápula que pode vir a ulcerar. Com o progresso da doença, surgem lesões nodulares que seguem a distribuição dos vasos linfáticos próximos à lesão inicial. Na forma cutânea fixa, as lesões são similares a placas que permanecem próximas ao ponto de inoculação, não ocorrendo lesões nodulares e sendo incomum a ulceração das lesões. A forma cutânea disseminada é a menos comum dentre as formas cutâneas e pode ser causada por disseminação hematogênica, inoculação própria (o ato de coçar a ulceração e fazer um inóculo em outra parte do corpo) ou por múltiplas inoculações externas (Bustamante & Campos, 2004; Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). O envolvimento de mucosa na esporotricose não é muito comum mas, quando ocorre, é preferencialmente na mucosa ocular (Figura 1) (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

Tabela 2. Formas clínicas da esporotricose (adaptado de Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

1. Cutânea

- Linfocutânea
- Fixa
- Disseminada ou múltipla

2. Mucosa

- Ocular
- Nasal
- Outras

3. Extracutânea

- Pulmonar
- Osteoarticular
- Meningite
- Generalizada

4. Residual (Sequela)**5. Especiais**

- Hipersensibilidade (eritema nodoso, eritema multiforme).
-

A forma extracutânea (Figura 1) é a mais rara, porém, no Brasil, dados recentes indicam que as formas mais graves já ocorrem em aproximadamente 10% dos pacientes com esporotricose confirmada (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). Esta manifestação clínica pode ser dividida em unifocal, afetando um único órgão ou sistema, ou multifocal, afetando dois ou mais órgãos ou sistemas, e ocorre quando outros tecidos, que não a pele ou tecidos subcutâneos estão envolvidos. Ocorre uma maior incidência desta forma em pacientes com algum tipo de imunocomprometimento, como pacientes HIV+, diabéticos, com alcoolismo crônico ou em tratamento com drogas imunossupressoras (Al-Tawfiq & Wools, 1998; Bustamante & Campos, 2004). A esporotricose osteoarticular é a manifestação clínica extracutânea mais comum desta doença (Elias *et al.*, 1987; Lopes-Bezerra *et al.*, 2006; Callens *et al.*, 2006), sendo mais raro o comprometimento pulmonar, do sistema nervoso central (Silva-Vergara *et al.*, 2005), da laringe (Khabie *et al.*, 2003), dentre outros. Foi descrito um caso de esporotricose intraocular sem trauma prévio (Hampton *et al.*, 2002).



Figura 1. Formas clínicas da esporotricose. Cutâneas: linfocutânea (L), cutâneas fixa (F) e disseminada (D); Mucosa: ocular (M); Extracutânea: osteoarticular (E). Adaptado de: Mycology Online - The University of Adelaide (www.mycology.adelaide.edu.au/); Montes *et al.*, 2009 (www.dermato-santacasa.com.br); Carvalho *et al.* 2002; Jones *et al.*, 1999 e Lopes-Bezerra *et al.*, 2006.

Epidemiologia

Pelo fato da esporotricose não ser uma doença de notificação compulsória, é difícil conhecer sua real prevalência em determinada região ou país. Em geral, isso leva a sua incidência a ser subestimada, como ocorre com outras infecções fúngicas. Portanto, dados confiáveis da incidência da doença de todas as regiões endêmicas nem sempre são disponíveis (Pappas *et al.*, 2000). A falta do diagnóstico laboratorial capaz de diferenciá-la de outras doenças, denominadas, em conjunto, de PLECT (paracoccidioidomicose, leishmaniose, esporotricose, cromoblastomicose e tuberculose cutânea) em muitas regiões, dificulta o conhecimento de sua real incidência e epidemiologia.

A esporotricose é uma doença de distribuição cosmopolita, tendo maior incidência em áreas tropicais e subtropicais. Os países com áreas consideradas endêmicas são: Brasil, Colômbia, México, Costa Rica, Guatemala, Uruguai, África do Sul, Índia, Japão e Peru. Porém, em uma região montanhosa do Peru, Abancay, há uma área que foi considerada hiperendêmica com incidência de 48, 60 e 49 casos por 10000 habitantes por ano, nos anos de 1995, 1996 e 1997, respectivamente (Bustamante & Campos, 2001). Além disso, surtos epidêmicos isolados também já foram descritos, sendo o maior deles identificado em uma mina de ouro em Witwatersrand, na África do Sul, entre 1941 e 1944, quando cerca de três mil mineiros foram infectados devido ao manuseio de toras de madeira contaminadas, usadas na estrutura da mina (Quintal, 2000). Nos Estados Unidos, um surto espalhou-se por 15 estados. Oitenta e quatro indivíduos que participavam de programas de reflorestamento foram infectados após o contato com o musgo do gênero *Sphagnum*, originado de Wisconsin, contaminado com *S. schenckii* (Dixon *et al.*, 1991). No Brasil, a esporotricose é mais freqüente nas regiões Sul e Sudeste. A região Sul do Brasil foi considerada como área endêmica, pois foram descritos 304 casos de esporotricose entre 1967 e 2002 (da Rosa *et al.*, 2005). Esta micose foi descrita como a segunda micose subcutânea em prevalência em São Paulo (Barros *et al.*, 2001). Pode ser considerada endêmica no estado do Rio de Janeiro, principalmente na baixada fluminense (Barros *et al.*, 2008; 2010).

A América Latina apresenta o maior número de pacientes com esporotricose, estando esta doença relacionada a atividades como a caça de tatus no Uruguai e pesca em Laguna de Ayarza na Guatemala (Bustamante & Campos, 2004). No Uruguai, mais de 80% dos casos de esporotricose foram diagnosticados em caçadores de tatu (Conti-Diaz, 1989). No Brasil, foi isolado *S. schenckii* do solo de toca de tatu na região de Botucatu (SP) (Sovenhi, 2009). Na mesma cidade, foi isolado este fungo de paciente que relatou ter sido arranhado por tatu

(Sovenhi, 2009). Em Teresina (PI), *S. schenckii* foi também isolado de um indivíduo que se contaminou após sofrer arranhadura de tatu (Sovenhi, 2009).

Na Austrália, houve um aumento do número de casos de esporotricose, passando de 8, entre 1997 e 1999, para 62, entre 2000 e 2004, sendo este aumento relacionado ao feno usado pelos fazendeiros da região de Busselton/Margaret River, na região sudoeste do país (O'Reilly & Altman, 2006). Em 1998, haviam sido descritos 16 casos de esporotricose cutânea e linfocutânea, num período de 9 meses, na comunidade rural de Queensland, sudeste da Austrália, também relacionados ao feno usado pelos agricultores (Conias & Wilson, 1998). Recentemente, Manipur, na Índia, foi considerada como uma nova área endêmica para esporotricose, sendo relatados 73 casos desta doença entre 1999 e 2005 sendo apenas dois destes casos em indivíduos HIV positivos (Devi *et al.*, 2006).

A esporotricose é menos comum em áreas urbanas, com casos esporádicos relacionados à atividade de jardinagem. Recentemente, a incidência de esporotricose em áreas urbanas vem se constituindo num novo paradigma pelo fato da esporotricose em felinos ganhar importância epidemiológica, com impacto na transmissão desta micose ao homem. Quando o gato transmite o fungo por arranhadura ou mordedura, a contaminação se dá pelo inoculo da levedura e não de conídios ou fragmentos de hifa, como ocorre na maioria dos casos. O fato de a levedura apresentar maior virulência em modelo murino, quando comparada aos conídios (Fernandes *et al.*, 2000), pode levar ao aparecimento de formas mais graves ou atípicas da doença. Em 2004, Schubach e colaboradores avaliaram 347 casos de esporotricose em gatos, no estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 1998 e 2001 (Schubach *et al.*, 2004). A transmissão gato-homem já havia sido descrita na década de 80 no Japão (Dunstan *et al.*, 1986), e foi igualmente descrita no estado de São Paulo (Larsson *et al.*, 1989). Entre 1998 e 2004, no Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, Fiocruz, foram diagnosticados, por isolamento de *S. schenckii* em cultura, 1503 casos em gatos, 64 casos em cães e 759 casos humanos, sendo o maior surto zoonótico já descrito na literatura. Como regra, a esporotricose felina precede a humana e a canina, pois foi observado contato domiciliar ou profissional com gatos doentes em 84,1% dos casos caninos e em 84,7% dos casos humanos. Em 57,1% dos casos humanos foi relatado histórico de arranhadura ou mordedura de gatos (revisado por Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). Dados mais recentes apontam para aproximadamente 2200 casos humanos de esporotricose diagnosticados no Estado do Rio de Janeiro até dezembro de 2009, confirmando que esta doença assumiu proporções epidêmicas neste estado. Além disso, foram atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, até a mesma data, aproximadamente 3244 gatos (Barros *et al.*, 2010). Schubach e

colaboradores isolaram *S. schenckii* das unhas e cavidades orais de 148 gatos domésticos com esporotricose e 84 gatos aparentemente saudáveis no estado do Rio de Janeiro, o que reforça a hipótese de que a transmissão zoonótica pode ocorrer através de arranhaduras ou mordeduras destes animais (Schubach *et al.*, 2001; Schubach *et al.*, 2002).

Virulência

A palavra virulência tem a mesma origem latina da palavra vírus, a qual originalmente se referia a qualquer patógeno que causava doença (*apud* Rodrigues, 2010). Sendo assim, virulência seria uma capacidade intrínseca que difere microrganismos patogênicos dos não patogênicos. Porém, esta idéia clássica vem sendo modificada pelas crescentes evidências de que fatores do hospedeiro são determinantes na interação patógeno-hospedeiro e no estabelecimento da doença (dano ao hospedeiro). Microrganismos considerados patogênicos podem não ser virulentos para um indivíduo hígido e aqueles considerados não patogênicos podem causar doença em indivíduos imunocomprometidos. Virulência é um fenômeno complexo que combina fatores tanto do hospedeiro quanto do microrganismo. A patogenia microbiana é resultado da interação entre o hospedeiro e o microrganismo, sendo a resposta do hospedeiro dependente do grau de dano causado pelo microrganismo invasor. Os danos ao hospedeiro podem ser resultado de fatores microbianos e/ou da resposta do próprio hospedeiro. Esses fatores microbianos causam danos às células e tecidos do hospedeiro e são conhecidos como fatores/reguladores de virulência. Esses fatores de virulência podem ser defensivos, tais como, resistência às espécies reativas de oxigênio ou formação de biofilmes, ou ofensivos (capazes de provocar injúria), tais como expressão de adesinas e/ou produção de toxinas e enzimas (Casadevall & Pirofski, 2003, Pirofski & Casadevall, 2008).

Estudos realizados por Robert Koch, um cientista alemão, permitiu em 1887 o desenvolvimento do postulado de Koch (*apud* Falkow, 2004) que propôs que, para comprovar-se que um patógeno específico causa determinada doença, esse patógeno deveria cumprir três requisitos: 1) ser isolado de um hospedeiro doente, 2) ser isolado em cultura, e 3) o produto da cultura, inoculado num indivíduo ou animal saudável, deveria causar a mesma patologia. Entretanto, alguns autores discordam, pelo menos em parte, deste postulado (Isenberg, 1988; Walker *et al.*, 2006). Já em 1988, Falkow elaborou a versão molecular do postulado de Koch, que considera que para ser considerado fator de virulência, os genes codificadores desses fatores devem estar presentes em microrganismos patogênicos e estar ausentes ou inativos em microrganismos não patogênicos. Além disso, a perda funcional

desses genes deve resultar na geração de microrganismos avirulentos e a introdução de tais genes em cepas avirulentas deve resultar na recuperação da virulência. E, por último, os genes relacionados à virulência devem estar sempre sendo expressos durante a infecção (Falkow, 1988).

Segundo Pirofski & Casadevall (2008) uma infecção microbiana pode resultar na eliminação, colonização, comensalismo, doença ou latência do patógeno. A eliminação do microrganismo é dependente da resposta imune do hospedeiro e, ao falhar, resulta em colonização. O comensalismo resulta da transição da colonização para este estado sem dano ao hospedeiro. No momento em que a relação entre o microrganismo e o hospedeiro resulta em prejuízo ao hospedeiro a doença é estabelecida. Contudo, variações de imunidade do hospedeiro podem causar a transição entre o comensalismo e doença. Podemos citar, como exemplo, a infecção por *C. albicans*, comensal do hospedeiro humano que, após uma baixa imunológica, invade o tecido e causa a infecção. Ao sobreviver e se evadir do sistema imune do hospedeiro o microrganismo pode entrar em estado de latência e não é assim eliminado. Sendo assim podemos concluir que os patógenos verdadeiros são aqueles capazes de causar a doença em indivíduos imunocompetentes e microrganismos oportunistas são os que podem ocasionar doença apenas em indivíduos com baixa imunidade.

Já foram identificados e caracterizados diversos tipos de fatores de virulência em fungos, como por exemplo, adesinas, proteases, melanina, enzimas de vias metabólicas e até mesmo polissacarídeos capsulares do fungo *C. neoformans*. A deleção do gene WI-1 (atualmente conhecido como BAD-1) do fungo *Blastomyces dermatitidis* resultou na diminuição da adesão deste fungo ao tecido pulmonar e na perda da virulência em camundongos. Porém, essas propriedades foram restauradas em mutantes nas quais o gene foi reconstituído, provando que o gene BAD-1 codifica uma adesina que funciona como fator de virulência (Brandhorst *et al.*, 1999). No fungo *C. albicans*, as proteases Sap9 e Sap10, que são GPI-ancoradas à parede celular deste fungo, funcionam como fatores de virulência, pois a sua deleção causa a perda da virulência deste fungo em infecção oral experimental (Albrecht *et al.*, 2006). A imunização prévia, com anticorpo monoclonal contra melanina, de camundongos infectados com o fungo *C. neoformans* prolongou a sobrevivência e reduziu a carga fúngica nos órgãos desses camundongos (Rosas *et al.*, 2001). Além disso, cepas acapsulares deste mesmo fungo não causam mortalidade em camundongos (Idnurm *et al.*, 2005), sugerindo que a melanina e a cápsula do *C. neoformans* funcionam como fatores de virulência. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) de *Paracoccidioides brasiliensis* já foi descrita como uma molécula de adesão a proteínas matriciais, sendo

relacionada à invasão e disseminação deste patógeno (Barbosa *et al.*, 2006). Outra enzima, a malato-sintase, foi localizada na superfície celular de *P. brasiliensis*, sendo capaz de mediar a sua interação com células epiteliais da linhagem A549 (Neto *et al.*, 2009).

Pouco se conhece sobre os fatores que contribuem para a virulência de *S. schenckii*. Entretanto, recentemente, foi caracterizada, na superfície deste fungo, uma proteína com massa molecular de 70 kDa que parece mediar sua interação com a matriz subendotelial e dérmica (Ruiz-Baca *et al.*, 2008). Paralelamente, foi descrita uma molécula, com mesma massa molecular, que confere proteção aos animais infectados experimentalmente, além de inibir a ligação com a fibronectina e a laminina (Nascimento *et al.*, 2008). Além disso, foram descritas glicoproteínas que possuem resíduos de manose e glicose que participariam na adesão deste patógeno a células epiteliais (Sandoval-Bernal *et al.*, 2010).

A melanina, que é também um componente encontrado na parede celular deste patógeno, parece influenciar no processo de infecção em modelo animal de esporotricose (Romero-Martinez *et al.*, 2000; Morris-Jones *et al.*, 2003). Recentemente, Madrid e colaboradores (2010b) observaram que cepas de *S. schenckii* que produzem melanina têm maior capacidade invasiva que cepas que não produzem este pigmento. Além disso, dados recentes mostram a presença de lacase no citoplasma, tanto da forma miceliana quanto leveduriforme, deste fungo, sugerindo que a produção de melanina ocorra pela via da L-DOPA (Almeida-Paes *et al.*, 2009). Paralelamente, durante o desenvolvimento desta tese, demonstramos que a produção de melanina por *S. schenckii* pode ser modulada por L-DOPA e dependente da composição do meio de cultivo, o que modifica a virulência da cepa em modelo murino de esporotricose disseminada. Foi proposta uma nova via de biossíntese de melanina que envolveria o uso de compostos fenólicos (Teixeira *et al.*, 2010).

