



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



JÉSSICA DA SILVA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS DENTRO DO
COMPLEXO *Sporothrix schenckii* E CORRELAÇÃO COM
AS FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE**

JOÃO PESSOA-PB

2018

JÉSSICA DA SILVA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS DENTRO DO
COMPLEXO *Sporothrix schenckii* E CORRELAÇÃO COM AS
FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Zélia Braz Vieira da Silva Pontes

JOÃO PESSOA-PB

2018

F383c Ferreira, Jéssica da Silva.

Caracterização fenotípica de cepas dentro do complexo *sporothrix schenckii* e correlação com as formas clínicas da esporotricose / Jéssica da Silva Ferreira. - - João Pessoa, 2018.

66f. : il. -

Orientadora : Zélia Braz Vieira da Silva Pontes.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Esporotricose. 2. Fenotipagem. 3. Taxonomia. 4. *Sporothrix schenckii*.
5. Farmácia.

BS/CCS/UFPB

CDU: 616.992(043.2)

JÉSSICA DA SILVA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS DENTRO DO
COMPLEXO *Sporothrix schenckii* E CORRELAÇÃO COM AS
FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Aprovado em: 14 / 06 / 2018

Zélia Braz Vieira da Silva Pontes

Profa. Dra. Zélia Braz Vieira da Silva Pontes
Universidade Federal da Paraíba-UFPB
(Orientadora)

Júlio Abrantes Pereira

Dr. Júlio Abrantes Pereira
Universidade Federal da Paraíba-UFPB
(1º membro)

Neuza Maria Cavalcanti Oliveira

Ma. Neuza Maria Cavalcanti Oliveira
Universidade Federal da Paraíba-UFPB
(2º membro)

Dedico este trabalho aos meus pais, Vera e Geraldo, por todo amor e dedicação, a minha irmã Edilane, por todo apoio sempre e a todos que torceram e contribuíram para que eu concluísse essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por ser uma fonte inesgotável de força, por nunca me abandonar e sempre iluminar meus passos, obrigada Senhor!

Aos meus pais, por tanto amor e confiança que depositam em mim, por me entenderem e sempre estar do meu lado, me apoiando pra que eu fique sempre forte e possa vencer meus obstáculos...todo esforço é por vocês! Amo incondicionalmente!

A minha irmã Edilane, que no ensino médio ao ler sobre os cursos pra me ajudar a escolher, me colocou no caminho da Farmácia! Muito obrigada por tudo que já fez por mim! Te amo muito!

Aos meus familiares, por torcerem por mim e ficarem felizes com essa vitória.

Agradeço as minhas amigas/irmãs, as abruces, que desde o primeiro período, vem sendo pilares que me ajudaram a passar pela vida acadêmica, obrigada pelo apoio nos momentos bons e ruins, por toda a amizade e companheirismo. Jaciclene, Raimunda, Rayane, Rildeane e Sabine, amo vocês demais!

A todos os amigos que fiz durante a graduação, obrigada por fazerem os dias melhores, por toda as vezes que estudamos juntos, e por todos os momentos de descontração, não serão esquecidos jamais.

A Gleice Rayanne, por ter me colocado no caminho do *Sporothrix* e por ter me ajudado tanto na minha vida acadêmica, da toxicologia pra vida. A Nathalia, por todas as vezes que me ajudou nos experimentos dessa pesquisa e por sua amizade valiosa.

A minha orientadora Zélia Braz, por toda a paciência, confiança, dedicação e por ser uma orientadora e pessoa tão maravilhosa, obrigada por tudo que fez por mim!

Também agradeço ao professor Felipe Guerra, pelas vezes que se disponibilizou pra me ajudar, fosse nos experimentos ou na parte burocrática.

Agradeço ao pessoal dos laboratórios de Controle de Qualidade Físico-Químico e analítico, ao Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e ao Laboratório de Micologia, pelo espaço cedido, a permissão para utilizar alguns dos equipamentos necessários nesta pesquisa e ajuda, em especial ao professor Ionaldo, Rayane Sales, Fátima (cardiovascular), Fátima (micologia) e Júlio.

Ao Laboratório de Análises clínicas do HU, por ceder às cepas, utilizadas nesta pesquisa.

Aos membros do Centro de Assistência Toxicológica-CIATox e da Liga Acadêmica de Toxicologia-LATOX, pelo período que passei na área da Tóxico, que me ensinou tanto para a vida acadêmica e profissional.

E finalmente, a todos os mestres, que tive durante a graduação, por todos os ensinamentos repassados, obrigada a todos!

FERREIRA, J. S. **Caracterização fenotípica de cepas dentro do complexo *Sporothrix schenckii* e correlação com as formas clínicas da esporotricose.** 2018. 66 p. Trabalho de conclusão de curso de Graduação em Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

RESUMO

A esporotricose é uma doença fúngica, de caráter subagudo ou crônico do homem e animais, causada pelos fungos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*. Devido ao aumento no número de casos desta micose em um hospital público de João Pessoa, surgiu a necessidade da realização de um estudo fenotípico para se conhecer as espécies que acometem os pacientes desta região. Para isto foram utilizadas 24 cepas de pacientes atendidos no Hospital Universitário, onde foi feita uma análise epidemiológica. Dentre os parâmetros fenotípicos analisou-se o crescimento vegetativo em PDA em diferentes temperaturas, características micromorfológicas *in vitro* e o padrão de assimilação de fontes de carbono. Como resultados, na análise epidemiológica observou-se uma maior prevalência da doença no sexo feminino (66,7% dos casos), em relação ao sexo, como também uma maior ocorrência da forma linfocutânea (54,2% dos casos) em relação as formas clínicas. Na análise macromorfológica, foi observado um alto crescimento das cepas com médias de 43,5mm em 30°C, 29,4mm em 35°C e de 10,1mm em 37°C, tendo inibição de crescimento apenas em 40°C. A taxa de inibição de crescimento foi relativamente baixa com 36,5 % em 35°C e de 76,5% em 37°C. Na micromorfologia os conídios apresentaram-se de forma semelhante, com a presença de conídios sésses pigmentados em sua totalidade. O perfil de assimilação, mostrou-se discordante com a chave taxonômica nos açúcares rafinose e sacarose em algumas amostras, enquanto que o ribitol teve assimilação variável. As espécies identificadas foram *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, em que correlacionando com as formas clínicas, viu-se de que ambas foram capazes de causar tanto a forma linfocutânea quanto a cutânea fixa, sendo *S. schenckii* a mais prevalente dentre as duas formas clínicas. Apesar da caracterização fenotípica ser importante para o entendimento das características do fungo, esta apresenta algumas falhas, desta forma, é necessário que sejam realizados estudos moleculares para poder intervir de forma mais efetiva quanto ao tratamento da esporotricose nesta região.

Palavras-chave: Esporotricose. Fenotipagem. Taxonomia. *Sporothrix schenckii*

FERREIRA, J. S. **Phenotypic characterization of strains within the *Sporothrix schenckii* complex and correlation with the clinical forms of sporotrichosis.** 2018. 66 p. Graduation in Pharmacy, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2018.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a fungal disease, of subacute or chronic character of man and of animals, responsible for the fungi belonging to the *Sporothrix schenckii* complex. Rating: 0.0 Increase in the number of risk cases in a public hospital in João Pessoa, a phenotypic study was conducted to know the species that affect the patients in this region. To the we were used 24 strains of patients patients in University Hospital, where an epidemiological analysis was done. Among the phenotypic parameters analyzed the vegetative growth in PDA at different temperatures, in vitro micromorphological characteristics and the assimilation pattern of carbon sources. As in a recent epidemiological analysis, the highest occurrence of the disease in females (66.7% of cases), in relation to sex, is the highest occurrence of lymphococcal disease (54.2% of cases) in relation to clinical forms . Macromorphological analysis showed an increase in mean concentrations of 43.5 mm at 30 ° C, 29.4 mm at 35 ° C and 10.1 mm at 37 ° C, with growth inhibition at only 40 ° C. inhibition was 36.5% at 35 ° C and 76.5% at 37 ° C. At micromorphology similar conidia were similarly present with the presence of pigmented sessile conidia in their entirety. The profile of assimilation, present itself discordant with a taxonomic raffinose and sucrose sugars in some samples, whereas the ribitolía variable assimilation. As pathogenic species were *S. schenckii* and *S. brasiliensis*, which were correlated as consensus forms, whereas *S. schenckii* were the most prevalent among the forms. the clinics. Although the phenotypic characteristic is important for the understanding of the characteristics of the fungus, this one has some flaws, this form, is necessary for the accomplishment of studies on the subject to be able to intervene in a more effective way regarding the treatment of sporotrichosis in this region.

Key words: Sporotrichosis. Phenotyping. Taxonomy. *Sporothrix schenckii*.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Diferenças de assimilação das fontes de carbono entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.....**23**

Quadro 2- Cepas utilizadas para a pesquisa com seus respectivos códigos, forma clínica da doença e sexo do hospedeiro nos anos de 2016 e 2017.....**39**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Diâmetro médio das colônias de cepas de *Sporothrix* spp. em meio PDA, em temperaturas variadas por 21 dias.....**47**
- Tabela 2** - Diâmetro das colônias incubadas em meio PDA em diferentes temperaturas, por 21 dias de acordo com as formas clínicas da esporotricose.....**48**
- Tabela 3** - Percentual de inibição de crescimento das 24 cepas em relação à temperatura de 30°C.....**49**
- Tabela 4** - Percentual médio de inibição do crescimento de 24 cepas de *Sporothrix* spp. a 35 e 37°C de acordo com a forma clínica da esporotricose.....**50**
- Tabela 5** - Assimilações de fontes de carbono pelas 24 cepas de *Sporothrix* spp. após incubação a 25°C por 10 dias.....**52**
- Tabela 6** - Identificação das espécies através de suas características fenotípicas, segundo chave taxonômica de Rodrigues, A. M. (2010) (Adaptado de Marimon et al., 2007; 2008b).....**53**
- Tabela 7** - Correlação entre as espécies *S. schenckii* e *S. brasiliensis* identificadas e as formas clínicas da esporotricose.....**54**
- Tabela 9** - Percentual das espécies de *Sporothrix* spp. por forma clínica da esporotricose.....**54**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Tipos de melanina produzidas por *Sporothrix* spp. A) melanina DHN em contorno do conídio; B) eumelanina produzida por leveduras; C) piomelanina produzida por leveduras, a direita, presença de L-tirosina no meio, e o frasco a esquerda, utilizado como controle com leveduras mortas.....**24**
- Figura 2** - Macromorfologia na fase micelial de *Sporothrix* spp. em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), com 13 dias de crescimento. A-verso; B-reverso.....**25**
- Figura 3** - Fase leveduriforme de *Sporothrix* spp. cultivada em ASD por 4 dias.....**25**
- Figura 4** - Microscopia da fase filamentosa de *Sporothrix* spp. Observam-se hifas, finas e septadas com conídios pigmentados.....**26**
- Figura 5** - Microscopia da fase de levedura à 37°C.....**26**
- Figura 6** - Incidência mundial da esporotricose humana.....**27**
- Figura 7** - Forma cutânea fixa da esporotricose.....**30**
- Figura 8** - Forma linfocutânea da esporotricose.....**30**
- Figura 9** - Forma cutânea disseminada da esporotricose em paciente alcoólico crônico.....**31**
- Figura 10** - Esporotricose extracutânea pulmonar.....**32**
- Figura 11** - Leveduras arredondadas ou ovaladas de *Sporothrix* spp. livres ou dentro de macrófagos.....**34**