Alguns autores acreditam que as diferentes manifestações clínicas da esporotricose existam devido a alterações imunológicas no organismo do hospedeiro, sendo, conseqüentemente, a resposta imune responsável pelo grau de disseminação do *S. schenckii* (Maia *et al.*, 2006). Em contrapartida, outros estudos mostram que a variedade de apresentações clínicas não se deve apenas a variações na resposta imune do hospedeiro, mas também a fatores intrínsecos do patógeno, como a termotolerância levando a variações na virulência entre cepas (Tachibana *et al.*, 1998; 2001). Kong e colaboradores (2006), por exemplo, descreveram que as diferentes formas clínicas da esporotricose são causadas por cepas com genótipos distintos.

Modelo murino de esporotricose disseminada já foi utilizado por diversos grupos para comparar a virulência de diferentes isolados do *S. schenckii*. Tachibana e colaboradores

(1998) demonstraram que cepas isoladas de lesões cutâneas eram incapazes de levar os animais infectados à morte, sendo eliminadas rapidamente do organismo do hospedeiro. No entanto, estes autores observaram que as cepas isoladas de lesões de esporotricose visceral eram capazes de causar morte nesses animais, sugerindo que cada cepa possui fatores de patogenicidade intrínsecos, sendo mais virulentos isolados clínicos de formas mais graves da doença. Fernandes e colaboradores (1999) demonstraram, usando outro modelo murino de esporotricose disseminada, que os conídios do *S. schenckii* isolados de culturas micelianas depois de 10 ou 12 dias de cultivo são menos virulentos que os conídios isolados de culturas após 4 ou 7 dias. Observaram ainda, que a análise da composição de carboidratos da parede celular revelou a predominância no conteúdo de manose na superfície dos conídios menos virulentos, sugerindo que variações na expressão de componentes de superfície poderiam estar associadas à virulência do *S. schenckii*. Posteriormente, observaram que a levedura apresentava alto grau de infectividade comparado ao conídio de 7 dias e maior resistência à atividade microbicida de macrófagos murinos (Fernandes *et al*, 2000).

As adesinas de microrganismos são consideradas, por alguns autores, como fatores de virulência. No entanto, como veremos adiante, embora os estudos nesta área tenham avançado nos últimos anos, ainda é pouco o que se conhece sobre os mecanismos de adesão e disseminação de fungos patogênicos.

Interação fungo-hospedeiro

Na interação entre os fungos patogênicos verdadeiros ou oportunistas e seu hospedeiro, inúmeros fatores são responsáveis pelo processo de infecção, tanto aqueles relativos ao *status* imunológico do hospedeiro quanto fatores intrínsecos ao patógeno, denominados fatores de virulência. Alguns mecanismos de interação são essenciais para que se estabeleça a infecção, dentre eles a adesão às células ou tecidos do hospedeiro. Neste contexto, daremos ênfase à fibronectina, foco de nossos estudos.

O processo de infecção e colonização ocorre de acordo com a capacidade de cada espécie patogênica em produzir ou expressar mediadores desta interação, denominados de adesinas. Estas adesinas são proteínas ou glicoproteínas expressas na parede celular dos fungos. Além disso, a interação de moléculas expressas apenas na superfície de microorganismos, conhecidas como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), com receptores expressos em células do hospedeiro podem desencadear reação inflamatória muitas vezes implicada na redução de processo infeccioso. No caso de fungos, as β -glucanas são

PAMPs conhecidos por mediar sua ligação a células dendríticas e polimorfonucleares, através do seu PRR (*pattern recognition receptor*), neste caso, a dectina-1 (Buzás *et al.*, 2006).

Neste sentido, nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos vários estudos sobre a adesão de fungos a células hospedeiras, fagocíticas e não-fagocíticas, bem como a proteínas matriciais (revisto por Filler & Sheppard, 2006).

Matriz extracelular

A matriz extracelular é uma complexa rede de moléculas que se localiza no espaço entre as células, conferindo forma e resistência ao tecido e regulando a migração, crescimento e diferenciação celular, além de atuar como barreira física ou filtro seletivo para algumas moléculas (Adams & Watt, 1993; Bosman & Stamenkovic, 2003; Järveläinen *et al.*, 2009). Dois tipos de matriz podem ser encontrados nos organismos pluricelulares: lâmina basal, que é uma fina camada de matriz especializada adjacente às células epiteliais, endoteliais, musculares, entre outras e matriz intersticial ou mesenquimatosa, típica dos tecidos conjuntivos.

De forma geral, a matriz extracelular é composta por glicoproteínas, como fibronectina, laminina, vários tipos de colágeno, dependendo do tecido, entactina, entre outras. Outros componentes importantes da matriz extracelular são os glicosaminoglicanos (GAG) e os proteoglicanos, como o perlecan. Os proteoglicanos são um tipo de glicoproteína onde há ligação covalente de GAG (por exemplo, sulfato de condroitina) a proteínas. Todas as GAGs são encontradas ligadas a proteínas na forma de proteoglicanas, com exceção da hialuronana (ácido hialurônico), que se encontra de forma livre na matriz extracelular.

Além destes componentes, estão presentes na matriz, enzimas que levam à sua constante renovação e remodelamento. Estas enzimas são divididas em famílias, conhecidas como serino-proteases, cisteíno-proteases e metaloproteinases. Esta última família é a mais estudada e é caracterizada, em parte, pela dependência de zinco (Bosman & Stamenkovic, 2003). A primeira metaloproteinase descoberta foi definida como tendo atividade colagenolítica, com capacidade de hidrolisar o rabo do girino (Gross & Lapierre, 1962).

Qualquer tipo de trauma ou dano ao tecido hospedeiro pode expor a matriz extracelular (Tronchin *et al.*, 2008). Por isso, seus componentes podem não ser apenas um substrato para células do hospedeiro, mas também para microrganismos invasores. Já foi demonstrada a capacidade adesiva de vários patógenos a proteínas da matriz extracelular. Klotz e colaboradores mostraram que a adesão do *C. albicans* à fibronectina e ao colágeno I

era dependente de cálcio (Klotz *et al.*, 1993). Em bactérias o estudo de adesinas está bem mais avançado. Dentre as adesinas de bactérias uma das mais conhecidas é uma proteína de *Staphylococcus aureus* denominada proteína ligante a fibronectina (FnBP) (Schwarz-Linek *et al.*, 2003; Clarke & Foster, 2006).

Fibronectina

A fibronectina é uma das glicoproteínas mais bem estudadas da matriz extracelular e o seu aparecimento na evolução está relacionado com o surgimento de organismos com vasculatura endotelial. Esta proteína está envolvida nos processos de adesão e migração, assim como na embriogênese, cicatrização, trombose e coagulação (Potts & Campbell, 1996, White *et al.*, 2008). Apesar de estar identificada como componente estrutural da matriz, a fibronectina pode ser encontrada em abundância no plasma, na forma solúvel.

Esta proteína é um homodímero formado por duas subunidades, com aproximadamente 220-250 kDa, unidas por um par de pontes de dissulfeto na extremidade C-terminal. A estrutura e os domínios da fibronectina estão ilustrados na Figura 2. Cada monômero é composto por três diferentes módulos protéicos (I, II e III), que foram primeiramente identificados na fibronectina, mas que posteriormente foram encontrados em uma variedade de outras proteínas (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer, 2003). Esta glicoproteína contém 12 módulos do tipo I, cada um com aproximadamente 40 aminoácidos e a deleção de um desses módulos da região N-terminal da fibronectina reduz a afinidade do sítio de ligação celular desta proteína. Já o módulo II possui 60 aminoácidos e está presente apenas no domínio de ligação ao colágeno, que contém dois destes módulos. O módulo III, que contém 90 aminoácidos, é o que está presente em maior quantidade nesta proteína (15 módulos). Seu papel principal é mediar as interações proteína-proteína (Campbell & Spitzfaden, 1994), apesar de conter, em ¹⁰III, o sítio RGD (Arg-Gli-Asp), que é parte do principal sítio de ligação celular (Potts & Campbell, 1996, White *et al.*, 2008).

Em bactérias, inúmeros estudos têm descrito a presença de moléculas que promovem a adesão do patógeno à fibronectina, sendo esta adesão relevante para invasão no hospedeiro. Em *Borrelia burgdorferi* foi descrita e caracterizada uma dessas moléculas, a RevA (Brissette *et al.*, 2009a). Além desta, várias outras bactérias, como *Treponema pallidum*, através das adesinas Tp0155 e Tp0483 (Cameron *et al.*, 2004), *Pseudomonas aeruginosa*, através de PA-II (Rebiere-Huet *et al.*, 2004), bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Joh *et al.*, 1999; Vergara-Irigaray *et al.*, 2009), demonstram capacidade de ligação à fibronectina. A

adesão à fibronectina por fungos patogênicos tem sido considerada um fator importante para invasão do tecido hospedeiro, pois já tem sido descrita ao longo dos últimos anos a interação entre vários fungos e a fibronectina, como *A. fumigatus* (Penalver *et al.*, 1996), *C. albicans* (Kalo *et al.*, 1988; Klotz, 1990) e *S. schenckii* (Lima *et al.*, 1999).

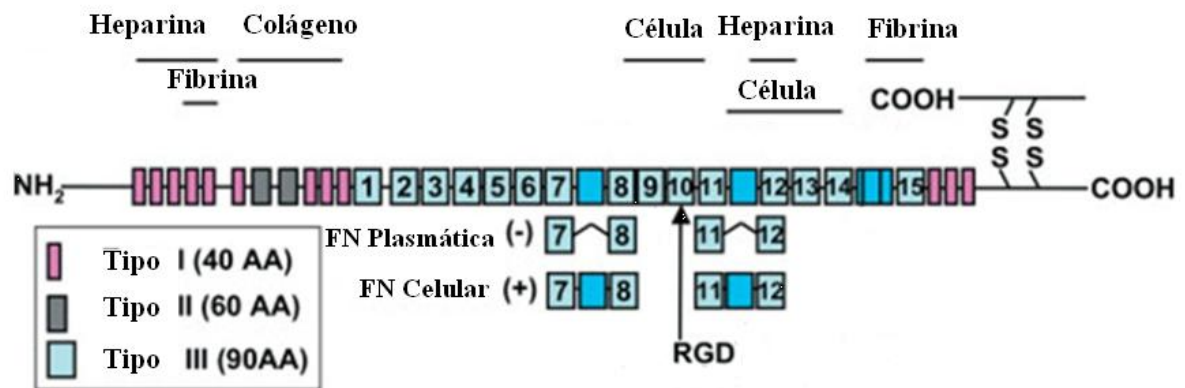


Figura 2. Modelo estrutural da fibronectina (adaptado de White *et al.*, 2008). A fibronectina contém repetições dos módulos do tipo I (rosas), tipo II (cinzas) e tipo III (azuis). Esta série de repetições constituem os domínios de ligação a fibrina, fibronectina, colágeno, células e heparina, como indicado. SS indica o par de pontes de dissulfeto na extremidade C-terminal que une as duas subunidades da fibronectina, formando um homodímero. O módulo ¹⁰III possui o sítio RGD (Arg-Gli-Asp), como indicado.

Parede celular e adesão

Estrutura da parede celular

A parede celular é uma estrutura de alta plasticidade que confere resistência e proteção a células de fungos, bactérias e vegetais. Além disso, a parede celular de fungos participa dos processos de interação com outros organismos, seletividade, reconhecimento antigênico, proteção contra estresses ambientais, entre outros. Por ser uma estrutura ausente em células de mamíferos, a parede celular é excelente alvo potencial para novas terapias antifúngicas, (Gozalbo *et al.*, 2004; Bowman & Free, 2006; Pontón, 2008).

A parede celular dos fungos é constituída de aproximadamente 80-90% de carboidratos, 5-20% de proteínas e 1-7% de lipídios. Para a levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, a parede celular constitui-se em aproximadamente 10-25% do peso seco da célula (Klis *et al.*, 2006). Os carboidratos apresentam-se, majoritariamente, na forma de polissacarídeos e de glicoconjugados que, por sua vez, apresentam cadeias de O-glicanas e N-glicanas covalentemente ligadas à proteína (Chaffin *et al.*, 1998; Klis *et al.*, 2001). Os polissacarídeos podem estar na forma de homopolímeros (ex: mananas e glucanas) ou heteropolímeros como, por exemplo, ramnomanas e glucuronoxilomananas.

Os polissacarídeos insolúveis, como quitina e β -glucanas, têm fundamental importância na organização estrutural da parede celular, a que conferem forma e rigidez, constituindo ainda seu arcabouço. Já as glicoproteínas concentram-se mais externamente à parede, associadas aos polímeros insolúveis ou como componentes intersticiais, estando envolvidos nos processos de interação parasito-hospedeiro (Gozalbo *et al.*, 2004). A quitina é um polissacarídeo linear, composto por unidades de N-acetilglucosamina β -1-4 ligados e representa cerca de 0,6-9% do peso da parede celular. Já a β -glucana é o mais abundante polissacarídeo estrutural da parede sendo composta por polímeros de glicose β -1-3, β -1-6 e β -1-4 (dependendo da espécie) ligados, representando aproximadamente 60% do peso seco da parede. As glucanas β -1,3 e β -1-6 associam-se à quitina por ligações covalentes do tipo β -1-4 (Gozalbo *et al.*, 2004; Latgé, 2007). Em 1979, foi analisada a composição de glucanas presentes na parede celular de *S. schenckii*. As glucanas álcali-solúveis presentes na fase leveduriforme apresentaram 44% de ligações β -1,3, 28% de ligações β -1,4 e 28% de ligações β -1,6. Neste estudo, não foi observada variação na composição e estrutura de β -glucanas entre as fases de micélio e levedura do *S. schenckii* (Previato *et al.*, 1979). A Figura 3 ilustra a

estrutura, disposição e ligações entre os polímeros estruturais da parede celular de fungos e as diferenças estruturais dos polímeros entre leveduras e fungos filamentosos.

As glicoproteínas (ou glicopeptídeos), por sua vez, estão mais relacionadas à virulência, à atividade metabólica e ao reconhecimento antigênico, podendo chegar a um teor de até 95% de carboidrato na sua composição (Lipke & Ovalle, 1998). A glicosilação de proteínas é um processo pós-traducional e pode ser de dois tipos: a N-glicosilação e a O-glicosilação. A N-glicosilação envolve a ligação do aminoácido asparagina a um resíduo de N-acetilglucosamina do oligossacarídeo precursor que é transferido para a proteína nascente no retículo endoplasmático. Segue-se seu processamento no próprio retículo endoplasmático e no Golgi (Tanner *et al.*, 1982). Já na O-glicosilação, especificamente em fungos, observa-se a ligação de um resíduo de manose à serina e/ou treonina (Martinez *et al.*, 1998; Gow *et al.*, 1999).

As glicoproteínas da superfície celular variam estruturalmente de microorganismo para microorganismo e, ainda, dentro de uma mesma espécie de fungo, havendo variações entre as cepas. Estas variações podem ser na proporção e na composição de açúcares, no tamanho das cadeias laterais e no tipo e configuração da ligação entre os resíduos (Ballou, 1970; Gorin & Barreto-Bergter, 1983).

Os modelos de parede celular de fungos estão baseados no estudo das leveduras, *C. albicans* (Klis *et al.*, 2001) e *S. cerevisiae* (Klis *et al.*, 2002; 2006). Como ilustra a Figura 4, a parede celular é estratificada, possuindo uma maior concentração de quitina e β -glucana nas camadas mais internas enquanto as glicoproteínas estão preferencialmente localizadas na camada mais externa da parede celular. A estrutura da parede celular dos fungos é altamente dinâmica, mudando constantemente durante a divisão celular, crescimento e morfogênese. Esta plasticidade é possível devido à atividade de enzimas, como quitinases e glucanases, que estão ligadas à parede celular. Algumas quitinases e glucanases já foram identificadas e caracterizadas em diversos fungos (Adams, 2004). Existem fortes evidências de que a quitina, as glucanas e as glicoproteínas são covalentemente ligadas entre si e que essa ligação é dinâmica, através da ação de enzimas de remodelamento como as quitinases e glucanases e que este mecanismo ocorre extracelularmente (Bowman & Free, 2006).