Figura 12 - Aspectos macromorfológicos das cepas de *Sporothrix* spp. repicadas em meio PDA a 30°C. A) colônia preta; B) colônia rajada; C) colônia clara.....**46**

Figura 13 - Crescimento vegetativo em PDA nas temperaturas de 30, 35 e 37°C.....**46**

Figura 14 - Presença de conídios sésseis pigmentados, após 10 dias de desenvolvimento em meio PDA. Lâmina corada com lactofenol-100x.....**50**

Figura 15 - Assimilação de açúcares em microplacas após 10 dias de incubação.....**51**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Percentual de esporotricose de acordo com o sexo de 24 pacientes assistidos no SM-LAC/HULW-EBSERH.....**44**

Gráfico 2- Percentual da ocorrência de 24 casos da esporotricose de acordo com a forma clínica.....**45**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ASA** - Ágar Sabouraud com antibiótico
- ASD** - Ágar Sabouraud dextrose
- BHI** - Brain Heart Infusion (Ágar Cérebro e Coração)
- CNS** - Conselho Nacional de Saúde
- DC** - Diâmetro da colônia
- DO** - Densidade ótica
- DP** - Desvio padrão
- EBSERH** - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
- GL** - Glicose
- HE** - Hematoxilina-eosina
- HULW** - Hospital Universitário Lauro Wanderley
- IC** - Inibição do crescimento
- IPG** - Impregnação pela prata de Grocott
- Kg** - kilogramas
- KOH** - Hidróxido de Potássio
- mg** - miligramas
- µL** - microgramas
- mL** - mililitros
- MS** - Ministério da Saúde
- Nm** - nanômetros
- PAS** - Periodic acid-Schiff
- PCR** - Reação da Polimerase em Cadeia
- PCR-RFLP** - (PCR- Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação)
- PDA** - Potato Dextrose Ágar (Ágar Batata)
- RB** - Ribitol
- RF** - Rafinose
- SC** - Sacarose
- SDA** - Sabouraud Dextrose com Antibiótico
- SM** – Setor de micologia

TCLE - Termo de Consentimento Livre e esclarecido

UFC - Unidade Formadora de Colônia

ULAC/HU - Unidade Laboratório de Análises Clínicas/ Hospital Universitário

YNB- Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 HISTÓRICO.....	21
2.2 TAXONOMIA.....	22
2.3 FISILOGIA.....	22
2.4 MORFOLOGIA.....	24
2.5 EPIDEMIOLOGIA.....	27
2.6 PATOGENIA.....	28
2.7 ASPECTOS CLÍNICOS.....	29
2.7.1 Formas cutâneas	29
2.7.1.1 Cutânea fixa.....	29
2.7.1.2 Linfocutânea.....	30
2.7.1.3 Cutânea disseminada.....	31
2.7.2 Formas extracutâneas	32
2.8 DIAGNÓSTICO.....	33
2.8.1 Exame direto.....	33
2.8.2 Histopatológico.....	33
2.8.3 Cultura.....	34
2.8.4 Molecular.....	35
2.9 TRATAMENTO.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37

4 METODOLOGIA.....	38
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	38
4.2 LOCAL DA PESQUISA.....	38
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	38
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	38
4.5 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	38
4.6 ASPÉCTOS ÉTICOS.....	40
4.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	40
4.7.1 Ensaio morfológicos	40
4.7.1.1 Crescimento vegetativo em PDA.....	40
4.7.1.2 Microcultivo.....	40
4.7.2 Ensaio fisiológicos	41
4.7.2.1 Crescimento vegetativo em diferentes temperaturas.....	41
4.7.2.2 Taxa de inibição de crescimento.....	41
4.7.3 Ensaio bioquímicos	42
4.7.4 Classificação das espécies de <i>Sporothrix spp</i>	43
5 RESULTADOS.	44
5.1 DADOS PERCENTUAIS EM RELAÇÃO AO SEXO DOS PACIENTES E AS FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE.....	44
5.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.....	45
5.3 DIÂMETRO DAS COLÔNIAS EM FUNÇÃO DAS TEMPERATURAS DE 30, 35, 37 3 40°C.....	46
5.4 TAXA DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO.....	48
5.5 ASPECTOS MICROSCÓPICOS.....	50
5.6 PERFIS DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES CARBONADAS.....	51

5.7 IDENTIFICAÇÃO SUGESTIVA DAS ESPÉCIES.....	53
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença fúngica infecciosa, de caráter crônico, causada pelos fungos pertencentes ao Complexo *Sporothrix schenckii*, que acomete o homem e animais através da implantação traumática do fungo na pele. Este complexo compreende 6 espécies principais, que são: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* e *S. schenckii* (CRUZ, 2013). São fungos dimórficos, saprófitas e geofílicos, amplamente distribuído na natureza, predominantemente em solos ricos em matéria orgânica, plantas secas, madeiras e musgos, sendo *S. schenckii* a espécie mais comum desse complexo (LOPES-BEZERRA et al., 2006; ANTUNES et al., 2009).

A esporotricose é a micose subcutânea de maior incidência no Brasil, sendo o estado do Rio de Janeiro o que apresenta o maior número de casos. Segundo dados epidemiológicos da Vigilância Sanitária do Rio de Janeiro, em 2016, verificou-se um aumento de 400 % no número de animais diagnosticados, em sua maioria gatos. No ano passado, dos casos notificados, foram feitos 13.536 atendimentos, cerca de 10.000 casos a mais que em 2015, em institutos públicos veterinários, assistência domiciliar ou comunitária. Já em humanos, o número registrado foi de 580 casos notificados de esporotricose, de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2017).

Na Paraíba, observou-se um aumento de esporotricose a partir do ano de 2016 em pacientes assistidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) – Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) em João Pessoa-PB. Hospital referência na área de doenças infecciosas e parasitárias, sinalizando para os profissionais a necessidade de conhecer o comportamento desta micose em nosso meio.

Outra problemática está relacionada a não realização da identificação da espécie fúngica na prática laboratorial, dificultando estudos de incidência de quais espécies são mais incidentes em determinadas regiões do Brasil, principalmente na região Nordeste.

Diante disto, é de extrema importância uma análise fenotípica para identificação das espécies pertencentes ao Complexo *S. schenckii*, que permite

um maior conhecimento da morfologia, propriedades bioquímicas, fisiológicas e comportamento das espécies, subsidiando a epidemiologia da doença e protocolo de tratamento humano e animal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO

A esporotricose é uma micose subcutânea, também considerada uma zoonose, que acomete homens e animais, causada por fungos dimórficos saprófitas do complexo *S. schenckii* (GUSMÃO, 2017; PIRES, 2017). Em 1898, o estudante de medicina Benjamin Schenck, no Hospital Johns Hopkins em Baltimore, nos Estados Unidos, descreveu pela primeira vez a esporotricose (OROFINO-COSTA et al., 2017). Schenck cuidava de um paciente do sexo masculino, 36 anos, que apresentava lesões não cicatrizadas, na mão e braço direito, com acometimento da cadeia linfática, o que o levou a isolar o agente e descrever as características morfológicas observadas (ABREU, 2017; SCHENCK, 1898). A amostra isolada do abscesso do paciente foi então avaliada pelo patologista Erwin Smith, que classificou o fungo como pertencente ao gênero *Sporotricum* (BARROS et al., 2011).

O segundo caso relatado desta micose ocorreu em 1899, onde uma criança após se ferir com um martelo apresentou nódulos ulcerados ou não, acompanhando a cadeia linfática do braço (ABREU, 2017). Este fungo foi isolado de aspirado de lesões do paciente e foi descrito em 1900 por Hektoen e Perkins, que renomearam o agente como *S. schenckii*, devido a reprodução característica desse gênero (HEKTOEN, PERKINS, 1900; OROFINO-COSTA et al., 2017).

No Brasil, o primeiro caso foi descrito por Lutz e Splendore em São Paulo, através da avaliação de lesões em roedores e descobriram que era possível cultivar o fungo *in vitro* (LOPES-BEZERRA et al., 2006; ABREU, 2017).

Por mais de cem anos, a esporotricose tinha como agente causador apenas uma espécie, *S. schenckii*; no entanto, devido ao crescimento gradativo dessa micose em homens e animais, principalmente em gatos, começaram a ser feitos vários estudos sobre a genômica deste fungo com base em análise filogenética, com cepas de diversas partes do mundo, em que se comprovou a existência de um complexo do gênero *Sporothrix*, composto por 6 espécies (CRUZ, 2013).

2.2 TAXONOMIA

O *Sporothrix* spp. taxonomicamente pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, Classe Pyrenomycetes, Ordem Ophiostomatales, Família Ophiostomataceae (FREITAS,2014). De acordo com a sua classificação no reino Fungi, o gênero *Sporothrix* é composto por seres heterotróficos, imóveis, eucariotas, apresentando na composição da parede celular a quitina (GUARRO et al., 1999). Atualmente, considera-se o *S. schenckii* um complexo composto de 6 espécies crípticas que estão filogeneticamente relacionadas, que são: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. albicans* e *S. luriei* (MARIMON et al.,2007). A descoberta de novas espécies deste complexo foi possível, devido a procedimentos como o sequenciamento de genomas, a reação da polimerase em cadeia (PCR) e estudos da taxonomia polifásica, onde se mostra importante uma análise multifatorial de características como morfologia, bioquímica, fisiologia, ecologia, nutrição, dentre outros (CRUZ, 2013).

2.3 FISILOGIA

Sporothrix spp. é um fungo dimórfico, saprófito e geofílico, que possui uma maior prevalência em zonas temperadas e tropicais (RODRIGUES, 2010). É encontrado em troncos de madeira, solo, material orgânico em decomposição, vegetais, por serem locais que apresentam umidade, calor e pouca luz, favorecendo o crescimento e reprodução do fungo (GUSMÃO, 2017). Devido ao seu termodimorfismo, *Sporothrix* spp. apresenta-se como células semelhantes a leveduras em sua forma parasitária à 35°-37°C nos mamíferos ou *in vitro*, e também em sua forma filamentosa, saprófita da natureza à 25°C, sendo o intervalo de 30°- 37°C considerado a temperatura ótima para o crescimento desta espécie fúngica (OROFINO-COSTA et al., 2017; ABREU, 2017).

As espécies do complexo *Sporothrix* têm a capacidade de assimilar diferentes fontes de nitrogênio e carbono; no entanto, a assimilação de açúcares como sacarose, ribitol, rafinose e arabinose apresentam variações entre as espécies como mostrado no quadro 1 (ABREU, 2017). Este complexo, não possui

capacidade fermentativa (MARIMOON et al., 2007), mas a presença da glicose em meios de cultura, aumenta a produção de melanina pelo fungo, deixando a colônia com uma coloração mais escura, sendo este um fator de virulência dessas espécies (ALMEIDA-PAES et al., 2009).

Quadro 1. Diferenças de assimilação das fontes de carbono entre as espécies do Complexo *Sporothrix schenckii*.

Espécies	Rafinose	Sacarose	Ribitol
<i>S. brasiliensis</i>	-	-	Variável
<i>S. schenckii</i>	+	+	Variável
<i>S. globosa</i>	-	+	Variável
<i>S. mexicana</i>	+	+	Variável
<i>S. albicans</i>	-	+	Variável
<i>S. luriei</i>	-	-	+

Fonte: Adaptado de CRUZ, 2013 e RODRIGUES, 2010.

Assim como muitos microrganismos este fungo possui fatores de virulência. Fatores esses que permitem a sobrevivência e ampliam seu crescimento no organismo hospedeiro. Ainda existem poucos estudos sobre os fatores de virulência do *Sporothrix* spp., devido ao seu teleomorfo ser ainda desconhecido. No entanto, alguns já foram descritos como a termotolerância e a produção de melanina (FREITAS, 2014). A termotolerância está relacionada principalmente com as manifestações clínicas da esporotricose (ALMEIDA-PAES et al., 2015). Isolados de *Sporothrix* spp. que crescem a 35°C e não a 37°C não causam esporotricose linfática, os isolados dessa forma clínica apresentam crescimento e tolerância a 37°C (FREITAS, 2014; MESA-ARANGO et al., 2002). Segundo estudos a espécie *S. globosa* apresenta baixa termotolerância, tendo uma menor virulência; porém, também apresenta formas clínicas e exige tratamento como as demais espécies do complexo (ALMEIDA-PAES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011).

A melanina é um dos mais importantes fatores de virulência dos fungos, uma vez que protege os mesmos da exposição à altas temperaturas, agentes tóxicos, dentre outros estresses ambientais (ANTUNES et al., 2009), sendo considerada também como fator de resistência a alguns antifúngicos como a terbinafina, a anfotericina B e o itraconazol (OROFINO-COSTA et al., 2017). O principal tipo de melanina existente do Reino Fungi é a 1,8-di-hidróxinaftaleno (DHN) (Figura 1), sintetizada a partir da acetil-coenzima A (CoA). Outros tipos de melanina como a eumelanina e a piomelanina (Figura 1) também podem estar presentes entre os fungos se seu precursor, a L-tirosina, estiver durante o crescimento fúngico (FREITAS, 2014).

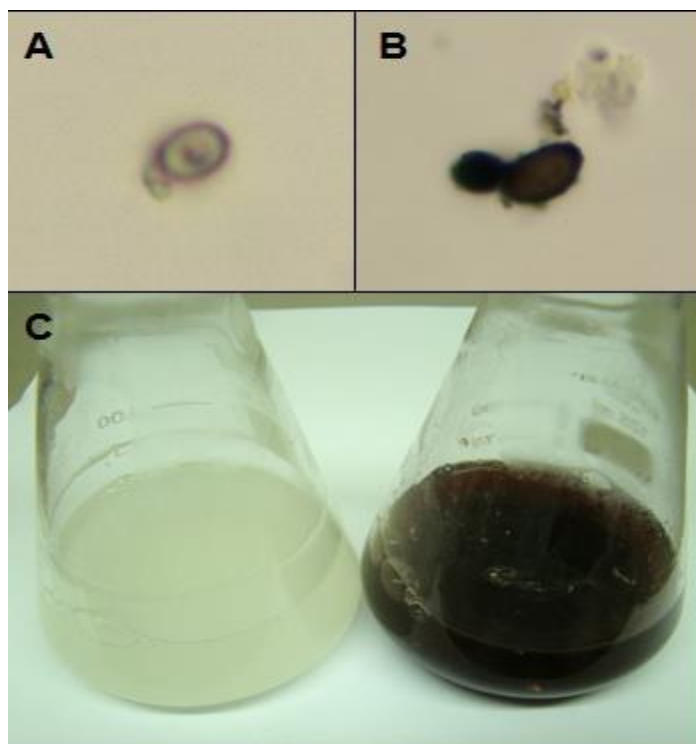


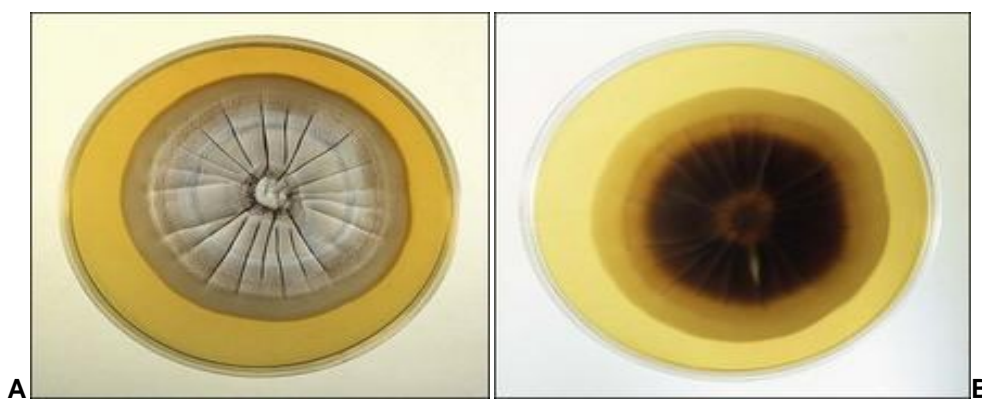
Figura 1. Tipos de melanina produzidas por *Sporothrix* spp. A) melanina DHN em contorno do conídio; B) eumelanina produzida por leveduras; C) piomelanina produzida por leveduras à direita na presença de L-tirosina no meio e o frasco a esquerda utilizado como controle com leveduras mortas. (Fotografias extraídas de Almeida-Paes, 2012; Adaptado de Freitas, 2014).

2.4 MORFOLOGIA

Devido ao seu dimorfismo, as espécies do complexo *S. schenckii* apresentam-se tanto na forma filamentosa numa temperatura em torno de 25°C,

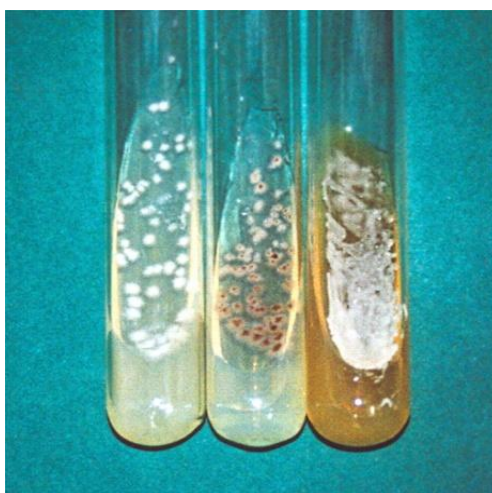
quanto na forma leveduriforme a 37°C. Macroscopicamente, na fase micelial (Figura 2), a colônia apresenta-se enrugada, textura coriácea, com superfície sulcada, as vezes apresentam micélio aéreo, com coloração, a princípio, branca à creme, que gradativamente vai escurecendo até chegar a uma cor negra, que está associada a produção de melanina. Entretanto, algumas cepas têm a capacidade de formar colônias escuras desde o início de seu crescimento (CRUZ, 2013; ABREU, 2017; FREITAS, 2014). Em sua forma de levedura (Figura 3), em parasitismo, a colônia se mostra com consistência cremosa, aspecto úmido e de coloração variando de branco á creme (CRUZ, 2013; RODRIGUES, 2010).

Figura 2. Macromorfologia na fase micelial de *Sporothrix* spp. em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com 13 dias de crescimento. A- anverso; B - reverso.



Fonte: <https://veteriankey.com/the-dimorphic-fungi/>
Acesso em: 11 de maio de 2018.

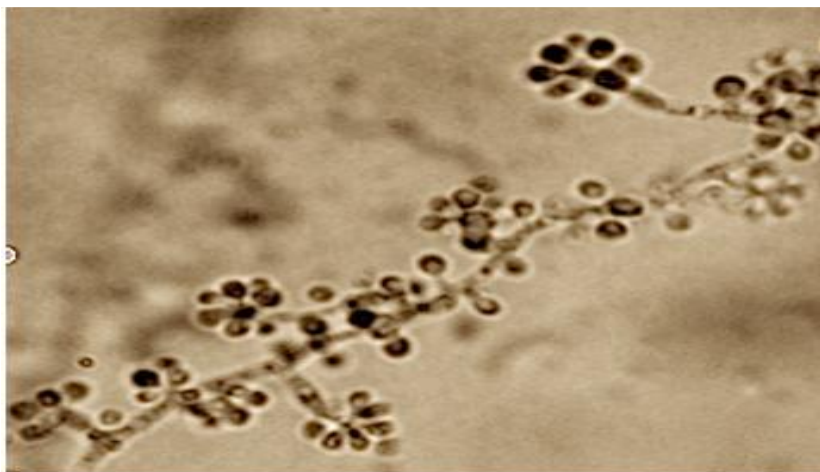
Figura 3. Fase leveduriforme de *Sporothrix* spp. cultivada em ASD, por 4 dias.



Fonte: Adaptada de BARROS, ALMEIDA-PAES e SCHUBACH, 2011.

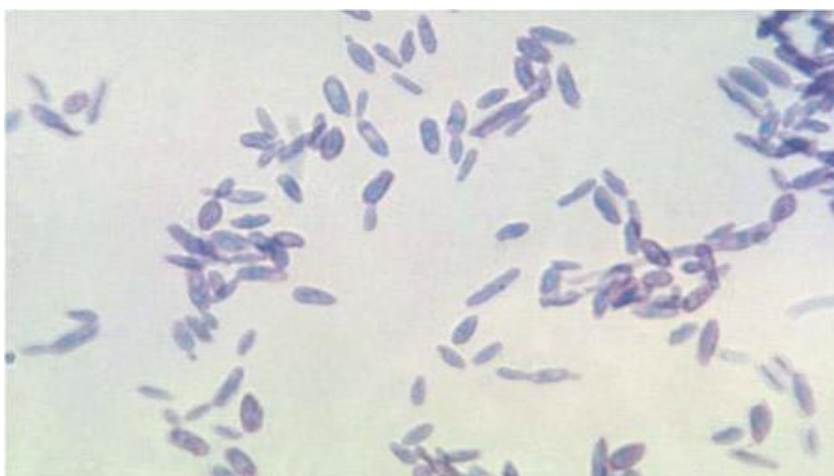
Microscopicamente, em sua forma filamentosa (Figura 4), pode-se observar a presença de hifas hialinas, delgadas, septadas e ramificadas, com conídios unicelulares, hialinos ou demáceos, globosos a ovóides, dispostos na extremidade do conidióforo, lembrando uma margarida, ou diretamente ligados a hifa, que são os chamados conídios sésseis (LOPES-BEZERRA et al., 2006; FREITAS, 2014; RODRIGUES, 2010). Já as leveduras (Figura 5), apresentam-se como células fusiformes à arredondadas, medindo de 2,5 a 5 μm (ABREU, 2017).

Figura 4. Microscopia da fase filamentosa de *Sporothrix* spp. Observam-se hifas, finas e septadas com conídios pigmentados.



Fonte: Adaptado de CRUZ, 2013.

Figura 5. Microscopia da fase de levedura á 37°C.