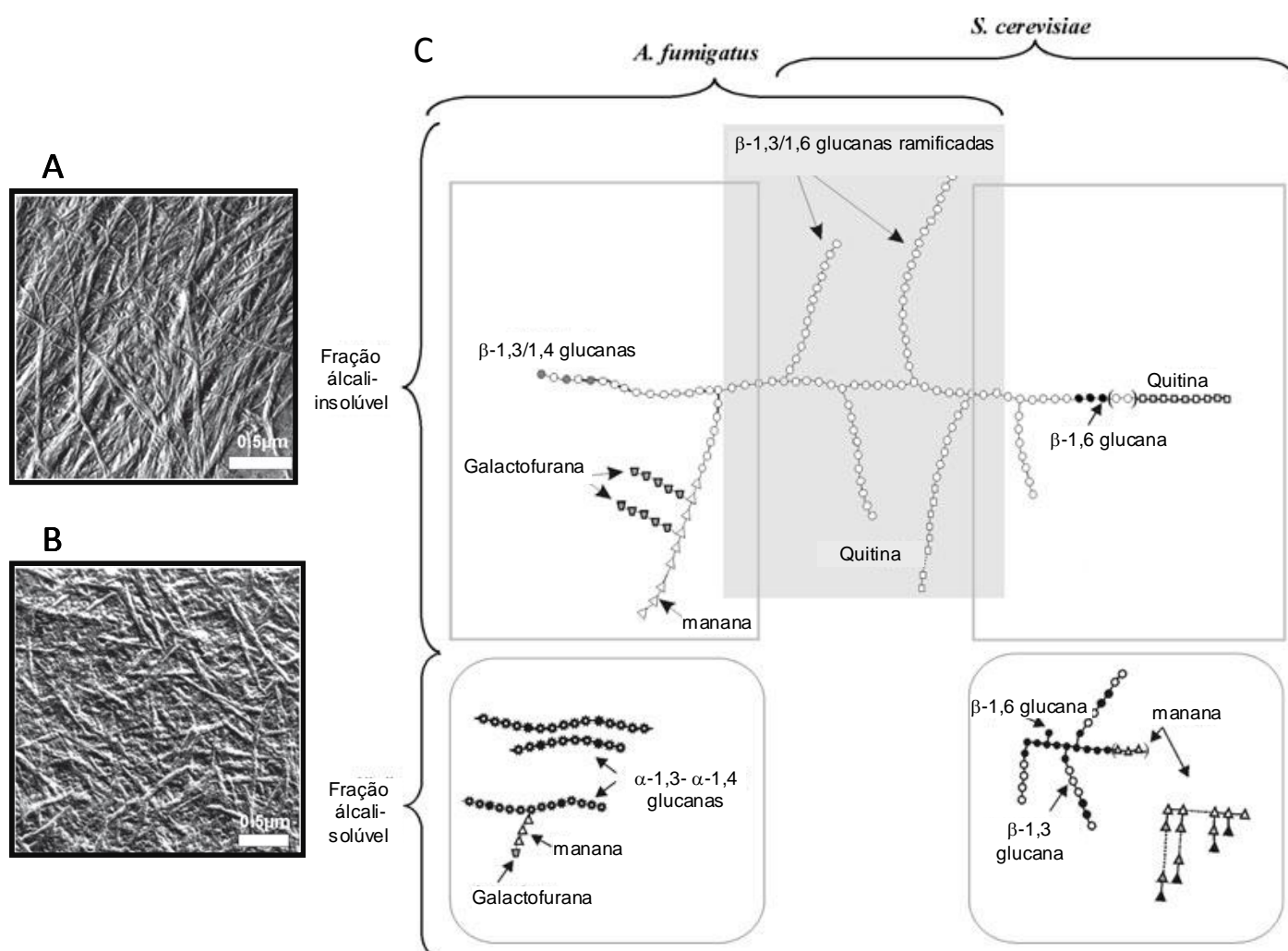


Figura 3. Composição e estrutura de polissacarídeos da parede celular dos fungos. Em A, microscopia eletrônica de transmissão do material insolúvel recuperado após tratamento da parede celular do zigomiceto *Conidiobolus obscurus* com NaOH a 1N, frio; B, microscopia eletrônica de transmissão do material insolúvel da parede celular de *C. obscurus* recuperado após tratamento à quente com NaOH 1N e ácido acético 0,5 N. Em C, modelo ilustrativo da composição polissacarídica da parede celular do fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os componentes das frações insolúveis e solúveis em meio alcalino estão apresentados como: α -1,3 (\odot) e α -1,4 (\otimes) glucanas; β -1,3 (\circ), β -1,4 (\bullet) e β -1,6 (\bullet) glucanas; quitina (\square); α -1,2 (\triangle), α -1,3 (\blacktriangle) e α -1,6 (\triangle) mananas e β -1,5 galactofurana (∇). O núcleo comum a maioria dos fungos está marcado em cinza. Figura adaptada de Latgé *et al.*, 2007.

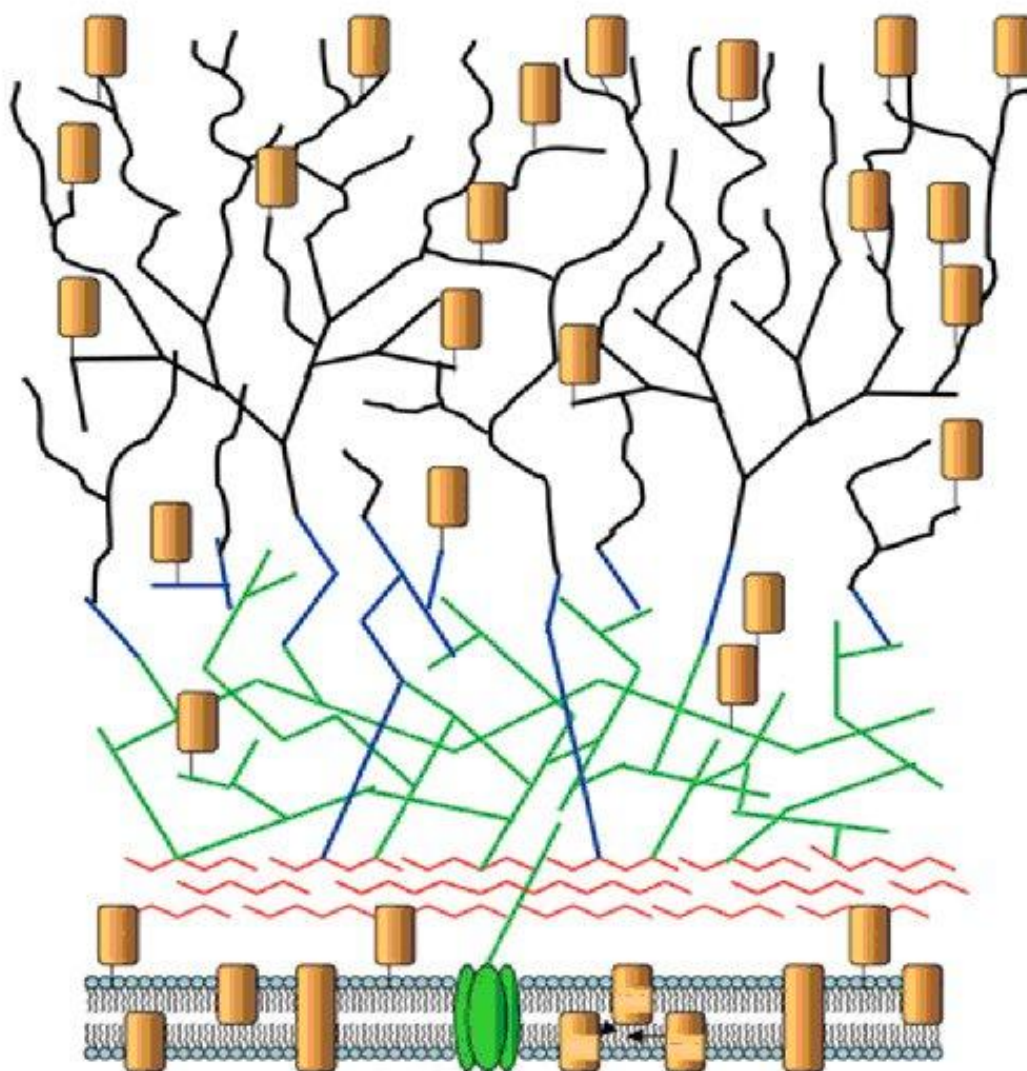


Figura 4. Diagrama esquemático da estrutura da parede celular de *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Os polissacarídeos da parede celular estão representados em diferentes cores: quitina (vermelho), β -1,3-glucanas (verde), β -1,6-glucanas (azul) e mananas (preto). As proteínas estão representadas por retângulos de cor laranja. As subunidades da β -1,3-glucanase sintase estão na membrana plasmática em verde. Figura adaptada de Pontón, 2008.

A camada mais externa da parede celular do *S. schenckii* consiste de um material microfibrilar amorfo, chamado de material capsular, que se desprende da superfície do fungo e fica livre no meio de cultura, por um processo conhecido como *shedding* (Lane *et al.*, 1969). Estudos recentes de nosso grupo demonstraram por microscopia eletrônica de transmissão que esse material microfibrilar amorfo está envolvido na adesão do fungo com células endoteliais do hospedeiro (Figueiredo *et al.* 2004).

A parede celular do *S. schenckii* consiste de uma camada externa fibrilar e um esqueleto interno. Esse esqueleto interno contém β -1,3-glucana, β -1,6-glucana e β -1,4-glucana, além de quitina (Previato *et al.*, 1979). Em relação à rede fibrilar pode-se inferir que a parede celular do *S. schenckii* é similar estruturalmente à de *C. albicans* e de *S. cerevisiae* (Klis *et al.*, 2006). Assim como em outros fungos patogênicos, foi descrita a presença de melanina na parede celular do *S. schenckii* que parece ter um papel protetor, pois esse pigmento funciona como um “removedor” de radicais livres (Romero-Martinez *et al.*, 2000; Morris-Jones *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2010).

Em 1971, uma peptídeo-ramnomanana foi isolada e purificada da parede celular da fase leveduriforme do *S. schenckii*, a partir de extratos obtidos por autoclavação das células intactas em tampão neutro (Lloyd & Bitton, 1971). Este glicopeptídeo continha 33,5% de ramnose, 57% de manose e 14,2% de proteína na sua composição básica, possuindo cadeias N- e O-glicosídicas, sendo estas últimas responsáveis pela reatividade deste glicopeptídeo com a lectina concanavalina A (Con A) (Travassos, 1989; Lopes-Alves *et al.*, 1992). Travassos e colaboradores, em 1977, utilizando marcação citoquímica com a lectina concanavalina A, observaram que esta reagia com componentes da parede celular do *S. schenckii*, sugerindo a localização deste glicopeptídeo mais externamente à parede celular. Em adição à ramnose e manose, polissacarídeos que contêm galactose também foram identificados na superfície do *S. schenckii* (Mendonça *et al.*, 1976; Mendonça-Previato *et al.*, 1980). Foi ainda observado que extrato da parede celular obtido segundo Lloyd & Bitton (1971) eram capazes de inibir a adesão do *S. schenckii* às proteínas da matriz extracelular, laminina e fibronectina, sugerindo a presença de adesinas na superfície deste patógeno (Lima *et al.*, 2001; 2004).

As glicoproteínas presentes na parede celular dos fungos pertencem a duas famílias, as GPI-CWPs e ASL-CWPs (Klis *et al.*, 2009). As GPI-CWPs são uma família de proteínas da parede celular denominada de proteínas dependentes de glicosilfosfatidilinositol, ou seja, ligadas a parede celular através de âncoras de GPI. Estas, por sua vez, ligam-se covalentemente às β -1,6-glucanas, que por fim se conectam a rede de β -1,3-glucanas. Parte

das proteínas GPI-CWP permanece ligada a membrana celular através da âncora glicolípídica. A maior parte das proteínas ligadas à parede celular pertence a esta família. No entanto, um grupo menor de proteínas se liga diretamente à rede de β -1,3-glucanas da parede celular dos fungos por ligações lábeis por álcali. Por esta razão, são denominadas de ASL-CWPs e incluem a família das Pir-CWPs. Enquanto as GPI-CWPs hipoteticamente estão presentes na camada mais externa da parede celular, as Pir-CWPs estão distribuídas uniformemente pela camada mais interna, seguindo o padrão de distribuição das β -1,3-glucanas (Klis *et al.*, 2006). As adesinas de fungos que são bem conhecidas, de maneira geral, pertencem à família de GPI-CWPs como veremos adiante. No entanto, proteínas atípicas, como a GAPDH, também foram descritas com função de adesinas (Barbosa *et al.*, 2006).

Adesinas

A adesão de microorganismos a células e tecidos do hospedeiro representa um passo crucial no processo de infecção e colonização. Nesse sentido, patógenos desenvolveram ao longo da evolução mecanismos de invasão que envolve inúmeras moléculas e processos celulares associadas com estes mecanismos. Como já mencionado, traumas ou danos teciduais podem expor a matriz extracelular e, por isso, ela pode se configurar como substrato para microorganismos invasores. Vários estudos têm descrito a capacidade de interação entre fungos e proteínas matriciais, como fibronectina e laminina. Microorganismos patogênicos utilizam uma grande variedade de moléculas de superfície para se ligar a componentes da matriz extracelular e/ou serem internalizados, para se estabelecer uma infecção efetiva (Penn & Klotz, 1994; Klein, 1997; Calderone *et al.*, 2000; Sundstrom, 2002; Mendes-Giannini *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008).

Em bactérias os estudos da interação destes microorganismos com proteínas de matriz extracelular apresentaram significativos avanços na compreensão dos mecanismos de adesão tecidual. Dentre as adesinas de bactérias mais conhecidas estão um grupo de proteínas de *Staphylococcus aureus* conhecidas como proteínas ligantes a fibronectina (FnBPs) (Schwarzlinek *et al.*, 2003; Clarke & Foster, 2006). Outra proteína encontrada nesse patógeno, a Eap, tem a capacidade de se ligar a várias proteínas matriciais e possui papel imunomodulatório (Harraghy *et al.*, 2003). Em *Bacterioides fragilis* já foi descrita a presença de uma glicoproteína que medeia a interação desta bactéria com a laminina (Ferreira *et al.*, 2006). No espiroqueta *Leptospira interrogans* já foram descritas algumas moléculas de adesão a proteínas matriciais, como a Lsa21 (*leptospiral surface adhesin*, 21 kDa) e a Lp95

(*leptospiral protein*, 95kDa) (Atzingen *et al.*, 2008; 2009). Além dessas, em *B. burgdorferi* foram identificadas e caracterizadas duas proteínas de membrana, a RevA e ErpX, que se ligam à fibronectina e laminina (Brissette *et al.*, 2009a; 2009b).

Em fungos já foi descrita uma gama de proteínas de adesão a proteínas da matriz extracelular (Tronchin *et al.*, 2008). Em *C. albicans*, uma família de genes que codifica adesinas que estão relacionadas à interação parasita-hospedeiro, família esta denominada de ALS (*agglutinin-like sequence*)(Fu *et al.*, 1998; Hoyer, 2001), tem sido extensivamente estudada. As proteínas Als possuem 300 resíduos de aminoácidos na região N-terminal, uma região rica em treonina com 104 resíduos, um domínio central com variável número de repetições *tandem* com seqüência de 36 resíduos, com predominância de treonina e uma região C-terminal altamente glicosilada, rica em serina/treonina (Gaur & Klotz, 1997; Hoyer *et al.*, 2008). Sabe-se que dois membros desta família (Als1p e Als5p), de pelo menos oito membros, estão envolvidos no processo de adesão de *C. albicans* e que o domínio de ligação está localizado na porção N-terminal das proteínas Als. Foi demonstrado que a adesina Als1p medeia a ligação de *C. albicans* a células endoteliais e epiteliais humanas, que a proteína Als5p liga-se às proteínas da matriz extracelular, fibronectina, colágeno e laminina (Sheppard *et al.*, 2004) e que a região de repetições *tandem* da Als5p é responsável pela ligação desta proteína à fibronectina (Rauceo *et al.*, 2006; Hoyer *et al.*, 2008).