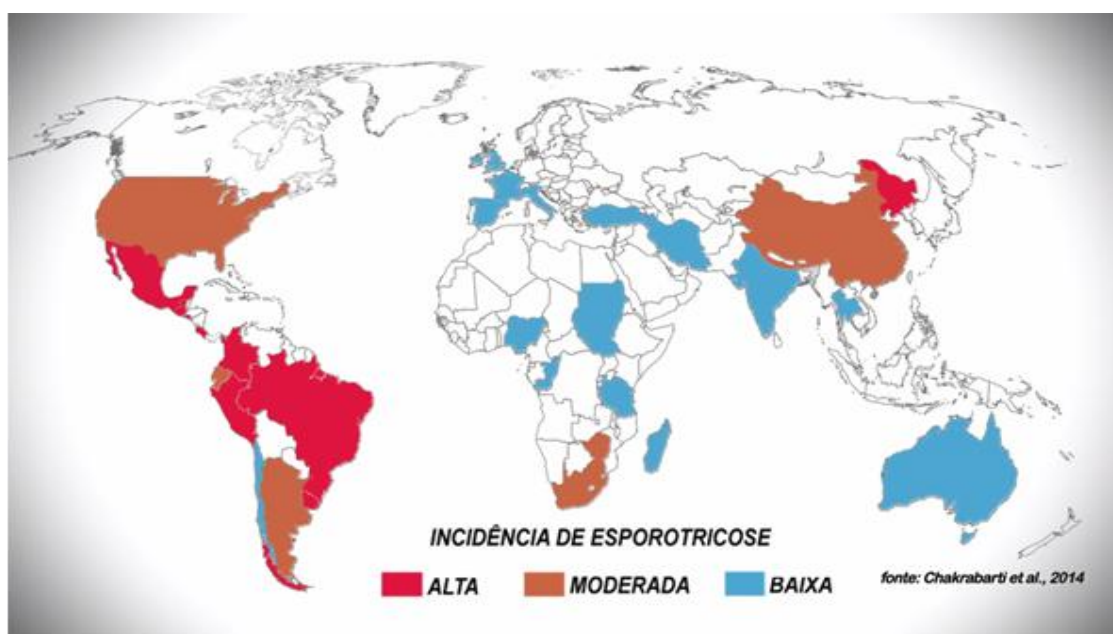


Fonte: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au/virtual/2008/ID2-Jan08.html>> Acesso em: 11 de maio de 2018.

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Durante muito tempo a esporotricose foi conhecida como a “micose do jardineiro”, já que esses fungos são encontrados nos solos e estes profissionais, muitas vezes, se contaminavam através de trauma com vegetal contaminado (OROFINO-COSTA et al., 2017). A esporotricose é uma doença de distribuição mundial (Figura 6), mais comum na América Latina, países tropicais e subtropicais, em que apesar do número crescente de casos ainda é considerada uma doença negligenciada (GUSMÃO, 2017; SILVA et al., 2012).

Figura 6. Incidência mundial da esporotricose humana.



Fonte: Chakrabarti et al., 2014

Historicamente, a maior epidemia da doença ocorreu na década de 40 em uma mineradora na África do Sul, onde cerca de 3.000 mineiros foram infectados pelo fungo presente em vigas de madeira que sustentavam os túneis das minas (LARSSON, 2011; FREITAS, 2014). Atualmente, no continente africano são mais frequentes casos na Nigéria, Sudão e Zimbábue com uma problemática em relação ao diagnóstico e mapeamento da micose por falta de laboratórios de micologia nestas regiões (CHAKRABARTI et al., 2015). Ainda é incidente no continente asiático, principalmente na China e Japão e baixa prevalência no

continente europeu (OROFINO-COSTA et al., 2017).

No Brasil, desde 1998, uma epidemia de esporotricose vem se espalhando no Rio de Janeiro, com uma maior concentração na região metropolitana, acometendo homens, gatos e cães (RODRIGUES, 2010; BARROS et al., 2010). Diferente dos demais estados, o Rio de Janeiro a partir de 2013 fez obrigatória a notificação desta doença para um melhor controle epidemiológico (OROFINO-COSTA et al., 2017). Segundo dados disponíveis em um boletim epidemiológico da esporotricose da Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, durante os anos de 2013 á 2016 foram registrados 3.377 casos suspeitos desta micose, com média de 782 casos por ano, observando também uma elevada prevalência entre o sexo feminino. Este estudo corrobora com o realizado por Barros et al. (2010), que ao avaliar dados a partir de 1998, comprovou que as mulheres na faixa de 40 a 59 anos são as mais acometidas pelo fungo, devido a passarem mais tempo em casa e ser geralmente quem cuida dos animais.

É crescente o número de casos de gatos infectados e de humanos que foram contaminados pelos mesmos. Isto ocorre devido ao aumento da população de gatos abandonados nas ruas e praças, assim, gatos portadores da doença acabam disseminando a infecção para outros felinos. Concomitantemente, há o fato de muitas pessoas acolherem os animais em suas casas, correndo um maior perigo de contrair o fungo. Muitos donos de gatos com esporotricose acabam abandonando-os nas ruas longe de sua casa para diminuir o risco de contágio e também quando não tem condições de pagar o tratamento, que acaba sendo de alto custo, já que a esporotricose felina apresenta-se de forma mais severa que a humana (CRUZ, 2013; GREMIÃO et al., 2017). Quando sacrificados, os felinos não devem ser enterrados e sim cremados para evitar a disseminação fúngica no solo e sua progressão na natureza (OROFINO-COSTA et al., 2017).

2.6 PATOGENIA

A transmissão da esporotricose em humanos pode ocorrer entre homem-gato e homem-vegetal. A implantação do fungo dar-se por inoculação traumática do fungo na pele ou mucosas por arranhaduras de gatos ou por acidente com

vegetais contaminados (CRUZ, 2013). Geralmente, os locais mais afetados são aqueles mais expostos como membros superiores (com maior frequência) e membros inferiores (MAHAJAN, 2014). Quando o fungo penetra no tegumento em sua forma filamentosa, saprófita ocorre à mudança morfológica para levedura no organismo num período em média de 21 dias. No entanto, quando o indivíduo é infectado já com a forma unicelular, que é a mais frequente na superfície de lesões nos felinos, esta mudança não é necessária (ABREU, 2017). Outra via de transmissão zoonótica é a inalatória, onde acontece a inalação de propágulos fúngicos infecciosos caracterizando a forma extracutânea (OROFINO-COSTA et al., 2017; BARROS et al., 2011).

A manifestação clínica da doença vai depender do estado imunológico do hospedeiro e das características biológicas do fungo (ABREU, 2017). O agente pode ficar restrito a derme e tecido subcutâneo, identificando a forma cutânea-fixa, se espalhar pela via linfática, a chamada forma cutâneo-linfática e ainda, mais raramente, se disseminar pela corrente sanguínea definindo a forma disseminada ou extra cutânea (LARSSON, 2011; ABREU, 2017).

2.7 ASPECTOS CLÍNICOS

2.7.1 Formas cutâneas

2.7.1.1 Cutânea-fixa

A forma cutânea-fixa ou isolada (Figura 7) é caracterizada por uma lesão única ou várias lesões ulceradas restritas ao local de inoculação, sem acometimento dos vasos linfáticos. Consiste em uma lesão verrucosa, vegetativa, eritematosa, infiltrativa ou papulopustular, que em alguns casos pode regredir espontaneamente (BARROS et al., 2011; BONIFAZ, 2017). Geralmente é mais frequente em crianças e indivíduos de bom estado de saúde, acometendo principalmente: face, pescoço, tronco e braços, muitas vezes se confundindo com outros problemas dermatológicos (RODRIGUES, 2010; FREITAS, 2014).

Figura 7. Forma cutânea fixa da esporotricose.



Fonte: Adaptado de Orofino-Costa et al., 2017

2.7.1.2 Linfocutânea

A forma linfocutânea (Figura 8) é a apresentação mais comum da esporotricose correspondendo mais de 75% dos casos (BARROS et al., 2011). No local da penetração, há a formação de uma pápula seguida do desenvolvimento de um nódulo subcutâneo que invade os canais linfagíticos regionais após algumas semanas, formando assim, uma cadeia de nódulos linfáticos, com pouca dor (OROFINO-COSTA et al., 2017). Estes nódulos podem amolecer e ulcerar ou ser endurecidos ao toque e com mobilidade pela pele, raramente apresentando regressão espontânea sem o tratamento adequado (CRUZ, 2013; RODRIGUES, 2010).

Figura 8. Forma linfocutânea da esporotricose.



Fonte: Adaptado de Freitas, 2014.

2.7.1.3 Cutânea disseminada

A forma cutânea disseminada é caracterizada pela disseminação hematogênica após o fungo conseguir penetrar na pele (FREITAS, 2014). Acomete principalmente pacientes imunodeprimidos, como por exemplo: alcoólatras, indivíduos com Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), usuários de drogas e medicamentos imunossupressores. No entanto é rara, sendo responsável por cerca de 5% dos casos (LOPES-BEZERRA et al., 2006; OROFINO-COSTA et al., 2017). Nesta apresentação da doença são observadas múltiplas lesões, como nódulos subcutâneos amolecidos que após semanas ou meses pode evoluir para pápulas e úlceras (FREITAS, 2014; RODRIGUES, 2010).

Diferente dos seres humanos, os gatos têm esta forma como a mais prevalente, particularmente, nos imunodeprimidos levando a uma fase letal da doença, devido ao progresso rápido, fazendo com que muitos felinos sejam sacrificados. Além dos nódulos pode-se observar alopecia, fístulas com exsudato serossanguinolento na cabeça, membros e base da cauda dos animais (LARSSON, 2011; SCHUBACH et al., 2004; GUSMÃO, 2017).

Figura 9. Forma cutânea disseminada da esporotricose em paciente alcoólico crônico.



Fonte: Adaptado de Bonifaz et al., 2017

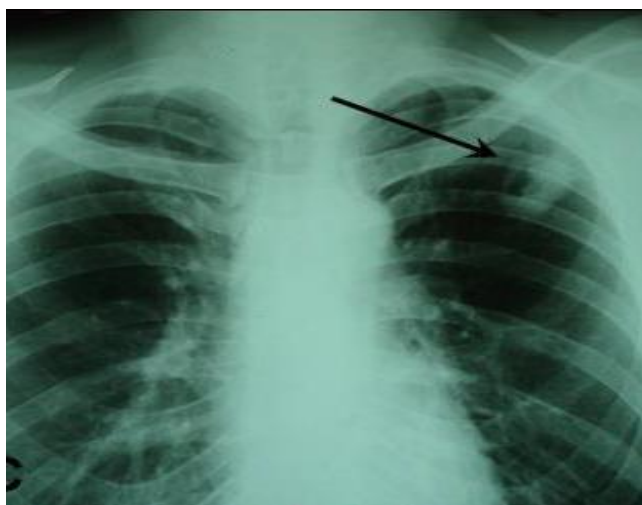
2.7.2 Formas extracutâneas

As formas extracutâneas são mais raras e de difícil diagnóstico, sendo geralmente encontradas em pacientes imunodeprimidos como no caso da AIDS, diabetes, etilismo, neoplasias, dentre outras situações. As vias de contaminação costumam ser inalatória ou disseminação hematogênica, após penetração do agente atingir vários órgãos como pulmão, testículos, ossos e articulações e cérebro. A sintomatologia é de acordo com o tecido acometido. As conformações osteoarticular e pulmonar são as mais frequentes de serem encontradas (BARROS et al., 2011; FREITAS, 2014).

A osteoarticular alcança em sua maior parte ossos dos membros superiores e inferiores, crânio e face, evidenciando-se granulomas ou lesões que levam a uma grande destruição óssea (FREITAS, 2014). A forma pulmonar tem imensa semelhança com a tuberculose e manifesta-se, na maioria dos casos, como doença primária quando se inala os conídios, do que por disseminação pela corrente sanguínea. Em radiografias podem-se identificar lesões nodulares, doença cavitária e linfadenomegalia (BARROS et al., 2011; AUNG et al., 2013).

A doença ainda pode ser expressa, incomumente, como ocular, atingir mucosa e nervosa, que pode evoluir para uma meningite crônica esporotricótica de difícil diagnóstico, devido à grande dificuldade de isolar este fungo deste órgão (BARROS et al., 2011; FREITAS, 2014).

Figura 10. Esporotricose extracutânea pulmonar (seta aponta para uma cavitação no pulmão esquerdo).



Fonte: Adaptado de Freitas, 2014.

2.8 DIAGNÓSTICO

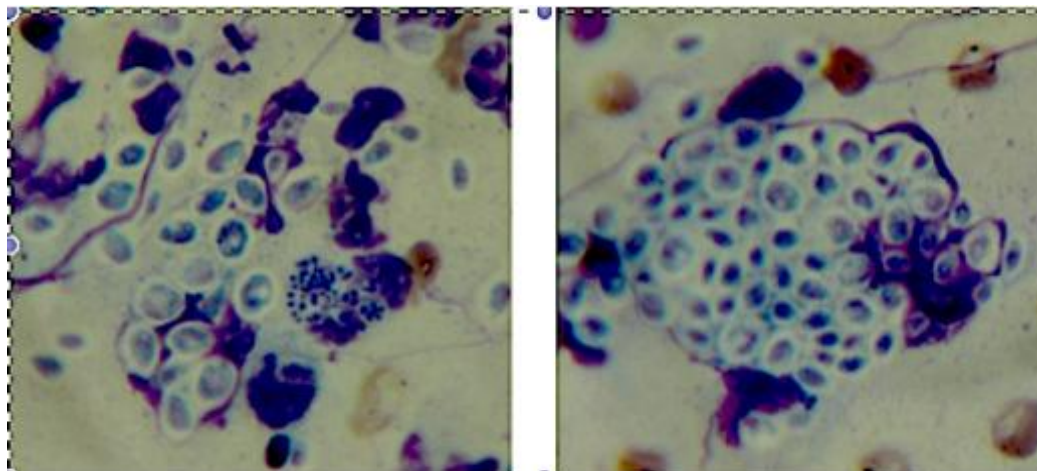
2.8.1 Exame direto

Apesar de ser um método diagnóstico, as estruturas fúngicas são raramente visualizadas (FREITAS, 2014). Quando feito o esfregaço, utiliza-se coloração de Gram ou Giemsa, como também, poderá ser realizado a fresco com KOH a 10% (OLIVEIRA, 2014). São escassamente observadas, leveduras arredondadas ou em forma de charuto, o que pode facilmente confundir com outros agentes; logo, não é conclusivo para o diagnóstico da esporotricose (BARROS et al., 2011).

2.8.2 Histopatológico

No exame histopatológico também há uma dificuldade para visualizar as formas leveduriformes, devido à escassez das mesmas nas lesões dos seres humanos e de cães, por isso, é mais utilizado para identificar esporotricose em felinos (BARROS et al., 2011). Assim como no EMD, serão visíveis, células gemulantes arredondadas, ovaladas ou alongadas lembrando um charuto, por o citoplasma se retrair tem-se a impressão da existência de uma cápsula, semelhante ao *Cryptococcus neoformans* (Figura 11) (CRUZ, 2013). Comumente, são colhidos materiais de mucosas e de lesões cutâneas e armazenadas em formalina a 10%, sendo enviados para executar o exame utilizando coloração de Hematoxilina-eosina (HE), impregnação pela prata de Grocott (IPG) e Periodic acid-Schiff (PAS). Mesmo sendo auxiliar no diagnóstico desta micose é de extrema importância que se faça o isolamento do agente através da cultura (CRUZ, 2013; LARSSON, 2011).

Figura 11. Leveduras arredondadas ou ovaladas de *Sporothrix* spp. livres ou dentro de macrófagos.



Fonte: Cruz, 2013

2.8.3 Cultura

A cultura é considerada a metodologia de escolha para o isolamento e identificação das espécies deste complexo, pois permite que se chegue a um diagnóstico seguro da patologia. Em função do seu dimorfismo é ideal utilizar meios de cultura seletivos para cada forma fúngica como o Agar Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion) (BHI), Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) ou Ágar Batata (Potato Dextrose Ágar) (PDA) (CRUZ, 2013).

Inicialmente, ao coletar a amostra faz-se seu isolamento em ASD acrescido de antibiótico, normalmente a ciclohexamida e o cloranfenicol, incubando a 25°C por 5 a 7 dias, para o crescimento da forma micelial, afim de obter a morfologia que é encontrada no meio ambiente (CRUZ, 2013; LARSSON, 2011). Logo após, para confirmar o diagnóstico de *Sporothrix* spp. e seu caráter dimórfico, semeia-se a amostra em meio BHI, incubando durante 3 a 5 dias em uma temperatura entre 35 a 37°C para o crescimento da levedura, a forma parasitária (BARROS et al., 2011).

Outro fator relevante é o estudo da conidiogênese do *Sporothrix* spp., sendo possível através do microcultivo em meio PDA ou Ágar Fubá (CMA) a 25°C por 10 a 14 dias, em que será possível visualizar conídios demáceos ou hialinos, como também seu formato característico semelhante a uma “margarida”, o que proporciona maiores evidências para se fechar o diagnóstico da esporotricose

(CRUZ, 2013; BARROS et al., 2011; LARSSON, 2011).

2.8.4 Molecular

A demora para a obtenção do diagnóstico das micoses, relacionada ao lento crescimento fúngico, estudiosos buscam novas metodologias que acelere os procedimentos para a identificação desses agentes nos laboratórios clínicos (CRUZ, 2013). A detecção molecular se baseia na reação da polimerase em cadeia (PCR) para se fazer a ampliação e o sequenciamento de genes das espécies fúngicas, utilizando *primers* para um gene codificador, em biopsia de pacientes (ABREU, 2017). Estes *primers* tomam por base o gene da quitina sintetase de *S. schenckii*, a partir de oligonucleotídeos específicos. Um estudo de Kanbe et al., (2005) relataram que os pares de *primers*, SSHF31/SSHR97 específico para *S.schenckii* e o conjunto SSLF64/SSHR97 para *S. luriei*, mostraram-se úteis para a identificação e distinção de espécies de forma rápida e eficaz (RODRIGUES, 2010).

Apesar e suas vantagens esta metodologia ainda é pouco empregada nos laboratórios de rotina, sendo mais utilizado para a realização de pesquisas clínicas e científicas (SCHUBACH et al., 2012).

2.9 TRATAMENTO

No Brasil, para o tratamento da esporotricose estão disponíveis drogas como o itraconazol, iodeto de potássio, terbinafina, anfotericina B, dentre outras, que são empregadas de acordo com a forma clínica que está acometendo o paciente (OROFINO-COSTA et al., 2017).

Atualmente, o itraconazol é a droga de escolha para as apresentações clínicas da esporotricose, devido a sua eficácia terapêutica, podendo ser usado tanto em indivíduos sadios como em imunocomprometidos (OROFINO-COSTA et al., 2017). Este medicamento age inibindo a síntese do ergosterol na membrana do fungo, sendo administrado por via oral numa dose de 100 á 400 mg/dia, dependendo da gravidade da doença (FREITAS, 2014; LOPES-BEZERRA et al.,

2006).

Outra droga bastante utilizada é o iodeto de potássio. Foi a primeira opção terapêutica da esporotricose, porém, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado. O que tem sido proposto é que ele atue no aumento da fagocitose, na elevação da proteólise dos granulomas e na quimiotaxia dos neutrófilos (OROFINO-COSTA et al., 2017; REIS et al., 2012).

A terbinafina é uma outra alternativa medicamentosa para as formas cutâneas da doença. Também é administrada por via oral, apresentando eficácia na dose de 250 mg/dia, através da inibição da síntese do ergosterol pela esqualeno-epoxidase (ABREU, 2017).

Já a anfotericina B é um fármaco de amplo espectro que deve ser administrado por via intravenosa, geralmente indicada nos casos moderados a graves da esporotricose, numa dosagem de 0,25 a 1 mg/kg/dia. Tem ação fungicida, devendo seu uso ser feito com cautela devido ao seu caráter cardiotoxico e nefrotóxico (LOPES-BEZERRA et al., 2006; FREITAS, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotípicamente isolados de *Sporothrix* spp. dentro do complexo *S. schenckii* e correlacioná-los com as formas clínicas da esporotricose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a amostra quanto aos aspectos epidemiológicos e fatores associados à micose;
- Avaliar a influência da temperatura (*in vitro*) no crescimento fúngico;
- Identificar fenotipicamente as cepas de *Sporothrix* spp., em suas espécies incidentes, previamente isoladas de pacientes atendidos no HULW-EBSERH;
- Relacionar as espécies identificadas com as formas clínicas da esporotricose.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTOS DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo, transversal e de caráter experimental de abordagem quantitativa.

4.2 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba. Os dados utilizados foram adquiridos do banco de dados do setor de micologia (SM), da Unidade Laboratório de Análises Clínicas (ULAC), do HULW-EBSERH.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Casos de esporotricose e as respectivas cepas de *Sporothrix* spp. isoladas, no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017, no SM-ULAC do HULW-EBSERH.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os casos negativos para esporotricose, nos períodos anteriores ou posterior ao que foi estabelecido na pesquisa.

4.5 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Foram utilizadas 24 cepas (Quadro 2) isoladas de pacientes atendidos pelo SM-ULAC do HULW-EBSERH, previamente identificadas como *Sporothrix* spp. Para correlação epidemiológica foram utilizados o banco de dados do SM-ULAC, do HULW-EBSERH.

Quadro 2. Cepas utilizadas para a pesquisa com seus respectivos códigos, forma clínica da doença e sexo do hospedeiro nos anos de 2016 e 2017.