Outros genes codificam moléculas com propriedades adesivas em fungos. Dentre eles está o ALA1 (*agglutinin-like adhesin*), que codifica uma proteína Ala1p, com seqüência bem semelhante à das adesinas da família Als de *C. albicans* e AG alpha1 de *S. cerevisiae* (Gaur & Klotz, 1997) sendo, por isso, também conhecida como Ala1p/Als5p (Gaur *et al.*, 2002). Outro gene descrito foi o HWP1 (*hyphal wall protein*), que codifica um receptor adesivo atuando como substrato para transglutaminase de células epiteliais humanas (Staab *et al.*, 1999; Staab *et al.*, 2004) e que atualmente é usado para diferenciar duas espécies de *Candida*, *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Romeo *et al.*, 2006). O gene EAP1 (*extracellular adherence protein*) codifica uma molécula envolvida na adesão a células epiteliais humanas e morfogênese, sendo sua expressão ativada por uma proteína quinase AMPc-dependente (Li & Palecek, 2003; 2005). Recentemente, foi descrito um gene denominado ECM33, que codifica uma proteína ligada à parede celular de *C. albicans* por âncoras de GPI, sendo responsável pela integridade da parede celular. A proteína Ecm33p não atua diretamente como uma adesina, mas é importante na adesão a células endoteliais e epiteliais do hospedeiro, pois a sua não expressão causa a localização anormal de adesinas, como Als1p, na parede celular de *C. albicans* (Martinez-Lopez *et al.*, 2006). Outro gene descrito, também em *C. albicans*, foi o CAMP65,

que codifica uma manoproteína, que possui propriedades adesivas e funciona como β -glucanase. Esta, também, envolvida na construção da parede celular da hifa e na virulência, parece ser alvo para o sistema imune (Sandini *et al.*, 2007). Em *C. glabrata*, foi descoberto o gene EPA1, que codifica uma proteína com características de lectina, pois adere a carboidratos de células epiteliais humanas, ligando-se especificamente a carboidratos que contém asialo-lactosil (Cormack *et al.*, 1999; Kaur *et al.*, 2005). No fungo dimórfico, *B. dermatitidis*, a adesina BAD1 (Blastomyces adhesin 1) contribui para sua patogenicidade por também estar envolvida na modulação da resposta imune do hospedeiro (Wuthrich *et al.*, 2006).

Ala1p/Als5p, Als1p e Hwp1p estão ligados a β -1,6-glucanas da parede celular do *C. albicans* (Sundstrom, 1999) assim como Epa1p de *C. glabrata*. Estas proteínas, juntamente com a Eap1p e Ecm33p de *C. albicans*, pertencem à família de GPI-CWPs (Sundstrom, 2002; Frieman *et al.*, 2002; Li & Palecek, 2003; Martinez-Lopez *et al.*, 2006).

Vários autores demonstraram a importância de glicoproteínas GPI ancoradas à parede celular para a viabilidade de alguns fungos, pois mutações ou restrições na síntese de GPI podem ser letais ou causar aberrações na parede levando a limitações do crescimento do fungo (Lipke & Ovalle, 1998). Foi descrita, por Teparic e colaboradores (2004), a importância de manoproteínas GPI ancoradas para viabilidade de leveduras de *S. cerevisiae* sob diferentes condições. Sabe-se também que a deleção do gene ROT1 altera a morfologia da parede de *S. cerevisiae* impedindo a ligação de manoproteínas GPI ancoradas à parede celular (Machi *et al.*, 2004). Em *C. albicans*, foram descritas também aspártico proteases com atividade adesiva ligadas por âncora de GPI à parede celular (Albrecht *et al.*, 2006). Recentemente, foram descritas, na parede celular do fungo *Cryptococcus neoformans*, glicoproteínas GPI ancoradas e, entre elas, uma metaloprotease similar à metaloprotease elastinolítica do *Aspergillus fumigatus*, o que confirma a habilidade proteolítica extracelular do *C. neoformans* (Eigenheer *et al.*, 2007). Estes dados revelam a importância das âncoras de GPI no ancoramento de várias proteínas ligadas à virulência de fungos.

Além das GPI-CWPs, outras famílias de proteínas de superfície também já foram descritas como adesinas. Curiosamente, uma enzima característica de via glicolítica, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), foi demonstrada como um componente da parede celular de *C. albicans* na função de adesina para fibronectina e laminina (Gozalbo *et al.*, 1998). Esta proteína foi também descrita na parede celular do fungo *P. brasiliensis* tendo atividade adesiva para as proteínas da matriz extracelular, fibronectina, laminina e colágeno tipo I (Barbosa *et al.*, 2006). Outra proteína presente tanto na parede quanto em

compartimentos citoplasmáticos, a triosefosfato isomerase também foi descrita como proteína ligante, preferencialmente, à laminina (Pereira *et al.*, 2007). Na parede celular do fungo *A. fumigatus*, foi descrita uma adesina do tipo lectina, que se liga especificamente a resíduos de ácido siálico presentes nas glicoproteínas da matriz extracelular (Tronchin *et al.*, 2002).

Em 1999, Lima e colaboradores descreveram que a fase de levedura e conídios do fungo *S. schenckii* ligava-se ao colágeno tipo II, fibronectina e a laminina imobilizados (Lima *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado que a adesão à fibronectina era modulada positivamente por Ca^{2+} e independente do domínio RGD. Posteriormente, foi observado que fibronectina e a laminina na forma solúvel (não polimerizada) ligavam-se especificamente às células leveduriformes do *S. schenckii*, sendo a ligação aos conídios pouco relevante. Uma redução de 50% e 38% na adesão foi observada em ensaios de inibição com os peptídeos RGD e YIGSR da fibronectina e da laminina, respectivamente, e uma significativa inibição da adesão por extratos da parede celular do fungo (Lima *et al.*, 2004). Paralelamente, foi demonstrado que células leveduriformes do *S. schenckii* aderem a monocamadas endoteliais, sendo esta interação modulada positivamente por citocinas (Figueiredo *et al.*, 2004). O aumento na adesão do *S. schenckii* à monocamada de células endoteliais induzida pela citocina TGF- β 1 é resultado do aumento da exposição da matriz extracelular subendotelial, por formação de fibras de estresse e retração causado por esta citocina (Figueiredo *et al.*, 2007). A TGF- β 1 aumenta a migração transendotelial do *S. schenckii* pela via paracelular, ou seja, através da interação deste com as proteínas da matriz extracelular subendotelial exposta. Ensaios utilizando anticorpos anti-laminina e anti-fibronectina demonstraram que estes inibem a transmigração endotelial do fungo que utiliza a via paracelular (Figueiredo *et al.*, 2007).

Embora, a interação de *S. schenckii* a proteínas matriciais tenha sido descrita, as adesinas responsáveis por essa interação ainda são desconhecidas. Recentemente, foram descritas glicoproteínas que possuem resíduos de manose e glicose e que participam da adesão a células epiteliais (Sandoval-Bernal *et al.*, 2010). Em 2008, foi observado que uma proteína de 70 kDa (gp70), isolada do filtrado de cultura e também presente na superfície do *S. schenckii*, tem papel imunomodulador. O anticorpo monoclonal P6E7, contra a gp70, foi capaz de proteger camundongos contra a infecção por *S. schenckii*. A análise da seqüência peptídica desta proteína mostrou significativa homologia com uma proteína de 89 kDa de *Pneumocystis carinii*, conhecida como msg 110 (*major surface glycoprotein 110*), família de proteínas que alguns autores descrevem como tendo função adesiva a células epiteliais (O’Riordan *et al.*, 1995; Beck *et al.*, 1998; Walzer, 1999). Por fim, Nascimento e

colaboradores (2008) demonstraram que a gp70 tem função adesiva tanto para fibronectina quanto para laminina. Paralelamente, outro grupo apresentou evidências da existência de uma adesina de 70 kDa na parede celular de *S. schenckii* que medeia a interação do fungo a derme isolada da cauda de camundongos. O soro policlonal produzido contra esta proteína reduziu a adesão do fungo a matriz extracelular dérmica. No entanto, a proteína não foi caracterizada na parede celular (Ruiz-Baca *et al.*, 2009).

Neste trabalho, visamos dar continuidade a estes estudos identificando e caracterizando adesinas para fibronectina na superfície do *S. schenckii*. Buscam, também, correlacionar a expressão de adesinas na superfície com a virulência de diferentes isolados clínicos.

1 OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram identificar e caracterizar moléculas de superfície do patógeno *S. schenckii* envolvidas em sua interação com o hospedeiro e analisar diferenças fenotípicas entre espécies e isolados do denominado complexo *Sporothrix*.

Considerando os dados anteriores do nosso grupo relativos à virulência da fase de levedura do *S. schenckii* e sua capacidade de interagir com a fibronectina, bem como a identificação de duas espécies do gênero *Sporothrix* entre os isolados clínicos disponíveis na micoteca do Laboratório de Micologia Celular Proteômica, que vinham sendo estudados neste projeto, tivemos por objetivos específicos:

- 1 – Avaliar a correlação entre a virulência e a capacidade adesiva a fibronectina da fase leveduriforme (infectiva) de diferentes isolados do *S. schenckii*.
- 2 – Caracterizar e identificar adesinas para fibronectina na superfície celular, presentes em diferentes isolados deste fungo.
- 3 – Relacionar virulência ao genótipo de cepas, utilizando duas espécies do complexo *Sporothrix*, *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, identificadas entre os isolados estudados.
- 4 – Analisar aspectos morfológicos da fase miceliana (microcultivo) e da fase leveduriforme dos isolados de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* por microscopia eletrônica de varredura.
- 5 – Estudar a localização subcelular e a expressão diferencial de uma adesina de aproximadamente 70 kDa em isolados de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* através de técnicas imunocitoquímicas utilizando um anticorpo monoclonal mAbP6E7 contra o exoantígeno gp70 de *S. schenckii*.
- 6 – Identificar a adesina gp70 em extratos de parede celular de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* utilizando técnicas de *Western immunoblot*.

4 DISCUSSÃO

A esporotricose, micose causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, apresenta várias manifestações clínicas. Essas formas clínicas podem ocorrer em decorrência de alterações no grau de imunidade do hospedeiro ou de fatores intrínsecos ao patógeno (Tachibana *et al.*, 1998). Esses fatores microbianos causam danos às células e tecidos do hospedeiro e são conhecidos como fatores/reguladores de virulência. Já foram identificados e caracterizados diversos tipos de fatores de virulência em fungos e em bactérias, como por exemplo, adesinas, proteases e melanina (Hogan *et al.*, 1996). No entanto, esses fatores intrínsecos de cada isolado podem ser responsáveis pelo aparecimento de variações nas formas clínicas de uma doença, como na esporotricose, onde os fatores de virulência do fungo ainda permanecem pouco conhecidos. Fatores de virulência podem ser alvos potenciais para o desenvolvimento de terapias capazes de impedir a disseminação e colonização por microorganismos patogênicos. O presente estudo teve como foco relacionar a virulência, em modelo murino de esporotricose sistêmica, à capacidade adesiva e à expressão diferencial de adesinas para fibronectina em isolados de *S. schenckii* de diferentes regiões, de distintos hospedeiros e respectivas formas clínicas. Além disso, tivemos por objetivo analisar diferenças fenotípicas entre espécies e isolados do denominado complexo *Sporothrix*, pelo fato de duas novas espécies com importância clínica, além de *S. schenckii strictu sensu*, terem sido propostas e confirmadas como agentes etiológicos da esporotricose (Marimon *et al.*, 2007; Madrid *et al.*, 2009).

Na primeira etapa deste estudo a virulência de isolados do *S. schenckii*, em modelo murino de esporotricose disseminada, foi comparada quantitativamente à capacidade adesiva à fibronectina, em continuidade ao trabalho anteriormente desenvolvido (Teixeira, 2007). Para isso, células de levedura dos isolados clínicos coletados de pacientes com esporotricose extracutânea (IPEC 15383, IPEC 17943), linfocutânea (1099-18), e um isolado coletado de ambiente (residência em área endêmica) (FMR 8337) foram inoculados em camundongos isogênicos C57BL/6. Curvas de sobrevivência e contagem de unidades formadoras de colônias no baço, pulmões, fígado e rins dos animais infectados foram realizadas para confirmar os dados de mortalidade e compararmos o grau de virulência de cada isolado. Os resultados obtidos corroboraram dados preliminares anteriores e mostraram que os isolados mais virulentos estavam associados a pacientes com as formas extracutânea e linfocutânea

(IPEC 15383 e 1099-18, respectivamente). Em ordem decrescente de virulência, seguiu-se o isolado ambiental (FMR 8337). Esses 3 isolados causaram 100% de mortalidade ao camundongos no período de 17, 29 e 43 dias de infecção, respectivamente, dado compatível com a carga fúngica determinada no baço, pulmões, fígado e rins dos animais infectados. Em contrapartida, o isolado coletado de um paciente HIV positivo com esporotricose extracutânea (IPEC 17943), mostrou-se avirulento em modelo murino, já que não causou morte em nenhum camundongo infectado em até 45 dias pós-infecção. De acordo, este isolado apresentou um padrão de disseminação distinto daquele observado para os isolados mais virulentos, já que foi observado um número reduzido de leveduras nos órgãos (baixa carga fúngica), o aparecimento de lesões articulares nas patas dianteiras e traseiras, e lesões nodulares na cauda dos animais. Além disso, os animais apresentaram remissão espontânea em até 120 dias, sem sequelas. Sovenhi (2009), estudando 151 isolados brasileiros de diferentes regiões e fontes, também observou que isolados originários de uma mesma forma clínica apresentavam graus de virulência distintos em modelo animal. Esses dados mostram que isolados de formas clínicas mais graves nem sempre são os mais virulentos experimentalmente, sugerindo que o grau de virulência deste fungo varia dependendo tanto dos fatores intrínsecos da cepa quanto das condições imunológicas do hospedeiro, não havendo clara correlação entre a virulência e a origem clínica do isolado.

Outros estudos vão de encontro aos resultados obtidos nesta tese. Kong e colaboradores (2006) mostraram que isolados provenientes de indivíduos com esporotricose linfocutânea ou cutânea fixa não eram capazes de levar a óbito os camundongos infectados, enquanto que os animais inoculados com isolados provenientes da forma disseminada sucumbiam em até 10 dias. Da mesma forma, Tachibana e colaboradores (1998) observaram relação entre virulência e origem clínica do isolado. Este grupo demonstrou a incapacidade de isolados cutâneos em estabelecer infecção sistêmica em animais inoculados pela via endovenosa. O desenvolvimento de infecção sistêmica só foi observado quando os animais foram infectados por isolados do *S. schenckii* obtidos a partir de lesões pulmonares de pacientes. Em seguida, foi demonstrado que isolados termo-intolerantes não eram capazes de disseminar para órgãos viscerais de animais inoculados pela via subcutânea, ficando restritos aos pontos de inoculação (Tachibana *et al.*, 2001). Brito e colaboradores (2007) compararam a virulência de dois isolados obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas da

esporotricose e mostraram que o isolado obtido da forma disseminada tinha maior capacidade infectiva do que o isolado obtido da forma linfocutânea, em camundongos inoculados pela via subcutânea. Os autores associaram essas observações a fatores intrínsecos de cada isolado que determinam a gravidade da infecção. Contrapondo todas estas observações, Nobre e colaboradores (2005) observaram que isolados oriundos de felinos com esporotricose cutânea apresentaram maior virulência em modelo murino do que aqueles isolados de felinos com esporotricose sistêmica.

Porém, não há ainda na literatura padronização de modelos de infecção experimental para o estudo da patogenicidade do *S. schenckii*. Cada centro de pesquisa utiliza um tipo de linhagem de camundongo, que conseqüentemente gera problemas na comparação dos diferentes níveis de susceptibilidade à infecção. Por esta razão, foram comparadas as curvas de mortalidade dos isolados 1099-18, IPEC 15383 e IPEC 17943, utilizando-se duas linhagens de camundongos (C57Bl/6 e BALB/c), não sendo observada diferença no perfil de virulência relativa de cada isolado nestes dois hospedeiros de distintas susceptibilidades à infecção. Outras variações entre os diferentes estudos são o tamanho do inoculo fúngico, as vias de infecção e fases morfológicas utilizadas (micélio ou levedura). Os critérios de análise utilizados (número de UFC, histopatologia, etc) também são verificadas em tempos diferentes no curso da infecção experimental. Todas estas diferenças experimentais dificultam a comparação entre os dados da literatura, impedindo assim discernir sobre as características em comum entre os isolados estudados e sua virulência.

A adesão de fungos aos tecidos do hospedeiro é considerada um requisito essencial para sua disseminação e, conseqüentemente, o estabelecimento de infecções sistêmicas (Pirofski & Casadevall, 2008; Tronchin *et al.*, 2008). Os modelos de estudo que tratam da interação de fungos com células ou tecidos do hospedeiro pode servir como ferramenta para o descobrimento de moléculas associadas à virulência e, conseqüentemente, indicar novos alvos para terapias antifúngicas. Moléculas da superfície de microrganismos patogênicos responsáveis pela interação destes com tecidos do hospedeiro podem ser alvos para o desenvolvimento de inibidores capazes de inibir a adesão inicial e impedir a conseqüente disseminação destes patógenos. Sabe-se que qualquer tipo de trauma ou dano ao tecido hospedeiro pode expor a matriz extracelular (Tronchin *et al.*, 2008). Por isso, a fibronectina, laminina e outras proteínas da matriz extracelular podem eventualmente servir de substrato potencial para a adesão de microrganismos patogênicos.