CEPA	GENERO	FORMA CLÍNICA
22	Feminino	Cutâneo fixa
37	Feminino	Cutâneo fixa
44	Masculino	Linfocutânea
55	Feminino	Linfocutânea
76	Masculino	Cutâneo fixa
101	Feminino	Linfocutânea
467	Feminino	Linfocutânea
547	Feminino	Cutâneo fixa
568	Feminino	Linfocutânea
571	Feminino	Cutâneo fixa
680	Feminino	Cutâneo fixa
682	Feminino	Linfocutânea
695	Masculino	Linfocutânea
702	Feminino	Linfocutânea
707	Feminino	Cutâneo fixa
738	Feminino	Linfocutânea
751	Feminino	Cutâneo fixa
769	Masculino	Cutâneo fixa
776	Feminino	Linfocutânea
780	Masculino	Linfocutânea
781	Masculino	Cutâneo fixa
797	Masculino	Linfocutânea
809	Feminino	Linfocutânea
Her	Masculino	Cutâneo fixa

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley e obedecendo aos aspectos éticos do Conselho Nacional de Saúde foi assegurado o anonimato dos indivíduos que participaram da pesquisa. Foi pedida a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) recomendado pela Resolução N°466/2012 do CNS/MS que regulamenta a ética da pesquisa envolvendo seres humanos, pois o estudo é de caráter exploratório, sem a participação direta dos pacientes, utilizando apenas os dados arquivados SM-LAC, do HULW-EBSERH. O projeto foi aceito por meio do registro de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética, de número 88846018.2.0000.5183.

4.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.7.1 Ensaio morfológicos

4.7.1.1 Crescimento vegetativo em PDA

Previamente as cepas foram repicadas em PDA para serem isoladas, a temperatura ambiente por 10 dias, para se obter colônias viáveis. Em seguida, as cepas foram repicadas em placas para serem realizados os ensaios de crescimento vegetativo em meio PDA, na temperatura de 30°C por 21 dias. Para a caracterização macroscópica dos isolados foram estudados a superfície, textura e a coloração escura ou branca, do anverso e reverso, das colônias.

4.7.1.2 Microcultivo

Para a caracterização microscópica dos isolados foram estudadas: a presença ou não de conídios sésseis, o formato, a coloração, a ornamentação, a disposição dos conídios através da técnica de microcultivo de Riddell (1950). Amostras do fungo foram semeadas em uma grossa camada de meio PDA, em placas de Petri com câmara úmida, contendo lâmina estéril, posicionando uma

lamínula sobre o meio e incubando à 30°C por 10 dias. Após este período, as lamínulas foram removidas suavemente e dispostas em lâminas com lactofenol para visualizar as estruturas fúngicas em microscópio óptico (10, 40 e 100X) (NIKON eclipse) acoplado a câmera digital (NIKON DS-R12). Os conídios das imagens fotografadas tiveram o diâmetro dos conídios medidos pelo *software* NIS elements D, em que foram mensurados longitudinalmente 20 conídios em 5 campos de cada isolado. Posteriormente foi calculado o valor médio do diâmetro com os valores obtidos.

4.7.2 Ensaio fisiológicos

4.7.2.1 Crescimento vegetativo em diferentes temperaturas

De acordo com estudo realizado por Marimon et al. (2007) foram utilizadas as temperaturas de incubação discriminatórias para comparação durante crescimento vegetativo em 30, 35, 37 e 40°C.

Para o estudo do crescimento vegetativo em diferentes temperaturas os isolados de *Sporothrix* spp. foram repicados em placas de Petri contendo meio PDA, por 21 dias, em triplicata, nas temperaturas de 30, 35 e 37 e 40°C. Ao final deste período, as colônias foram medidas com paquímetro universal, onde dos valores obtidos calculou-se a média, para verificar a influência da temperatura na inibição do crescimento fúngico.

O efeito fungistático capaz de inibir o crescimento fúngico ou como fator fungicida capaz de inviabilizar as células fúngicas foi verificado na temperatura de 40°C. Depois estes isolados foram incubados a 28°C, por 14 dias.

4.7.2.2 Taxa de inibição de crescimento fúngico

Com as médias obtidas do diâmetro das colônias, foi calculada a taxa de inibição do crescimento para as temperaturas de 35, 37 e 40°C relacionando com o diâmetro a 30°C, pela equação descrita por Mesa-Arango et al. (2002):

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{DC a } 30^{\circ}\text{C} - \text{DC a } 35^{\circ}\text{C}}{\text{DC a } 30^{\circ}\text{C}} \times 100$$

Onde:

IC = inibição do crescimento

DC = diâmetro da colônia

4.7.3 Ensaio bioquímicos

As assimilações de fontes de carbono (glicose, rafinose, ribitol e sacarose), na concentração de 2% por conídios de *Sporothrix* spp. foram testadas em meio Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco), segundo protocolo de Marimon et al., (2007). Foram preparados meios YNB com cada açúcar.

Primeiramente as cepas de *Sporothrix* spp. foram previamente isoladas em PDA, a temperatura ambiente, durante 10 dias em tubos de ensaio. Após este período foi adicionado a cada tubo 3 ml de solução salina estéril. Em seguida, foi passada uma alça sobre a colônia, raspando lentamente para desprender os conídios. Esta solução de conídios foi transferida para um outro tubo e filtrada com gaze estéril. Logo depois, transferiu-se 1 ml da solução para uma cubeta para fazer a leitura em espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV-vis utilizando o *software* Simple Reads, em um comprimento de onda de 520nm, ajustando a absorbância numa faixa de 0,21 - 0,29 densidade ótica (DO), que corresponde um inóculo de 2×10^5 a 2×10^6 UFC/mL.

A viabilidade dos conídios foi verificada concomitantemente ao experimento, semeando 100 μ L da suspensão dos conídios em placa de Petri contendo PDA, incubando a temperatura ambiente por 10 dias.

Os ensaios foram realizados em triplicata em microplacas de diluição com fundo chato, inoculando 150 μ L do meio YNB com os açúcares em cada poço correspondente, adicionando 50 μ L do inóculo. A assimilação na presença da glicose foi considerado o controle positivo. Para o controle negativo foram utilizados poços com 150 μ L YNB, sem açúcar e 50 μ L inóculo. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C, por 10 dias. Neste período foi realizada a leitura nos tempos: 0, 5 e 10 dias, em leitor de microplacas de Elisa no comprimento de onda de 520 nm. A partir dos valores médios obtidos nas leituras foi considerado assimilação positiva a absorbância semelhante ao controle positivo ou acima da absorbância do controle negativo.

4.7.4 Classificação das espécies de *Sporothrix* spp.

Para a classificação das espécies do complexo *S. schenckii* foi utilizada como base a chave taxonômica desenvolvida por Rodrigues, A. M. (2010) (Adaptado de Marimon et al., 2007; 2008b).

1. Assimilação de sacarose negativa.....**2**
 Assimilação de sacarose positiva.....**3**
2. Colônias em Ágar batata a 35 °C não excedem 30 mm de diâmetro em 21 dias, conídios sésseis e pigmentados presentes, conídios simpodiais de 2 a 6 µm.....**S. brasiliensis**
 Colônias em PDA a 35 °C excedem 30 mm de diâmetro em 21 dias; conídios sésseis pigmentados ausentes, conídios simpodiais de 4 a 10 µm de longitude.....**S. luriei**
3. Colônias em PDA a 30 °C excedem os 50 mm de diâmetro aos 21 dias.....**4**
 Colônias em PDA a 30 °C não excedem os 50 mm de diâmetro aos 21 dias.....**5**
4. Assimilação de rafinose positiva; colônias em CMA a 30 °C apresentam coloração marrom em duas semanas.....**S. mexicana**
 Assimilação de rafinose negativa; colônias permanecem incolores em CMA a 30 °C em duas semanas.....**S. albicans**
5. Assimilação de rafinose negativa; temperatura máxima para o crescimento vegetativo é 35 °C; conídios sésseis pigmentados, globosos ou subglobosos.....**S. globosa**
 Assimilação de rafinose positiva; temperatura máxima para o crescimento vegetativo é 37 °C; conídios sésseis pigmentados predominantemente de outra forma.....**S. scheckii**

Após a identificação todos os isolados são preservados em tubos de ensaio inclinados com 10-15 mL de PDA a temperatura ambiente.

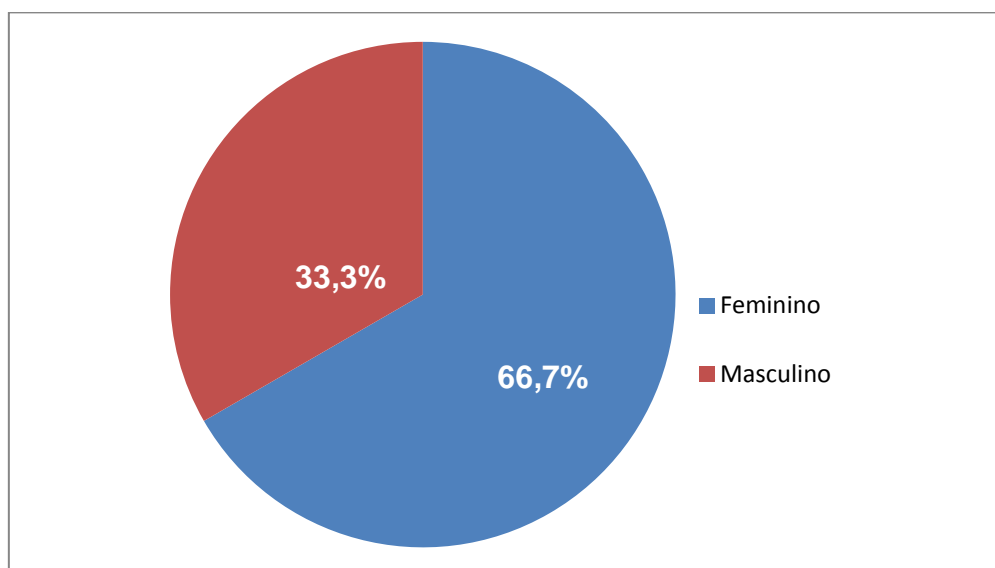
5 RESULTADOS

As cepas utilizadas nesta pesquisa foram provenientes do SM-ULAC do HULW-EBSERH, de culturas previamente identificadas como positivas para *Sporothrix* spp. Ao todo fez-se a análise de 24 cepas do período: janeiro de 2016 à dezembro de 2017. As cepas estavam mantidas a temperatura ambiente em tubos de ensaio com meio SDA.

5.1 DADOS PERCENTUAIS EM RELAÇÃO AO SEXO DOS PACIENTES E AS FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE

Os dados coletados na pesquisa através de informações presentes no SM - ULAC do HULW, foram o sexo do indivíduo e as formas clínicas da esporotricose. Do total de cepas, 66,7 % (n=16) das cepas eram pacientes do sexo feminino e 33,3% (n=8) masculino (Gráfico 1).

Gráfico 1. Percentual de esporotricose de acordo com o sexo de 24 pacientes assistidos no SM-LAC/HULW-EBSERH

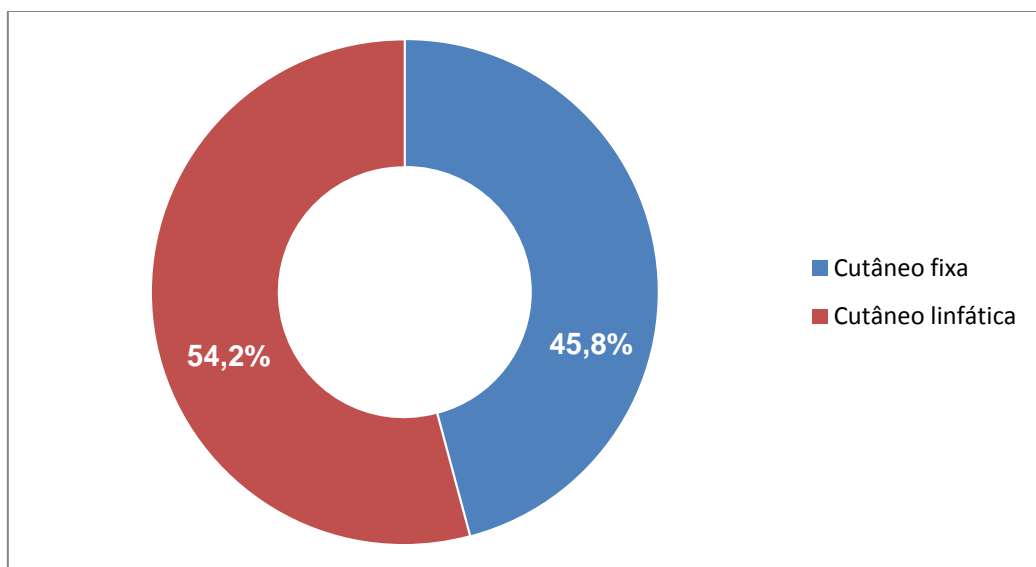


Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Em relação as formas clínicas, foi possível perceber que a totalidade dos casos foram de esporotricose cutânea, sob a forma cutânea fixa e cutânea linfática. Essa classificação foi baseada em observações do aspecto das lesões

descritas em um livro de registros interno do SM/ULAC. O gráfico 2 mostra a distribuição da esporotricose de acordo com o aspecto clínico, onde 54,2 % (n=13) dos casos foram da forma linfocutânea e 45,8% (n=11) representou a forma cutânea fixa ou localizada.

Gráfico 2. Percentual da ocorrência de 24 casos de esporotricose de acordo com a forma clínica.



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

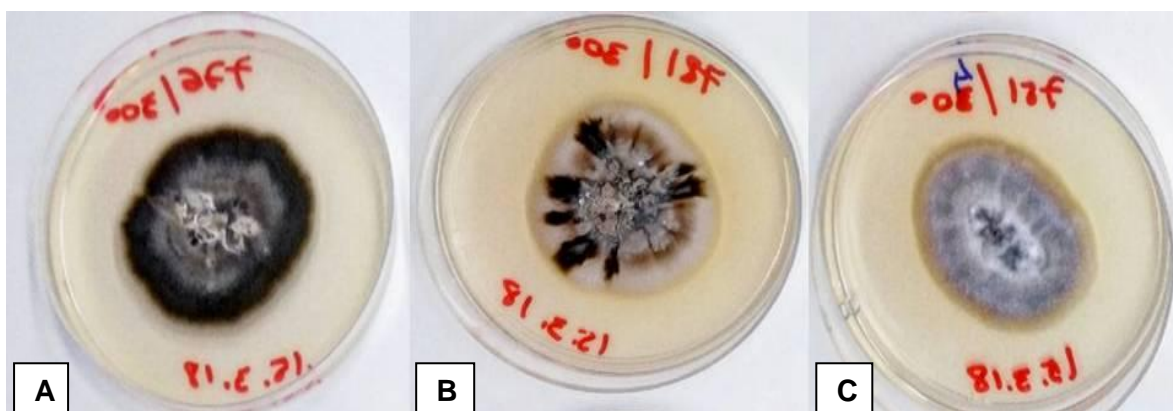
5.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

A partir das cepas repicadas em placa de Petri em meio PDA à 30°C durante 21 dias, realizou-se a análise das características macromorfológicas das colônias. Após esse período as colônias apresentaram-se com aparência variada, sendo estas divididas em 3 categorias: pretas, mescladas e claras.

As colônias pretas, foram as mais predominantes (14 amostras), apresentaram anverso e reverso negros, aspecto coriáceo ou aveludado, zonas definidas, com periferia bege a transparente (Figura 12 A).

As mescladas, mostraram-se com anverso e reverso marrons, áreas pretas, textura coriácea, sulcos definidos e periferia bege claro (Figura 12 B). Apenas 1 amostra tinha cor mais clara, sem áreas escuras e periferia bege claro (Figura 12 C).

Figura 12. Aspectos macromorfológicos das cepas de *Sporothrix* spp. repicadas em meio PDA à 30°C. A) colônia preta; B) colônia mesclada; C) colônia clara.

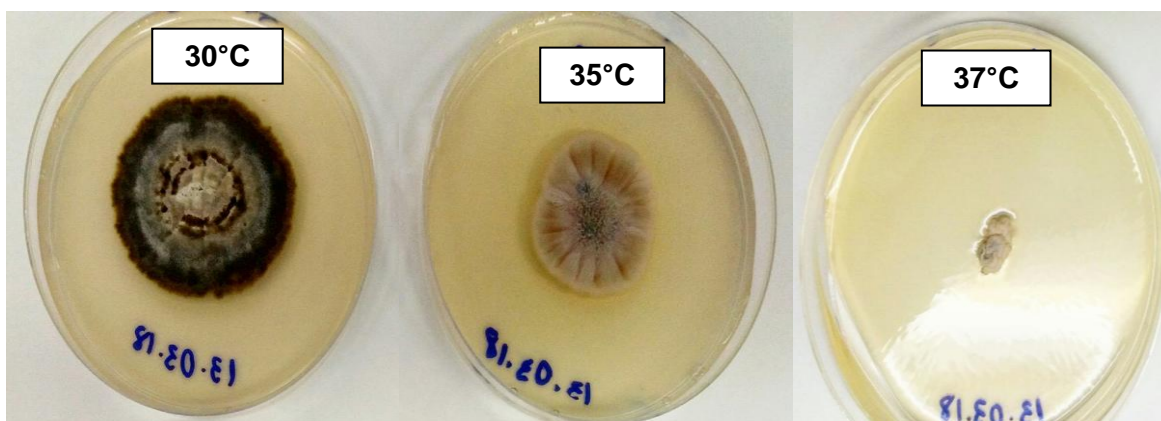


Fonte: Material da pesquisa, 2018.

5.3 DIÂMETRO DAS COLÔNIAS EM FUNÇÃO DAS TEMPERATURAS DE 30, 35, 37 e 40°C

Para se avaliar, a influência da temperatura no crescimento vegetativo, as amostras foram isoladas em meio PDA, por 21 dias, nestas 4 temperatura. Os termômetros e as temperaturas das estufas eram ajustadas e observadas regularmente. Após o tempo estabelecido, verificou-se a ausência de crescimento de todas as cepas incubadas a 40°C. Observou-se também que todas as cepas se desenvolveram a 30, 35 e 37°C, entretanto havia diferença de tamanho das colônias nestas diferentes temperaturas (Figura 13) .

Figura 13. Crescimento vegetativo em PDA nas temperaturas de 30, 35,37°C.



Fonte: Material da pesquisa, 2018.

Na Tabela 1 estão dispostos todos os diâmetros obtidos, nas temperaturas de 30, 35, 37 e 40°C, com as médias e os desvios padrões de crescimento. Pode-se observar que as colônias de *Sporothrix* spp. isoladas apresentaram-se com um bom crescimento nas temperaturas analisadas, com exceção na de 40°C, que não houve o crescimento de colônia. A média de crescimento e o desvio padrão foram de $43,5 \pm 3,04$, $29,4 \pm 9,78$ e $10,1 \pm 2,70$, nas temperaturas respectivamente de 30, 35 e 37°C.

Tabela 1. Diâmetro médio das colônias de cepas de *Sporothrix* spp., em meio PDA, em temperaturas variadas por 21 dias.

Código das cepas	Temperaturas			
	Diâmetro das colônias+ Desvio padrão			
	30°C	35°C	37°C	40°C
22	41,0 ± 1,76	16,0 ± 7,07	6,50 ± 0,70	0,00 ± 0,00
37	39,3 ± 1,06	23,0 ± 2,82	11,5 ± 0,70	0,00 ± 0,00
44	45,0 ± 1,06	33,3 ± 0,35	10,3 ± 0,35	0,00 ± 0,00
55	42,0 ± 1,76	22,5 ± 3,53	10,0 ± 1,76	0,00 ± 0,00
76	43,0 ± 4,94	30,5 ± 0,70	7,50 ± 3,53	0,00 ± 0,00
101	45,0 ± 2,82	32,0 ± 4,24	12,0 ± 2,82	0,00 ± 0,00
467	47,8 ± 1,76	21,3 ± 0,00	9,30 ± 2,47	0,00 ± 0,00
547	41,5 ± 0,00	16,0 ± 0,70	8,30 ± 3,88	0,00 ± 0,00
568	38,5 ± 3,53	16,5 ± 2,82	6,50 ± 1,41	0,00 ± 0,00
571	42,8 ± 0,35	30,3 ± 0,35	5,50 ± 0,00	0,00 ± 0,00
680	39,3 ± 0,35	17,3 ± 1,76	8,30 ± 0,35	0,00 ± 0,00
682	44,0 ± 2,82	34,3 ± 1,06	15,3 ± 2,47	0,00 ± 0,00
695	45,5 ± 0,00	29,8 ± 0,35	9,30 ± 1,76	0,00 ± 0,00
702	42,3 ± 0,35	24,5 ± 0,00	10,5 ± 1,41	0,00 ± 0,00
707	44,0 ± 4,24	32,3 ± 1,76	7,50 ± 0,00	0,00 ± 0,00
738	46,0 ± 2,12	34,3 ± 1,76	13,3 ± 1,06	0,00 ± 0,00
751	42,0 ± 2,82	34,5 ± 2,82	16,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
769	43,0 ± 0,00	14,3 ± 6,01	10,8 ± 1,76	0,00 ± 0,00
776	50,5 ± 1,41	32,0 ± 1,76	12,5 ± 1,41	0,00 ± 0,00
780	48,5 ± 5,65	33,8 ± 5,30	12,0 ± 1,06	0,00 ± 0,00
781	47,5 ± 0,00	35,3 ± 2,47	7,30 ± 0,35	0,00 ± 0,00
797	43,0 ± 0,70	38,5 ± 1,06	14,3 ± 3,18	0,00 ± 0,00
809	41,5 ± 2,12	31,5 ± 0,70	9,80 ± 3,18	0,00 ± 0,00
Her	40,8 ± 2,47	31,5 ± 0,00	10,0 ± 2,12	0,00 ± 0,00
Média (n=24)	43,5 ± 3,04	29,4 ± 9,78	10,1 ± 2,70	0,00 ± 0,00

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

As médias de crescimento das colônias de acordo com as formas clínicas da esporotricose também foram avaliadas. Foi observado que em todas as temperaturas analisadas o diâmetro das colônias de cepas isoladas da forma linfocutânea foram um pouco maiores que as das cepas da forma cutânea fixa (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetro das colônias incubadas em meio PDA, em diferentes temperaturas, por 21 dias de acordo com as formas clínicas da esporotricose.