Como demonstrado previamente por nosso grupo, o *S. schenckii*, nas suas fases leveduriforme e miceliana, é capaz de interagir com a fibronectina imobilizada (Lima *et al.*, 1999). Já essa proteína solúvel liga-se preferencialmente à fase leveduriforme deste fungo, sendo esta ligação reduzida na presença do domínio RGD da fibronectina (Lima *et al.*, 2004). Foi demonstrado também que a interação com a matriz extracelular subendotelial é um passo crucial para a transposição da barreira endotelial pelo *S. schenckii* que utiliza uma via paracelular (Figueiredo *et al.*, 2004; 2007). Sabendo-se que o *S. schenckii* tem a capacidade de interagir especificamente com a fibronectina, ainda na primeira etapa deste trabalho, comparamos a interação dos quatro isolados do *S. schenckii* a esta proteína, visando relacionar a capacidade adesiva de cada isolado à sua patogenicidade.

Neste trabalho confirmamos dados anteriores mostrando que os quatro isolados estudados, independente de sua virulência têm a capacidade de interagir com a fibronectina de forma específica (Teixeira, 2007). Além disto, os dados quantitativos desta adesão mostraram que esta capacidade adesiva era distinta entre os isolados virulentos e avirulentos. O isolado que mostrou menor grau de patogenicidade (IPEC 17943), em modelo murino de esporotricose disseminada, foi a que apresentou menor capacidade adesiva a esta proteína da matriz extracelular, aferido por citometria de fluxo. Esses dados sugeriam que a virulência poderia estar relacionada em certo grau à capacidade adesiva do isolado à fibronectina, impactando na evolução da esporotricose sistêmica murina.

Dados similares foram publicados por diferentes grupos utilizando outros modelos, onde descreveram uma correlação positiva entre virulência e adesão de microorganismos patogênicos. Foi demonstrado que cepas da bactéria *Streptococcus agalactiae* que causam meningite aderem mais ao fibrinogênio do que as cepas avirulentas (Rosenau *et al.*, 2006). Em fungos, os isolados mais virulentos do *P. brasiliensis*, em modelo murino, apresentam maior capacidade adesiva a células epiteliais do que isolados menos virulentos (Hanna *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Conídios de espécies patogênicas do fungo *Aspergillus spp.* aderem significativamente mais à fibronectina e à lâmina basal intacta do que os conídios de espécies não patogênicas (Wasylnka & Moore, 2000). Recentemente, foi observado que a deleção da enzima AfMkk2, de *A. fumigatus*, causou diminuição da adesão deste fungo ao vidro e ao plástico, assim como da virulência, em modelo murino (Dirr *et al.*, 2010). Outra molécula do *A. fumigatus* importante na adesão e virulência é a proteína

MedA que, quando deletada, diminui a adesão ao plástico e a células epiteliais pulmonares e, conseqüentemente, a virulência demonstrada em modelo de infecção experimental (Gravelat *et al.*, 2010). Em *C. albicans*, a deleção da proteína ribossomal Asc1p causou a diminuição da adesão a células epiteliais e, conseqüentemente, da virulência desta mutante (Kim *et al.*, 2010).

Já foi descrita uma variedade de proteínas que medeiam à adesão a matriz extracelular, tanto em fungos quanto em bactérias. As proteínas Lsa21 e Lp95 foram descritas na bactéria *Leptospira interrogans*, como sendo responsáveis pela interação desta com proteínas matriciais (Atzingen *et al.*, 2008; 2009). Em *C. albicans*, foram descritos diversos genes, como ALS, HWP1 e EAP1, que codificam adesinas relacionadas com a interação deste fungo a células endoteliais, epiteliais e proteínas da matriz extracelular. (Rauceo *et al.*, 2006; Hoyer *et al.*, 2008; Staab *et al.*, 1999; 2004; Li & Palecek, 2003; 2005). Em *S. schenckii*, apesar de já se ter descrito a adesão à fibronectina, laminina e colágeno (Lima *et al.*, 1999; 2001; 2004), as adesinas responsáveis por essa interação permaneciam desconhecidas. Descrevemos a presença de uma adesina de 70 kDa do *S. schenckii* que foi sequenciada por homologia com outras espécies do reino Fungi (Nascimento *et al.*, 2008 – ver anexos). Nossos dados demonstraram que esta adesina é expressa na superfície de diferentes isolados deste fungo (Teixeira *et al.*, 2009 – ver anexos).

Em 2008, foi observado que a proteína de 70 kDa (gp70) isolada do filtrado de cultura do *S. schenckii* possuía, após análise da seqüência peptídica, significativa homologia com uma proteína de 89 kDa de *Pneumocystis carinii*, conhecida como msg 110 (*major surface glycoprotein* 110), da família de proteínas que alguns autores descrevem como tendo função adesiva a células epiteliais (O’Riordan *et al.*, 1995; Beck *et al.*, 1998; Walzer, 1999). Paralelamente, outro grupo demonstrou a existência de uma proteína de 70 kDa na parede celular de *S. schenckii* que mediava a interação deste fungo à derme isolada da cauda de camundongos. No entanto, esta glicoproteína não pode ser identificada e caracterizada, por apresentar bloqueio do N-terminal. O soro policlonal produzido contra esta proteína reduziu a adesão do fungo à matriz extracelular dérmica (Ruiz-Baca *et al.*, 2009). Recentemente, foram descritas cinco glicoproteínas, com massas moleculares de 190, 180, 115, 90 e 80 kDa, que participam da adesão de *S. schenckii* a células epiteliais (Sandoval-Bernal *et al.*, 2010).

Após comparar a virulência com a capacidade adesiva das leveduras dos quatro isolados de *S. schenckii*, procuramos identificar as adesinas para fibronectina nos

extratos de parede celular desses isolados. Um padrão de bandeamento proteico distinto foi observado nas análises por SDS-PAGE dos extratos de parede celular. As análises por *Western-Blot* revelaram várias potenciais adesinas para fibronectina. Além disso, foi observado que o padrão de expressão destas adesinas variou entre os isolados. Padrão similar de adesinas foi observado nos isolados mais virulentos (IPEC 15383 e 1099-18), com cinco bandas majoritárias, correspondentes às massas moleculares de 92, 70, 55, 44 e 37 kDa. O isolado ambiental (FMR 8337) apresentou três bandas positivas de 152, 67 e 50 kDa, enquanto que o isolado considerado avirulento (IPEC 17943) apresentou apenas uma banda positiva para fibronectina com massa molecular de 67 kDa.

Foi então verificada se as bandas positivas para fibronectina com massa molecular entre 67-70 kDa correspondiam à proteína adesiva gp70. Também fomos verificar se esta adesina era expressa na superfície celular dos diferentes isolados do *S. schenckii*. Para isso utilizamos o anticorpo monoclonal P6E7 que reconhece uma adesina putativa, gp70, isolada do filtrado de cultura deste fungo (Nascimento *et al.*, 2008). Esse anticorpo foi utilizado nos ensaios de *Western-blot* com extratos da parede celular, sendo observado que todos os isolados expressavam a proteína gp70. Curiosamente, nos extratos de parede celular dos isolados FMR 8337 e IPEC 17943 esta proteína positiva para o anticorpo P6E7 apresentava uma massa molecular ligeiramente inferior (67 kDa) à da proteína originalmente purificada (controle positivo). A ocorrência de modificações pós-traducionais poderia explicar essa diferença de massa molecular entre as proteínas reconhecidas pelo anticorpo P6E7 nos diferentes isolados deste fungo. A hipótese, dado a diferença de massa observada de 3 kDa, sugere que poderia ter ocorrido proteólise de pequenas sequências peptídicas ou poderia ocorrer variações no grau e/ou no tipo de glicosilação destas adesinas. Para comprovar essa hipótese, tentamos purificar a gp70 dos quatro isolados por cromatografia de afinidade, utilizando então técnicas proteômicas (MS/MS) para analisar comparativamente as sequências desta proteína purificada dos diferentes isolados. Para isso o anticorpo P6E7 foi acoplado a uma coluna de sepharose 4B-CNBR e os extratos de parede celular nela aplicados. Após a eluição da gp70, foram realizados ensaios controle de *Western blot* para confirmar a purificação desta proteína. Foi observado que o eluato apresentava-se contaminado pelo anticorpo monoclonal. Esta contaminação foi confirmada pelos espectros de massas das bandas excisadas e digeridas a partir de géis de SDS-PAGE, que indicavam a presença de uma imunoglobulina murina (dados não mostrados). Estes

ensaios deverão ser repetidos em condições em que não haja instabilidade de ligação do anticorpo a resina.

A presença da gp70 na superfície do *S. schenckii* foi confirmada por microscopia confocal. Para isso foi testada a interação do anticorpo P6E7 com o isolado (M64) do qual originalmente foi purificado o exoantígeno gp70. Foi observada fluorescência na superfície celular deste e dos isolados IPEC 15383 e IPEC 17943. Em todos os isolados, foi observado um padrão distribuição homogêneo desta proteína na superfície da fase de levedura (parasitária). Curiosamente, no isolado controle M64 (Figura 11) a microscopia permitiu observar regiões na superfície onde ocorria um acúmulo da gp70, correspondente a áreas de polarização das células de levedura (cicatrices de brotamento). Este dado, ainda que preliminar, sugere que esta proteína possa participar de mecanismos envolvidos no rearranjo molecular da parede celular, em decorrência de algum processo fisiológico destas células como, por exemplo, processo de brotamento e citocinese. Em *C. albicans*, já foi visto que a adesina Als1p se distribui de maneira heterogênea pela superfície das leveduras e hifas. Foi observado que esta adesina está praticamente ausente na superfície das leveduras progenitoras, sendo encontrada, porém, de forma homogênea, na parede das leveduras jovens com exceção da cicatriz de brotamento. Nos tubos germinativos e hifas, a Als1p encontra-se localizada próxima ao corpo celular em processo de germinação (Coleman *et al.*, 2010). Já a adesina Als3p, da mesma família de proteínas, encontrava-se distribuída ao longo da parede celular do tubo germinativo, com exceção do corpo celular (Coleman *et al.*, 2009; Beucher *et al.*, 2009).

A co-localização da gp70 com uma proteína de ligação para fibronectina foi investigada por microscopia confocal, sendo confirmada nos dois isolados estudados. Além disto, estes resultados corroboram os dados de *Western blot* que revelaram mais de uma banda positiva para fibronectina no isolado IPEC 15383. A observação de áreas na superfície das leveduras deste isolado com fluorescência positiva para fibronectina, mas negativa para o anticorpo P6E7, sugere fortemente que neste isolado ocorre a expressão de outras adesinas para fibronectina, além da gp70. Apesar de nos ensaios de *Western blot* apenas uma banda de 67 kDa ter sido revelada no extrato de parede celular do isolado IPEC 17943, pequenas áreas negativas para o anticorpo mas positivas para fibronectina foram observadas na superfície das leveduras deste isolado. A hipótese é de que outras adesinas possam ter uma baixíssima expressão neste isolado, porém não estão completamente ausentes, o que só poderá ser confirmado com o desenvolvimento

de anticorpos monoespecíficos contra as demais adesinas observadas. Esses dados consolidam a hipótese de que isolados mais virulentos tem maior capacidade adesiva, sugerindo uma correlação direta entre virulência e expressão de adesinas na superfície deste fungo.

Na última década, vários estudos têm agrupado o *S. schenckii* em um complexo de espécies crípticas, denominado complexo *Sporothrix*. Existem três conceitos básicos para definição de espécie: o conceito fenético, onde as espécies são definidas baseadas nas características morfológicas, o conceito biológico, que define as espécies pela troca gênica (reprodução sexual), e o conceito filogenético, que se baseia nas características genotípicas para definir as espécies.

O conceito fenético é pouco válido para o complexo *Sporothrix* por este incluir espécies crípticas (Castro, 2010). No entanto, distintas características fenotípicas têm sido propostas na distinção entre as espécies, como metabolização de sucrose, rafinose e ribitol (Marimon et al. 2007). O conceito biológico também não é válido para este fungo devido ao desconhecimento da sua fase sexuada. No entanto, dados recentes do nosso grupo sugerem a alta possibilidade de recombinação gênica neste fungo (Marcus Teixeira, comunicação pessoal). Portanto, o agrupamento do complexo *Sporothrix* se dá com base em diferenças filogenéticas encontradas em algumas regiões do genoma de isolados provenientes de diversos nichos. Porém, a análise filogenética deste fungo é dificultada pelo fato do táxon *S. schenckii* não possuir seu genoma descrito na literatura, encontrando-se apenas alguns genes descritos (Chua et al., 1994; Kanbe et al., 2005; Valle-Aviles et al., 2007). Em 2006, Marimon e colaboradores realizaram estudo molecular de 60 isolados de *S. schenckii* e descreveram três grandes ramos, que agrupavam estes isolados em europeus, brasileiros e sul-americanos/africanos. Em seguida, o mesmo grupo (Marimon et al., 2007) propõe a criação de três novas espécies, baseando-se em estudos da variabilidade do gene da calmodulina e de aspectos fenotípicos. As novas espécies propostas são *S. brasiliensis*, *S. globosa*, e *S. mexicana*. Em 2008, De Meyer e colaboradores, baseados em análises dos loci ITS e β -tubulina, propuseram a criação de mais três novas espécies no chamado complexo *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii*, as espécies *S. stylites*, *S. humicola* e *S. lignivora*.

Em trabalho recente de nosso grupo, onde foram comparados 12 isolados zoofílicos, antropofílicos e geofílicos, foi revelado, pela análise dos loci calmodulina e ITS, que nossos isolados se agrupavam em clados de duas espécies, *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, como ilustra a Figura 5, extraída de Castro (2010). Pode ser observado que

o isolado avirulento (IPEC 17943) em modelo murino, tratava-se, na realidade, da espécie *S. brasiliensis*. Sendo assim, com a intenção de verificarmos se o genótipo explicaria as diferenças observadas no padrão de virulência e na expressão de adesinas que descrevemos no isolado IPEC 17943 (Teixeira *et al*, 2009), nossos objetivos subseqüentes foram comparar a virulência, os aspectos morfológicos e a expressão da adesina gp70 entre isolados da espécie *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. Para isso, passamos a estudar dois isolados do *S. schenckii* (1099-18 e IPEC 15383) e os dois isolados disponíveis de *S. brasiliensis*, um isolado clínico de esporotricose felina (5110) e o isolado IPEC 17943. Embora o isolado FMR 8337 tenha sido originalmente classificado como *S. brasiliensis* (Marimon *et al.*, 2007), optamos por não incluí-lo nesta etapa do estudo por termos obtido dados de genotipagem preliminares que indicavam se tratar de *S. schenckii strictu sensu* (Figura 5). No entanto, a repetição dos estudos genotípicos para confirmação dos dados de todos os isolados analisados confirmou sua classificação original como *S. brasiliensis*.

Os ensaios de virulência com essas duas espécies mostraram que ambos os isolados de *S. schenckii* apresentam alta virulência, em camundongos das linhagens BALB/c e C57Bl/6. Surpreendentemente, os isolados de *S. brasiliensis* apresentaram graus de virulência completamente distintos. Enquanto o isolado 5110 mostrou-se altamente virulento, como os dois isolados de *S. schenckii*, o isolado IPEC 17943 mostrou-se avirulento, incapaz de levar a óbito os camundongos infectados da linhagem BALB/c, tal qual observado para C57Bl/6. Arrillaga-Moncrieff e colaboradores (2009), estudando diferenças de virulência entre espécies do complexo *Sporothrix*, descreveram que a espécie *S. brasiliensis* é a mais virulenta em modelo murino, seguida da *S. schenckii* e *S. globosa*. Kong e colaboradores (2006), ao compararem características genotípicas à virulência de 15 isolados oriundos de pacientes com diferentes formas clínicas da esporotricose, observaram que os isolados com maior capacidade infectiva eram provenientes das formas mais graves desta doença e pertenciam a clados distintos daqueles com menor virulência. Liu e colaboradores (2003), estudando 24 isolados de esporotricose disseminada, cutânea fixa e linfocutânea, coletados da América, no Japão e na China, encontraram relação entre o genótipo e a forma clínica. Nossos dados vão de encontro aos resultados desses dois autores, pois não observamos relação entre a virulência em modelo murino e o genótipo, tampouco com a forma clínica.

Outros autores obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo. Mesa-Arango e colaboradores (2002), estudando diferenças genéticas em 44 isolados

oriundos de casos de esporotricose linfocutânea e cutânea fixa, não observaram qualquer correlação entre a manifestação clínica e genótipo dos isolados. Em outro estudo realizado com 43 isolados das Américas do Sul e Central, Europa e África, oriundos de pacientes com diferentes formas clínicas da esporotricose, não foi observada correlação entre o genótipo e a forma clínica da doença (Neyra, *et al.*, 2005). Galhardo e colaboradores (2008) analisaram geneticamente um total de 88 isolados brasileiros e espanhóis, sendo 59 isolados clínicos do Estado do Rio de Janeiro. Não observando relação entre o genótipo e a manifestação clínica da esporotricose.

Em 2007, Marimon e colaboradores demonstraram uma clara correlação entre os dados moleculares e os aspectos morfológicos das diferentes espécies do complexo *Sporothrix*. Estes autores observaram que os isolados de *S. brasiliensis* apresentavam conídios sésseis globosos com 2,5 a 5 μm de comprimento por 2 a 3 μm de largura e conídios simpodiais ovais com 2 a 6 μm de comprimento por 1 a 4 μm de largura. Nossos resultados vão de encontro a esses dados, pois mostram que um dos isolados de *S. brasiliensis* (IPEC 17493) apresentou conídios predominantemente simpodiais, enquanto o outro (5110) mostrou os dois tipos de crescimento conidial. Ambos os isolados apresentaram conídios sésseis e simpodiais ovais. Observamos também que o isolado IPEC 17943 apresentou área conidial de $3,07 \pm 0,61 \mu\text{m}^2$, significativamente menor que a área conidial do outro isolado da mesma espécie (5110), que foi de $3,81 \pm 0,58 \mu\text{m}^2$. Marimon e colaboradores (2007), descreveram que os conídios de *S. schenckii* são predominantemente sésseis e triangulares. Neste trabalho, foi observado que os conídios de *S. schenckii* eram ovais alongados, apresentando-se como sésseis no isolado 1099-18 e simpodiais no IPEC 15383. Dados de microcultivos de nosso grupo, em que foram comparados 12 isolados do complexo *Sporothrix*, corroboram nossas observações indicando que estes e outros isolados de *S. schenckii* podem apresentar as duas formas de conidiação (Castro, 2010). Os isolados 1099-18 e IPEC 15383 apresentaram áreas conidiais de $2,78 \pm 0,36$ e $2,86 \pm 0,59 \mu\text{m}^2$, respectivamente, sendo estatisticamente iguais. Observamos, no entanto, que os conídios de *S. brasiliensis* são maiores que os conídios de *S. schenckii*. Além disso, foi visto que a área conidial do isolado felino, 5110, era significativamente maior que a dos outros três isolados antropofílicos. Dado semelhante foi observado por Fernandes e colaboradores (2009), que mostraram que a área conidial de isolados zoofílicos é maior que a de isolados humanos.

Avaliamos também a morfologia das leveduras das espécies *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. Observamos que os isolados 1099-18 e IPEC 15383 de *S. schenckii* apresentavam leveduras alongadas com áreas, estatisticamente iguais, de $4,18 \pm 2,03$ e $4,60 \pm 1,44 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Já os isolados de *S. brasiliensis* IPEC 17943 e 5110 apresentavam leveduras alongadas e ovais, com áreas estatisticamente distintas, de $3,38 \pm 1,53$ e $4,28 \pm 1,16 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Ao contrário do reportado por Marimon e colaboradores, nossos dados não mostram relação entre o genótipo e caracteres morfológicos.

As análises morfológicas da superfície celular das leveduras das duas espécies demonstraram que os isolados de *S. schenckii* apresentam padrões morfológicos semelhantes, com superfície bastante irregular, sugestiva de densa camada externa microfibrilar amorfa, com fragmentação e descamação da parede celular, como anteriormente descrito (Lane *et al.*, 1969; Garrison *et al.*, 1975). Já os isolados de *S. brasiliensis* mostraram leveduras com aspectos de topografia da superfície celular, bem distintas entre si, apresentando a levedura do isolado 5110 aspecto da superfície similar ao das leveduras de *S. schenckii*, enquanto que o isolado IPEC 17943 apresentou leveduras com superfície mais lisa, sugerindo camada externa microfibrilar amorfa menos espessa. Além disto, a camada mais externa da parede das leveduras apresentou fraturas, ou descamação (áreas com descontinuidade da parede celular), processo este conhecido como *shedding*, já descrito anteriormente neste fungo (Lane *et al.*, 1969; Benchimol *et al.*, 1979). De acordo com estas observações, em estudo paralelo sobre a expressão de melanina induzida por compostos fenólicos utilizando a cepa 1099-18, observamos a liberação de grande quantidade de material amorfo oriundo da camada mais externa da parede celular, por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 19). Estas observações nos levaram à hipótese de que o isolado IPEC 17943 possa realizar um processo de *shedding* mais intenso, perdendo extensas áreas da parte mais externa da parede celular, como sugerem os dados antigos de ultraestrutura da parede celular deste fungo do final da década de 60 (Lane *et al.*, 1969).

As análises por microscopia eletrônica de transmissão revelaram também a presença de substância eletrondensa no estratos interiores da parede celular do isolado 1099-18. Em trabalho paralelo (Teixeira *et al.*, 2010; ver anexos), descrevemos que esses grânulos pigmentados se tratavam de melanina, cuja expressão era modulada dependendo da composição do meio de cultura, estando associada a mudanças no perfil de virulência da cepa. A expressão deste polímero encontrava-se aumentada quando o

fungo era cultivado em meio com disponibilidade de L-DOPA, sugerindo uma nova via de biossíntese de melanina alternativa a via de DHN anteriormente descrita (Romero-Martinez *et al.*, 2000; Morris-Jones *et al.*, 2003).

A expressão do antígeno gp70 na superfície celular das leveduras de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* foi estudada por técnicas imunocitoquímicas (microscopia eletrônica de varredura), sendo os resultados contrastados com os dados de *Western immunoblot* com o anticorpo P6E7. Observamos que ambos os isolados de *S. schenckii* e o isolado avirulento IPEC 17943 de *S. brasiliensis* expressavam, de forma homogênea, a proteína gp70 na parede celular. Em contrapartida, o isolado 5110 de *S. brasiliensis* praticamente não expressou esta proteína na parede celular. Para detectarmos a proteína nos experimentos de *Western*, foi necessário utilizar uma concentração três vezes maior de proteína que a utilizada para análise dos extratos dos demais isolados, indicando que o resultado de microscopia eletrônica de varredura não se tratava de um artefato técnico com este isolado.

Sendo assim, foi observada uma relação inversa entre virulência e expressão de gp70, já que o isolado avirulento, em modelo murino, é o que mais expressa esta proteína como pode ser observado nos resultados de microscopia eletrônica de transmissão com o anticorpo P6E7 (Figura 21). Isso pode ser explicado pelas características imunomoduladoras desta proteína, uma vez que camundongos imunizados com o anticorpo anticorpo P6E7 antes, durante ou depois da infecção, tiveram uma significativa redução da carga fúngica nos órgãos viscerais (Nascimento *et al.*, 2008). Neste trabalho são propostas duas hipóteses que justificariam o caráter imunomodulador da gp70. A primeira é de que o anticorpo P6E7 estimularia as células-T a produzirem IFN- γ , e a segunda é de que este anticorpo poderia inibir a adesão do fungo na interação com tecidos ou a matriz extracelular. Na microscopia eletrônica de transmissão com anticorpo P6E7 observamos ainda a liberação de gp70 para o meio extracelular, no isolado avirulento (IPEC 17943). Além disso, pudemos relacionar a alta expressão e a liberação para o meio extracelular da gp70 pelo isolado IPEC 17943 com a sua baixa infectividade, já que esta glicoproteína em abundância parece proteger o hospedeiro da esporotricose. Portanto, a liberação desta proteína, com caráter protetor, durante a infecção, ajudaria o sistema imune do hospedeiro a reconhecer este microrganismo invasor e a eliminá-lo, cessando a infecção.

Sendo assim, a baixa expressão desta glicoproteína na superfície parece ajudar o isolado zoofílico, 5110, a se “esquivar” do sistema imune do hospedeiro,

consequentemente, permitindo o estabelecimento da infecção. Apesar da gp70 funcionar também como adesina, e a expressão de adesinas ser um fator crucial para o desenvolvimento da infecção, a ausência da gp70 na superfície do isolado 5110 não diminui a sua capacidade adesiva, já que este expressa outras adesinas para fibronectina e laminina, que não a gp70 (Castro, 2010).

Os dados apresentados neste estudo revelam que a determinação das características morfológicas, dos fatores de virulência e a relação com as diferenças genotípicas de isolados do complexo *S. schenckii* são complexas. Não foi observada qualquer relação entre patogenicidade e as características fenotípicas dentre os cinco isolados e espécies estudadas. Porém, observamos neste trabalho uma correlação entre virulência, capacidade adesiva e o tipo/expressão de adesinas na superfície do patógeno. No entanto, para serem conclusivos destacamos a necessidade de serem estudados os aspectos aqui abordados em mais isolados de cada espécie, bem como em avançarmos nos estudos moleculares. Neste sentido, nosso grupo em colaboração com outros laboratórios da Rede Genoma Nacional está sequenciando o genoma de duas cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.C.; WATT, F.M. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. **Development**, v. 117, p. 1183-1198, 1993.
- ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029–2035, 2004.
- AGUDELO, S.P.; RESTREPO, S.; VELEZ, I.D. Cutaneous new world leishmaniosis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. **J Am Acad Dermatol**, v. 40, p. 1002-1004, 1999.
- ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICOVA, I.; NAGLIK, J.R.; SCHALLER, M.; DE GROOT; MACCALLUM, D.; ODDS, F.C.; SCHAFER, W.; KLIS, F.; MONOD, M.; HUBE, B. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **J Biol Chem**, v. 281, p. 688-694, 2006.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; FIALHO MONTEIRO, P.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes Infect**, v. 11, p. 554-62, 2009.
- AL-TAWFIQ, A.J.; WOOLS, K.K. Disseminated Sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* Fungemia as the Initial Presentation of Human Immunodeficiency Virus Infection **Clin Infect Dis**, v. 26, p. 1403-1406, 1998.
- ALVIANO, D.S; FRANZEN, A.J.; TRAVASSOS, L.R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUES, M.L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infec Immun**, v. 72, p. 229–237, 2004.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, p. 651-655, 2009.
- ATZINGEN, M.; BARBOSA, A.S.; BRITO, T.S.A.; VASCONCELLOS-MORAIS, Z.M.; LIMA, D.M.C.; ABREU, P.A.E.; NASCIMENTO, A.L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 70, 2008.
- BALLOU, C.E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **J Biol Chem**, v. 245, p. 1197-203, 1970.
- BARBOSA, M.S.; BAO, S.N.; ANDREOTTI, P.F.; DE FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell

surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun**, v. 74, p. 382-389, 2006.

BARKER, B. M., JEWELL, K. A., KROKEN, S. & ORBACH, M. J. The population biology of *Coccidioides* epidemiologic implications for disease outbreaks. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1111, p. 147-163, 2007.

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

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.O.; GALHARDO, M.C.; SCHUBACH, T.M.P.; REIS, R.S.; CONCEIÇÃO, M.J.; VALLE, A.C. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions – a report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, **Int J Dermatol**, v. 42, p. 677– 681, 2003.

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

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

BEARD, C. B., CARTER, J. L., KEELY, S. P., HUANG, L., PIENIAZEK, N. J., MOURA, I. N., ROBERTS, J. M., HIGHTOWER, A. W., BENS, M. S., FREEMAN, A. R., LEE, S., STRINGER, J. R., DUCHIN, J. S., DEL RIO, C., RIMLAND, D., BAUGHMAN, R. P., LEVY, D. A., DIETZ, V. J., SIMON, P., & NAVIN, T. R. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. **Emerg Infect Dis**, v. 6, p. 265-272, 2000.

BECK, J. M., PRESTON, A. M., WAGNER, J. G., WILCOXEN, S. E., HOSSLER, P., MESHNICK, S. R. PAINE, R. Interaction of rat *Pneumocystis carinii* and rat alveolar epithelial cells in vitro. **Am J Physiol**, v. 275, p. 118–125, 1998.

BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W.; TRAVASSOS, L.R. Distribution of anionic groups at the cell surface of different *Sporothrix schenckii* cell types. **Infect Immun**, v. 24, p. 912-9, 1979.

BEUCHER, B.; MAROT-LEBLOND, A.; BILLAUD-NAIL, S.; OH, S.H.; HOYER, L.L.; ROBERT, R. Recognition of *Candida albicans* Als3 by the germ tube-specific monoclonal antibody 3D9.3. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 55, p. 314-23, 2009.

BJELLQVIST, B., PASQUALI, C., RAVIER, F., SANCHEZ, J. C. & HOCHSTRASSER, D. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. **Electrophoresis**, v. 14, p. 1357–1365, 1993.

- BONIFAZ, A., VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. Sporotrichosis: an update. **G Ital Dermatol Venereol**, v. 145, p. 659-73, 2010.
- BOSMAN, F.T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J Pathol**, v. 200, p. 423-428, 2003.
- BOWMAN, S.M.; FREE, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, p. 799-808, 2006.
- BRANDHORST, T.T.; WUTHRICH, M.; WARNER, T.; KLEIN, B. Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. **J Exp Med**, v. 189, p. 1207-1216, 1999.
- BRISSETTE, C.A.; BYKOWSKI, T.; COOLEY, A.E.; BOWMAN, A.; STEVENSON, B. *Borrelia burgdorferi* RevA Antigen Binds Host Fibronectin. **Infect Immun**, v. 77, p. 2802-12, 2009a.
- BRISSETTE, C.A.; VERMA, A.; BOWMAN, A.; COOLEY, A.E.; STEVENSON, B. The *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein ErpX binds mammalian laminin. **Microbiology**, v. 155(3), p. 863-72, 2009b.
- BRITO, M.M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; RAIBOLT, P.S.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.P.; SCHÄFFER, G.M.; BORBA, C.M. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Med Mycol**, v. 45, p. 721-9, 2007.
- BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. Microbiologia médica. Guanabara Koogan (ed), Rio de Janeiro, 611 p, 2000.
- BUSTAMANTE, B.; CAMPOS P.E. Endemic sporotrichosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 14, p. 145-149, 2001.
- BUSTAMANTE, B.; CAMPOS P.E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 2, p. 85-94, 2004.
- BUZÁS, E.I.; GYÖRGY, B.; PÁSZTÓI, M.; JELINEK, I.; FALUS, A.; GABIUS, H.J. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 39(8), p. 691-704, 2006.
- CALDERONE, R.; SUZUKI, S.; CANNON, R.; CHO, T.; BOYD, D.; CALERA, J.; CHIBANA, H.; HERMAN, D.; HOLMES, A.; JENG, H.W.; KAMINISHI, H.; MATSUMOTO, T.; MIKAMI, T.; O'SULLIVAN, J.M.; SUDOH, M.; SUZUKI, M.; NAKASHIMA, Y.; TANAKA, T.; TOMPKINS, G.R.; WATANABE, T. *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. **Med Mycol**, v. 1, p. 125-37, 2000.
- CALLENS, S.F.; KITETELE, F.; LUKUN, P.; LELO, P.; VAN RIE, A.; BEHETS, F.; COLEBUNDERS, R. Pulmonary *Sporothrix schenckii* infection in a HIV positive child. **J Trop Pediatr**, v. 52, p. 144-146, 2006.

CAMERON, C.E.; BROWN, E.L.; KUROIWA, J.M.; SCHNAPP, L.M.; BROUWER, N.L. *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins. **J Bacteriol**, v. 186, p. 7019-7022, 2004.

CAMPBELL, I.D.; Spitzfaden, C. Building proteins with fibronectin type III modules. **Structure**, v.2, p. 333-337, 1994.

CAMPOS, P.; ARENAS, R.; CORONADO, H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. **Int J Dermatol**, v. 33, p. 38-41, 1994.

CARVALHO, M. T. M., DE CASTRO, A. P., BABY, C., WERNER, B., FILUS NETO, J. & QUEIROZ-TELLES, F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: Report of case. **Rev Soc Med Trop**, v. 35, p. 655-659, 2002.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, p. 17-24, 2003.

CASTREJON, O.V.; ROBLES, M.; ZUBIETA ARROYO O.E. Fatal fungaemia due to *Sporothrix schenckii*. **Mycoses**, v. 38, p. 373-376, 1995.

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

CHAFFIN, W.J.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. **Microbiol Mol Biol**, v. 62, p. 130-180, 1998.

CHUA, S.S.; MOMANY, M.; MENDOZA, L.; SZANISZLO, P.J. Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen *Sporothrix schenckii*. **Curr Microbiol**, v. 29, p. 151-6, 1994.

CLARKE, S.R.; FOSTER, S.J. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Adv Microb Physiol**, v. 51, p. 187-224, 2006.

COLEMAN, D.A.; OH, S.H.; ZHAO, X.; ZHAO, H.; HUTCHINS, J.T.; VERNACHIO, J.H.; PATTI, J.M.; HOYER, L.L. Monoclonal antibodies specific for *Candida albicans* Als3 that immunolabel fungal cells in vitro and in vivo and block adhesion to host surfaces. **J Microbiol Methods**, v. 78, p. 71-8, 2009.

COLEMAN, D.A.; OH, S.H.; ZHAO, X.; HOYER, L.L. Heterogeneous distribution of *Candida albicans* cell-surface antigens demonstrated with an Als1-specific monoclonal antibody. **Microbiology**, v. 156, p. 3645-59, 2010.

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

CONTI-DIAZ IA. Sporotrichosis in Uruguay: Epidemiologic and clinical aspects. In: (Ed), Pan American Health Organization Scientific Publication, Washington DC: Pan American Health Organization. p. 312-321, 1980.

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

CORMACK, B.P.; GHORI, N.; FALKOW, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science**, v. 285, p. 578-82, 1999.

CROTHERS, S.L., WHITE, S.D., IHRKE, P.J., AFFOLTER, V.K. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Vet Dermatol**, v. 20, p. 249-259, 2009.

D'ALESSIO, D.J.; LEAVANS, L.J.; STRUMPF, G.B.; SMITH, C.D. An outbreak of sporotrichosis in Vermont associated with sphagnum moss as the source of infection. **N Engl J Med**, v. 272, p. 1054-1058, 1965.

DA ROSA, A.C.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R.L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **J Am Acad Dermatol**, v. 52, p. 451-459, 2005.

DE BEER ZW, HARRINGTON TC, VISMER HF, WINGFIELD BD, WINGFIELD MJ. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras*–*Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 95, p. 434–441, 2003.

DE MEYER, E.M.; DE BEER, Z.W.; SUMMERBELL, R.C.; MOHARRAM, A.M.; DE HOOG, G.S.; VISMER, H.F.; WINGFIELD, M.J. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras*-*Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 100, p. 647-61, 2008.

DE OLIVEIRA, M.M., DE ALMEIDA-PAES, R., DE MEDEIROS MUNIZ, M., DE LIMA BARROS, M.B., GALHARDO, M.C., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, brazil: case report. **Mycopathologia**, v. 169, p. 359-63, 2010.

DEVI, K.R.; DEVI, M.U.; SINGH, T.N.; DEVI, K.S.; SHARMA, S.S.; SINGH, L.R.; SINGH, H.L.; SINGH, N.B. Emergence of sporotrichosis in Manipur. **Indian J Med Microbiol**, v. 24, p. 216-219, 2006.

DIAZ, I.A.C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v. 108, p. 113-116, 1989.

DIRR, F.; ECHTENACHER, B.; HEESEMANN, J.; HOFFMANN, P.; EBEL, F.; WAGENER, J. AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion, and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Int J Med Microbiol**, v. 300, p. 496-502, 2010.

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

DIXON, D.M., DUNCAN, R.A., HURD, N.J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp.* from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 951-954, 1992.

DONG, J.A.; CHREN, M.M.; ELEWSKI, B.E. Bonsai tree: risk factor for disseminated sporotrichosis. **J Am Acad Dermatol**, v. 33, p. 839-840, 1995.

DUNSTAN, R.W.; LANGHAM, R.F.; REIMANN, K.A.; WAKENELL, P.S. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. **J Am Acad Dermatol**, v. 15, p. 37-45, 1986.

ELIAS, N.; GASPAR, G.D.; CARDOSO, I.V.C. Esporotricose no rádio: Apresentação de um caso e revisão da literatura. **Ver Bras Ortop**, v. 22, no 7, 1987.

EIGENHEER, R.A.; JIN LEE, Y.; BLUMWALD, E.; PHINNEY, B.S.; GELLI, A. Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 7, p. 499-510, 2007.

FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. **Rev Infect Dis**, v. 2, p. 274-276, 1988.

FALKOW S. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity — a personal recollection 15 years later. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p. 67-72, 2004.

FARLEY, M.L.; AGAN, M.F.; ABRY, L.C.; WALLACE-JR., R.J. Presentation of *Sporothrix schenckii* in Pulmonary Cytology Specimens. **Acta Cytologica**, v.35, no. 4, 1991.

FERNANDES, K.S.; MATHEWS, H.L.; LOPES BEZERRA, L.M. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. **J Med Microbiol**, v. 49, p. 195-203, 1999.

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

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

FERREIRA, E.O.; ARAÚJO LOBO, L.; BARREIROS-PETRÓPOLIS, D.; AVELAR, K.E.; FERREIRA, M.C.; SILVA-FILHO, F.C.; DOMINGUES, R.M.A. *Bacteroides fragilis* surface glycoprotein mediates the interaction between the bacterium and the extracellular matrix component laminin-1. **Res Microbiol**, v. 157, p. 960-66, 2006.

FIGUEIREDO, C.C.; DE LIMA, O.C.; DE CARVALHO, L.; LOPES-BEZERRA, L.M.; MORANDI, V. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microb Pathog**, v. 36, p. 177-188, 2004.

FIGUEIREDO, C.C.; DECCACHE, P.M.S.; LOPES-BEZERRA, L.M.; MORANDI, M.; TGF- β 1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. **Microbiology** v. 153, p. 2910 - 2921, 2007.

FILLER, S.G.; SHEPPARD, D.C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. **PLoS Pathog**, v. 2, p. 29, 2006.

FRIEMAN, M.B.; MCCAFFERY, J.M.; CORMACK, B.P. Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. **Mol Microbiol**, v. 46, p. 479-492, 2002.

FU, Y.; RIEG, G.; FONZI, W.A.; BELANGER, P.H.; EDWARDS, J.E. JR.; FILLER, S.G. Expression of the *Candida albicans* gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. **Infect Immun**, v. 66, p. 1783-1786, 1998.

GARRISON, R.G.; BOYD, K.S.; MARIAT, F. Ultrastructural studies of the mycelium-to yeast transformation of *Sporothrix schenckii*. **J Bacteriol**, v. 124, p. 959-68, 1975.

GAUR, N.K.; KLOTZ, S.A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infect Immun**, v. 65, p. 5289-5294, 1997.

GAUR, N.K.; SMITH, R.L.; KLOTZ, S.A. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* expressing ALA1/ALS5 adhere to accessible threonine, serine, or alanine patches. **Cell Commun Adhes**, v. 9, p. 45-57, 2002.

GILGADO, F., CANO J., GENÉ J. & GUARRO J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 4930-4942, 2005.

GONZÁLEZ A, GÓMEZ BL, MUÑOZ C, ARISTIZABAL, BH, RESTREPO A, HAMILTON AJ. Involvement of extracellular matrix proteins in the course of experimental paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 3, p. 114-25, 2008.

GORIN, P.A.J.; BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. The Polysaccharides, Academic Press, INC. 1983.

GOW, N.A.; BATES, S.; BROWN, A.J. BUURMAN, E.T.; THOMSON, L.M.; WESTWATER, C. *Candida* cell wall mannosylation: importance in host-fungus interaction and potential as a target for the development of antifungal drugs. **Biochem Soc Trans**, v. 27, p. 512-516, 1999.

GOZALBO, D.; GIL-NAVARRO, I.; AZORIN, I.; RENAU-PIQUERAS, J.; MARTINEZ, J.P.; GIL, M.L. The Cell Wall-Associated Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Candida albicans* Is Also a Fibronectin and Laminin Binding Protein **Infect Immun**, v. 66, p. 2052-2059, 1998.

GOZALBO, D.; ROIG, P.; VILLAMON, E.; GIL, M.L. Candida and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 4, p. 117-135, 2004.

GRAVELAT, F.N.; EJZYKOWICZ, D.E.; CHIANG, L.Y.; CHABOT, J.C.; URB, M.; MACDONALD, K.D.; AL-BADER, N.; FILLER, S.G.; SHEPPARD, D.C. *Aspergillus fumigatus* MedA governs adherence, host cell interactions and virulence. **Cell Microbiol**, v. 12, p. 473-88, 2010.

GROSS, J.; LAPIERE, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci**, v. 48, p. 1014-1022, 1962.

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

HAMPTON, D.E.; ADESINA, A.; CHODOSH, J. Conjunctival sporotrichosis in the absence of antecedent trauma. **Córnea**, v. 21, p. 831-833, 2002.

HARRAGHY, N.; HUSSAIN, M.; HAGGAR, A.; CHAVAKIS, T.; SINHA, B.; HERRMANN, M.; FLOCK, J.I. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. **Microbiology**, v. 149, p. 2701-2707, 2003.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **J Exp Med**, v. 5, p. 77-89, 1900.

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

HOYER LL, FUNDYGA R, HECHT JE, KAPTEYN JC, KLIS FM, ARNOLD J. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. **Genetics**, v. 157, p. 1555-1567, 2001.

HOYER, L.L.; GREEN, C.B.; OH S.H.; ZHAO, X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. **Med Mycol**, v. 46, p. 1-15, 2008.

IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 753-764, 2005.

ISENBERG HD. Pathogenicity and virulence: another view. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, p. 40-53, 1988.

ITIS – Integrated Taxonomic Information System. Disponível na internet via URL: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; MATSUMUTO, T.; PADHYE, A.A.; MENDONZA, M.; NEGRONI, R. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South América. **Mycopathologia**, v. 142, p. 115-118, 1998.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; MOCHIZUKI, M.T.; JIN, X.Z.; KAGAWA, S. Environmental isolates of *Sporothrix schenckii* in China. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 43, p. 257-260, 2002.

ISHIZAKI H. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii*. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 44, p. 155-57, 2003.

JÄRVELÄINEN, H.; SAINIO, A.; KOULU, M.; WIGHT, T.N.; PENTTINEN, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. **Pharmacol Rev**, v. 61, p. 198-223, 2009.

JOH, D.; WANN, E.R.; KREIKEMEYER, B.; SPEZIALE, P.; HÖÖK, M. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. **Matrix Biol**, v. 18, p. 211–223, 1999.

Jones, N. Photo quiz. Osteoarticular sporotrichosis. **Clin Infect Dis**, v. 29, p. 202-3, 1999.

KALO A, SEGAL E, SAHAR E, DAYAN D. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosal surfaces: involvement of fibronectin in adherence. **J Infect Dis**, v. 157, p. 1253-6, 1988.

KANBE, T.; NATSUME, L.; GOTO, I.; KAWASAKI, M.; MOCHIZUKI, T.; ISHIZAKI, H.; Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. **J Dermatol Sci**, v. 38, p. 99-106, 2005.

KASUGA, K., WHITE, T. J., KOENIG, G, MCEWEN, J., RESTREPO, A., CASTAÑEDA, E., LACAZ, C. S., HEINS-VACCARI, E. M., FREITAS, R. S., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M., QIN, Z., NEGRONI, R., CARTER, D. A., MIKAMI, Y., TAMURA, M., TAYLOR, M. L., MILLER, G. F., POONWAN, N. & TAYLOR, J. H. Phylogeograph of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3383-3401, 2003.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. **Clin Infect Dis**, v. 29, p. 231-237, 1999.

KAUR, R.; DOMERGUE, R.; ZUPANCIC, M.L.; CORMACK, B.P. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Curr Opin Microbiol**, v. 8, p. 378-384, 2005.

KHABIE, N.; BOYCE, T.G.; ROBERTS, G.D.; THOMPSON, D.M. Laryngeal sporotrichosis causing stridor in a young child. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 67, p. 819-823, 2003.

- KIM, S.W.; JOO, Y.J.; KIM, J. Asc1p, a ribosomal protein, plays a pivotal role in cellular adhesion and virulence in *Candida albicans*. **J Microbiol**, v. 48, p. 842-848, 2011.
- KLEIN, B.S. Role of cell surface molecules of *Blastomyces dermatitidis* in the pathogenesis and immunobiology of blastomycosis. **Semin Respir Infect**, v. 12, p. 198-205, 1997.
- KLIS, F.M.; DE GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 39, p. 1-8, 2001.
- KLIS, F.M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 26, p. 239-256, 2002.
- KLIS, F.M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P.W. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185-202, 2006.
- KLIS, F.M.; SOSINSKA, G.J.; DE GROOT, P.; BRUL, S. Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. **FEMS Yeast Res**, v. 9, p. 1013-28, 2009.
- KLOTZ, S.A. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. **FEMS Microbiol Lett**, v. 56, p. 249-254, 1990.
- KLOTZ, S.A.; RUTTEN, M.J.; SMITH, R.L.; BABCOCK, S.R.; CUNNINGHAM, M.D. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. **Microb Pathog**, v. 14, p. 133-47, 1993.
- KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H.D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, p. 1077-1081, 2006.
- KOUFOPANOU, V., BURT, A., SZARO, T., & TAYLOR, J. W. Gene genealogies, cryptic species and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). **Mol Biol Evol**, v. 18, p. 1246-1258, 2001.
- KOVARIK, C.L., NEYRA, E., BUSTAMANTE, B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. **Med Mycol**, v. 46, p. 53-56, 2008.
- KWON-CHUNG, K.; BENNETT, J. Sporotrichosis. **Med Mycol**, p. 707-729, 1992.
- KWON-CHUNG, K. J. & VARMA, A. Do major species concept support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 574-597, 2006.
- LACAZ C.S. *Sporothrix schenckii*. In: LACAZ C.S. *et al.* Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Savier. p.326-331, 1998.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E.M., MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica, Savier (ED), São Paulo. 9ª ed., 479-497, 2002.

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

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

LARSSON, C.E.; GONCALVES, M.A.; ARAUJO, V.C.; DAGLI, M.L; CORREA, B.; FAVA NETO, C. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, p. 351-358, 1989.

LATGÉ JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiology**, v. 66, p. 279–290, 2007.

LI, F; PALECEK S.P. *EAP1*, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 1266–1273, 2003.

LI, F.; PALECEK, S.P. Identification of *Candida albicans* genes that induce *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion and morphogenesis. **Biotechnol Prog**, v. 21, p. 1601-1609, 2005.

LIU, X.; LIAN, C.; JIN, L.; AN, L.; YANG, G.; LIN, X. Characterization os *Sporothrix schenckii* by random amplification of polymorphic DNA assay. **Chin Med J**, v. 116, p. 239-242, 2003.

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

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

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

LIPKE, P.N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structures and new challenges. **J Bacteriol**, v. 180, p. 3735-40, 1998.

LOPES-ALVES, L.M.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; FOURNET, B.; DEGAND, P.; PREVIATO, J.O. O-glycosidically linked oligosaccharides from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. **Glycoconj J**, v. 9, p. 75-81, 1992.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, O.R.; *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis, **An Bras Acad Cienc**, v.78, p. 293-308, 2006.

LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R. BRUM, L.M.; WESTPHALEN, J.B.; ALTERMANN, M.J.; PRATES, F.B. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, p. 541– 545, 1999.

LLOYD, K.O.; BITOON, M.A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **J Immunol**, v. 107, p. 663-71, 1971.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Rev Med São Paulo**, v.21, p. 433– 450, 1907.

MACKINNON, J.; CONTI DIAZ, I.; GEZUELE, E.; CIVILA, E.; DA LUZ, S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. **Sabouraudia**, v. 7, p. 38– 45, 1969.

MACHI, K.; AZUMA, M.; IGARASHI, K.; MATSUMOTO, T.; FUKUDA, H.; KONDO, A. & OOSHIMA, H. Rot1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a putative membrane protein required for normal levels of the cell wall 1,6-b-glucan. **Microbiology**, v. 150, p. 3163–3173, 2004.

MADRID, H., CANO, J., GENÉ, J., BONIFAZ, A., TORIELLO, C. & GUARRO, J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Rev Iberoam Micol**, v. 26, p. 218-222. 2009.

MADRID, H., GENÉ, J., CANO, J., SILVEIRA, C. & GUARRO, J. *Sporothrix brunneoviolacea* and *Sporothrix dimorphospora*, two new members of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 102, p. 1193-1203. 2010.

MADRID, I.M.; XAVIER, M.O.; MATTEI, A.S.; FERNANDES, C.G.; GUIM, T.N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L.F.; NOBRE, MDE. O.; ARAÚJO MEIRELES, M.C. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes Infect**, v. 12, p. 162-165, 2010b.

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

MARIAT, F. The epidemiology of sporotrichosis. **Systemic Mycoses**, p. 144–159, 1968.

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

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 3198-3206, 2007.

- MARIMON, R., GENÉ, J., CANO, J. & GUARRO, J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Med Mycol**, v. 46, p. 621-625, 2008.
- MARTINEZ, J.P.; GIL, M.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; CHAFFIN, W.L. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, p. 121-141, 1998.
- MATUTE, D. R., McEWEN, J. G., PUCCIA, R. MONTES, B. A., SAN-BLAS, G. S., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J. T., RESTREPO, A., MORAIS, F. M., NIÑO-VEJA, G. & TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, p. 65-73, 2006.
- MAYDEN, R. L. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: CLARIDGE M. F., DAWAH H. A. & WILSON, M. R. (Eds.) **Species: The units of biodiversity**. Chapman and Hall Ltd, London, United Kingdom, chap. 19, p. 381-424, 1997.
- MAYORGA, R.; CACERES, A.; TORIELLO, C.; GUTIERREZ, G.; ALVAREZ, O.; RAMIREZ, M.E.; MARIAT, F. An endemic area of sporotrichosis in Guatemala. **Sabouraudia**, v.16, p. 185– 198, 1978.
- MAYORGA, R.; CACERES, A.; TORIELLO, C.; GUTIERREZ, G.; ALVAREZ, O.; RAMIREZ, M.E.; MARIAT, F. Study of an endemic sporotrichosis zone in the Ayarza lake region of Guatemala. **Bol Oficina Sanit Panam**, v.87, p. 20– 34, 1979.
- MENDONÇA, L.; GORIN, P.A.J.; LLOYD, K.O.; TRAVASSOS, L.R. Polymorphism of *Sporothrix schenckii* surface polysaccharides as a function of morphological differentiation. **Biochemistry**, v.15, p. 2423– 2431, 1976.
- MENDONÇA-PREVIATO, L.; GORIN, P.A.J.; TRAVASSOS, L.R. Galactose-containing polysaccharides from the human pathogen *Sporothrix schenckii*. **Infect Immun**, v. 29, p. 934– 939, 1980.
- MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.P.; DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, p. 383-394, 2005.
- MESA-ARANGO, A.C.; REYES-MONTES, M.R.; PÉREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚÑIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 3004-3011, 2002.
- MONTES, L., BICHARA, R. M., LOPEZ, M. & SOARES, D. B. Esporotricose: forma cutâneo linfática. Instituto de Dermatologia Prof. Rubem D. Azulay – Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://www.dermato-santacasa.com.br/poster/cilad/esporotricose.pdf>>

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

MYCOLOGY ONLINE – The University of Adelaide. Dimorphic Fungi. Disponível em: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/dimorphic_fungi/>.

NAJAFZADEH, M. J., SUN, J., VICENTE, V., XI, L., GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. & DE HOOG, G. S. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Med Mycol**, v. 48, p. 800-806, 2010.

NASCIMENTO, R.C., ESPÍNDOLA, N.M., CASTRO, R.A., TEIXEIRA, P.A.C., LOUREIRO Y PENHA, C.V., LOPES-BEZERRA, L.M. & ALMEIDA, S.R. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. **Eur J Immunol**, v. 8, p. 3080-3089, 2008.

NETO, R.D.J.P., MACHADO, A.A.; DE CASTRO, G.;QUAGLIO, A.S.S., MARTINEZ, R. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida – relato de caso. **Ver Soc Bras Med Trop**, v. 32, p. 57-61, 1999.

NETO, B.R., SILVA, J.D., MENDES-GIANNINI, M.J., LENZI, H.L., SOARES, C.M., PEREIRA, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 272, 2009.

NEYRA, E.; FONTEYNE, P.; SWINNE, D.; FAUCHE, F.; BUSTAMANTE, B.; NOLARD, N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 1348-1352, 2005.

O'REILLY, L.C.; ALTMAN, S.A. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 2547-2552, 2006.

O'RIORDAN, D. M., STANDING, J. E., KWON, K. Y., CHANG, D., CROUCH, E. C. AND LIMPER, A. H., Surfactant protein D interacts with *Pneumocystis carinii* and mediates organism adherence to alveolar macrophages. **J Clin Invest**, v. 95, p. 2699–2710, 1995.

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

PENALVER, M.C.; O'CONNOR, J.E., MARTINEZ, J.P.; GIL, M.L. Binding of Human Fibronectin to *Aspergillus fumigatus* Conidia **Infect Immun**, v. 64, p. 1146–1153, 1996.

- PENN C, KLOTZ SA. Binding of plasma fibronectin to *Candida albicans* occurs through the cell binding domain. **Microb Pathog**, v. 17, p. 387-93, 1994.
- PEREIRA, L.A.; BAÓ, S.N.; BARBOSA, M.S.; SILVA, J.L.; FELIPE, M.S.; DE SANTANA, J.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res**, v. 7, p. 1381–88, 2007.
- PIROFSKI, L.A.; CASADEVALL, A. The damage-response framework of microbial pathogenesis and infectious diseases. **Adv Exp Med Biol**, v. 635, 135-146, 2008.
- PONTÓN, J. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, p. 78-82, 2008.
- POTTS, J.R.; CAMPBELL, I.D. Structure and function of fibronectin modules. **Matrix Biol**, v. 15, p. 313-320, 1996.
- PREVIATO, J.O.; GORIN, P.A.J.; HASKINS, R.H.; TRAVASSOS, L.R. Soluble and insoluble glucans from different cell types of *Sporothrix schenckii*. **Exp Mycol**, v. 3, p. 92– 105, 1979.
- PRINGLE, A., BAKER, D. M., PLATT, J. L., WARES, J. P., LATGÉ, J. P. & TAYLOR, J. W. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Evolution**, v. 59, p. 1886-1899, 2005.
- QUINTAL D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. **J Cutan Med Surg**, v. 4, p. 51-4, 2000.
- RAUCEO, J.M.; DE ARMOND, R.; OTOO, H.; KAHN, P.C.; KLOTZ, S.A.; GAUR, N.K.; LIPKE, P.N. Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 1664-1673, 2006.
- READ, S.I.; SPERLING, L.C. Feline sporotrichosis. Transmission to man. **Arch Dermatol**, v. 118, p. 429– 431, 1982.
- REBIERE-HUET, J.; DI MARTINO, P.; HULEN, C. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to fibronectin by PA-IL and monosaccharides: involvement of a lectin-like process. **Can J Microbiol**, v. 50, p. 303-312, 2004.
- REED, K.D.; MOORE, F.M.; GEIGER, G.E.; STEMPER, M.E. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. **Clin Infect Dis**, v. 16, p. 384-387, 1993.
- REIS, R.S., ALMEIDA-PAES, R., MUNIZ, M.M., TAVARES, P.M., MONTEIRO, P.C., SCHUBACH, T.M., GUTIERREZ-GALHARDO, M.C., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Molecular characterization of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 769-74, 2009.
- RIPPON, J.W. The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes. **Med Mycol**, p. 325– 352. 1988.

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

ROMEO, O.; RACCO, C.; CRISEO, G. Amplification of the Hyphal Wall Protein 1 Gene To Distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 2590-2592, 2006.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and function of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infect Immun**, v. 68, p. 3696– 3703, 2000.

ROSAS, A.L.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun**, v. 69, p. 3410-3412, 2001.

ROSSER, E., DUNSTAN, R. Sporotrichosis. In: GREENE C (Ed), Infections diseases of the dog and cat, Philadelphia WB Saunders Company. p. 399-402, 1998.

RUIZ-BACA, E.; TORIELLO, C.; PÉREZ-TORRES, A.; SABANERO-LÓPEZ, M.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J.C.; LÓPEZ-ROMERO E. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Med Mycol**, v. 46, p. 1-13, 2008.

SANDINI, S.; LA VALLE, R.; DE BERNARDIS, F.; MACRI, C.; CASSONE, A. The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative beta-glucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity. **Cell Microbiol**, v. 9, p. 1223-1238, 2007.

SANDOVAL-BERNAL, G., BARBOSA-SABANERO, G., SHIBAYAMA, M., PEREZ-TORRES, A., TSUTSUMI, V., SABANERO, M. Cell Wall Glycoproteins Participate in the Adhesion of *Sporothrix schenckii* to Epithelial Cells. **Mycopathologia**. Epub ahead of print, 2010

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

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

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; REIS, R.S.; PEREZ, M.A.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **J Am Vet Med Assoc**, v. 15, p. 1623-1629, 2004.

SCHWARZ-LINEK, U.; WERNER, J.M.; PICKFORD, A.R.; GURUSIDDAPPA, S.; KIM, J.H.; PILKA, E.S.; BRIGGS, J.A.; GOUGH, T.S.; HOOK, M.; CAMPBELL, I.D.; POTTS, J.R. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. **Nature**, v. 423, p. 177-181, 2003.

SHARMA, S.; CHOUDHARY, R.; JUNEJA, M.; GROVER, C.; NAGI REDDY BS. Cutaneous tuberculosis mimicking sporotrichosis. **Indian J Pediatr**, v. 72, p. 86, 2005.

SHEPPARD, D.C.; YEAMAN, M.R.; WELCH, W.H.; PHAN, Q.T.; FU, Y.; IBRAHIM, A.S.; FILLER, S.G.; ZHANG, M.; WARING, A.J.; EDWARDS, J.E. JR. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. **J Biol Chem**, v. 279, p. 30480-30489, 2004.

SILVA-VERGARA, M.L.; MANEIRA, F.R.; DE OLIVEIRA, R.M.; SANTOS, C.T.; ETCHEBEHERE, R.M.; ADAD, S.J. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. **Med Mycol**, v. 43, p. 187-190, 2005.

SOVENHI, GEISA FERREIRA FERNANDES. Características fenotípicas, genotípicas, soroepidemiológicas, antigênicas, imunoquímicas e de virulência de isolados brasileiros de *Sporothrix schenckii*. 2009. 198f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo.

STAAB, J.F.; SUNDSTROM, P. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*. **Yeast**, v. 14, p. 681-686, 1998.

STAAB, J.F.; BAHN, Y.S.; TAI, C.H.; COOK, P.F.; SUNDSTROM, P. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. **J Biol Chem**, v. 279, p. 40737-40747, 2004.

SUNDSTROM, P. Adhesins in *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**, v.2, p. 353–357, 1999.

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida spp*. **Cell Microbiol**, v. 4, p. 461-469, 2002.

SUZUKI K, KAWASAKI M, ISHIZAKI H. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. **Mycopathologia**, v. 103, p. 147-51, 1988.

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

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. **Med Mycol**, v.36, p. 21-27. 1998.

- TANNER, W.; HASELBECK, A.; SCHWAIGER, H.; LEHLE, L. Synthesis and possible role of carbohydrate moieties of yeast glycoproteins. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 300, p. 185-194, 1982.
- TAVANTI, A., DAVIDSON, A. D., GOW, N. A. R. & MAIDEN, M. C. J. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J. Clin. Microbiol**, v. 43, p. 284-292, 2005.
- TAYLOR, J.J. The nature of the secondary conidia of *Sporothrix schenckii*. **Mycopathol Mycol Appl**, v. 41, p. 379-382, 1970.
- TEIXEIRA, M. M., THEODORO, R. C., DE CARVALHO, M. J. A., FERNANDES, L. PAES, H. C., HAHN, R. C., MENDOZA, L., BAGAGLI, E., SAN-BLAS, G. & FELIPE, M. S. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, p. 273-283, 2009.
- TEIXEIRA, PEDRO ANTÔNIO CASTELO, Estudo comparativo entre a virulência e a adesividade, e modulação da virulência do fungo *sporothrix schenckii*. 2007. 79f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- TEIXEIRA, P.A.; DE CASTRO, R.A.; FERREIRA, F.R.; CUNHA, M.M.; TORRES, A.P.; PENHA, C.V.; ROZENTAL, S.; LOPES-BEZERRA, L.M. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Med Mycol**, v. 48(5), p. 687-695, 2010.
- TEPARIC, R.; STUPAREVIC, I.; MRSA, V. Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. **Microbiology**, v. 150, p. 3145-3150, 2004.
- THOMPSON, D.W.; KAPLAN, W. Laboratory acquired sporotrichosis. **Sabouraudia**, v.15, p. 167– 170, 1977.
- TRAVASSOS LR. *Sporothrix schenckii*. In: Fungal Dimorphism with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans; P.J. Szanislo (ed.). Plenum Press, New York. p. 121-163, 1985.
- TRAVASSOS, L.R. Antigenic structures of *Sporothrix schenckii*. **Immunol Ser**, v. 47, p. 193-221, 1989.
- TRENT, J.T.; KIRSNER, R.S. Identifying and treating mycotic skin infections. **Adv Skin Wound Care**, v. 16, p. 122-129, 2003.
- TRONCHIN, G.; ESNAULT, K.; SANCHEZ, M.; LARCHER, G.; MAROT-LEBLOND, A.; BOUCHARA, J.P. Purification and partial characterization of a 32-kilodalton sialic acid-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**, v. 70, p. 6891-6895, 2002.
- TRONCHIN, G.; PIHET, M.; LOPES-BEZERRA, L.M.; BOUCHARA, J.P. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. **Med Mycol**, v. 46, p. 1-24, 2008.

VALLE-AVILES, L.; VALENTIN-BERRIOS, S.; GONZALEZ-MENDEZ, R.R.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Functional, genetic and bioinformatic characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 107, 2007.

VELASCO-CASTREJÓN, O.; GONZALEZ-OCHOA, Y.A. La esporotricosis en un pequeño poblado de la Sierra de Puebla. **Rev Invest Sal Publ**, v. 36, p. 133-137, 1976.

VERGARA-IRIGARA, Y. M.; VALLE, J.; MERINO, N.; LATASA, C.; GARCÍA, B.; RUIZ DE LOS MOZOS, I.; SOLANO, C.; TOLEDO-ARANA, A.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. **Infect Immun**, v. 77, p. 3978-91, 2009.

VIEIRA-DIAS, D.; SENA, C.M.; OREFICE, F.; TANURE, M.A.; HAMDAN, J.S. Ocular and concomitant cutaneous sporotrichosis. **Mycoses**, v. 40, p. 197-201, 1997.

WALKER, L., LEVINE, H., JUCKER, M. Koch's postulates and infectious proteins. **Acta Neuropathol**, v. 112, p. 1-4, 2006.

WATANABE, S.; KAWASAKI, M.; MOCHIZUKI, T.; ISHIZAKI, H. RFLP analysis of the internal transcriber spacer regions of *Sporothrix schenckii*. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 45, p. 165-175, 2004.

WALZER, P. D. Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in human. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 6, p. 149-155, 1999.

WHITE, E.S.; BARALLE, F.E.; MURO, A.F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. **J Pathol**, v. 216, p. 1-14, 2008.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; SCHWARZBAUER, J.E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **J Cell Sci**, v. 116, p. 3269-3276, 2003.

WUTHRICH, M.; FINKEL-JIMENEZ, B.; BRANDHORST, T.T.; FILUTOWICZ, H.I.; WARNER, T.; KLEIN, B.S. Analysis of non-adhesive pathogenic mechanisms of BAD1 on *Blastomyces dermatitidis*. **Med Mycol**, v. 44, p. 41-49, 2006.

XAVIER MH, TEIXEIRA A, PINTO JML, RODRIGUES KS, VILAR EG, SOUZA AC, Pereira GB. Cat-transmitted cutaneous lymphatic sporotrichosis. **Dermatol Online J**, v. 14, p. 4, 2008.

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