Esporotricose	Temperaturas		
	Diâmetro das colônias + desvio padrão		
Forma clínica	30 °C	35 °C	37 °C
Linfocutânea	44,6 ± 3,22	29,5 ± 6,34	11,1 ± 2,37
Cutânea fixa	42,2 ± 2,31	25,5 ± 8,28	9,01 ± 2,93

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

5.4 TAXA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

A taxa de inibição do crescimento das cepas foi calculada, através das médias do diâmetro das colônias nas temperaturas de 35, 37 e 40°C, em relação ao crescimento em 30 °C, segundo a equação de Mesa-Arango et al. (2002). Mediante os valores descritos na tabela 3, entende-se que as cepas de *Sporothrix* spp. estudadas apresentaram uma baixa inibição do crescimento a 35°C, uma vez que as cepas incubadas a 35°C apresentaram em média uma redução do diâmetro da colônia de 36,5% quando comparadas com o diâmetro da cepa a 30°C. Entretanto, o fungo é moderadamente inibido quando incubado a 37°C, uma vez que observou-se uma redução média de 76,5% do diâmetro do fungo a esta temperatura, quando comparado ao crescimento a 30°C.

Tabela 3. Percentual de inibição de crescimento das 24 cepas em relação a temperatura de 30 °C.

Inibição do crescimento (%) em relação a temperatura de 30°C			
Código das cepas	35°C	37°C	40°C
22	60,9	84,1	100
37	41,5	70,7	100
44	26	77,1	100
55	46,4	76,1	100
76	29	82,5	100
101	28,8	73,3	100
467	55,4	80,5	100
547	61,4	80	100
568	57,1	83,1	100
571	29,2	87,1	100
680	55,9	78,8	100
682	22	65,2	100
695	34,5	79,5	100
702	42	75,2	100
707	26,6	82,9	100
738	25,4	71	100
751	17,9	61,9	100
769	66,7	74,8	100
776	36,6	75,2	100
780	30,3	75,2	100
781	25,7	84,6	100
797	10,9	66,7	100
809	24	76,4	100
Her	22,8	75,5	100
Média+ DP	36,5 ± 14,8	76,5 ± 6,32	100 ± 0,00

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Com relação as formas clínicas, as cepas provenientes da forma cutânea fixa apresentaram um maior percentual médio de inibição de crescimento quando comparada as cepas da forma linfocutânea como ilustrado na tabela 4.

Tabela 4. Percentual médio de inibição de crescimento de 24 cepas de *Sporothrix* spp., a 35 e 37°C, de acordo com a forma clínica da esporotricose.

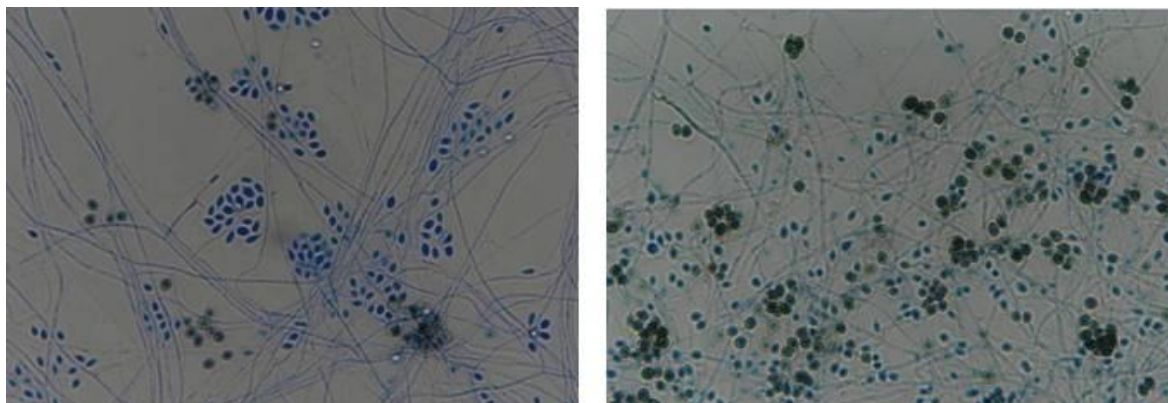
Esporotricose Forma clínica	Temperatura	
	35 °C	37 °C
Cutânea fixa	39,8 %	78,4 %
Linfocutânea	33,8 %	74,9 %

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

5.5 ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Quanto ao aspecto microscópico todas as cepas de *Sporothrix* spp. mostraram arranjos semelhantes. Foi visto, hifas hialinas, septadas, ramificadas, a presença de conídios simpodiais hialinos, dispostos na extremidade do conidióforo e conídios sésseis pigmentados, de coloração marrom. Os conídios apresentaram formas variadas em uma mesma lâmina, com frequência dos formatos obovóides, globosos e subglobosos (Figura 14).

Figura 14. Presença de conídios sésseis pigmentados, após 10 dias de desenvolvimento em meio PDA a 30° C. Lâmina corada com lactofenol-100x.



Fonte: Material da pesquisa, 2018.

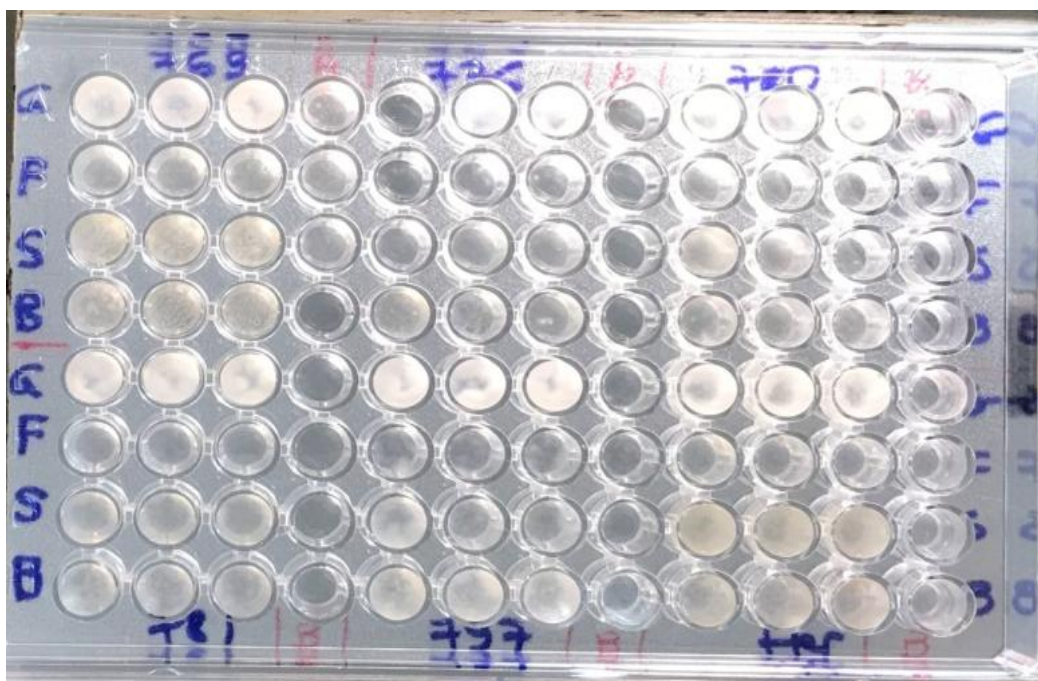
Quanto ao diâmetro dos conídios, os mesmos foram escolhidos aleatoriamente, escolhendo os melhores campos para se fazer a medição. Foram medidos 20 conídios por campo, em 5 campos, totalizando 100 conídios por lâmina. Ao final calculou-se o diâmetro médio, obtendo os seguintes valores:

- Conídios simpodiais: entre 2,44 - 4,46; média = 3,07 μm
- Conídios sésseis: entre 2,26 - 4,51; média = 3,18 μm

5.6 PERFIL DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES CARBONADAS

Neste teste foi avaliada a capacidade de assimilação dos açúcares glicose (GL), rafinose (RF), sacarose (SC) e ribitol (RB), distribuídos em microplacas em triplicata para cada amostra (Figura 15). Após leitura do teste, no quinto e décimo dia, notou-se que todas as 24 amostras foram capazes de assimilar a glicose, controle positivo e o controle negativo não apresentou alteração.

Figura 15. Assimilação de açúcares, em microplacas por cepas de *Sporothrix* spp., incubadas a 30° C por 10 dias



Fonte: Material da pesquisa, 2018.

A leitura do décimo dia foi considerada para definir o perfil de assimilação. Dos valores obtidos foi feita uma análise estatística entre as assimilações e o controle negativo utilizando o Teste T student aos pares-SPSS, o resultado está descrito na tabela 5.

Tabela 5. Assimilações de fontes de carbono pelas 24 cepas de *Sporothrix* spp., após incubação a 25° C por 10 dias.

<i>Sporothrix</i> spp.	ASSIMILAÇÃO DOS AÇUCARES			
Código das cepas	GL	RF	SC	RB
22	+	-	+	+
37	+	+	+	+
44	+	-	+	+
55	+	-	+	-
76	+	-	+	+
101	+	+	+	+
467	+	-	-	+
547	+	-	+	+
568	+	-	-	+
571	+	-	+	+
680	+	+	-	-
682	+	-	-	+
695	+	-	+	+
702	+	-	+	+
707	+	-	-	+
738	+	-	-	+
751	+	+	+	+
769	+	-	+	-
776	+	+	+	+
780	+	+	+	+
781	+	+	+	+
797	+	+	+	+
809	+	-	+	+
Her	+	-	+	+

- GL (glicose); RF (rafinose); SC (sacarose); RB (ribitol).

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

5.7 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Para a identificação das espécies, com base na chave taxonômica adaptada por Marimon et. al. (2007), todos os parâmetros foram considerados, desde os aspectos morfológicos à assimilação de açúcares pelas cepas de *Sporothrix* spp.. Conforme pode-se observar na tabela 6, das 24 cepas analisadas, 18 foram identificadas como *S. schenckii* e 6 cepas como *S. brasiliensis*. Os estudos mostraram limitações com relação a chave de identificação quando tentou-se identificar algumas cepas. As cepas 22, 44, 76, 547, 671, 695, 702, 809 e Her, apresentaram assimilação da rafinose negativa. Pela chave de identificação este resultado levaria para *S. globosa*, entretanto, outros fatores foram avaliados, principalmente, o crescimento vegetativo, onde as características indicaram para *S. schenckii*. Uma outra espécie identificada foi *S. brasiliensis*, utilizando a assimilação de sacarose e rafinose negativa resultantes de algumas cepas, como também, as características macro e micromorfológicas.

Tabela 6. Identificação das espécies dentro do Complexo *S. schenckii*, através de suas características fenotípicas, segundo chave taxonômica de Rodrigues, A. M. (2010) (Adaptado de Marimon et al., 2007; 2008b).

Código das cepas	Espécie	Código das cepas	Espécie
22	<i>S. schenckii</i>	695	<i>S. schenckii</i>
37	<i>S. schenckii</i>	702	<i>S. schenckii</i>
44	<i>S. schenckii</i>	707	<i>S. brasiliensis</i>
55	<i>S. schenckii</i>	738	<i>S. brasiliensis</i>
76	<i>S. schenckii</i>	751	<i>S. schenckii</i>
101	<i>S. schenckii</i>	769	<i>S. schenckii</i>
467	<i>S. brasiliensis</i>	776	<i>S. schenckii</i>
547	<i>S. schenckii</i>	780	<i>S. schenckii</i>
568	<i>S. brasiliensis</i>	781	<i>S. schenckii</i>
571	<i>S. schenckii</i>	797	<i>S. schenckii</i>
680	<i>S. brasiliensis</i>	809	<i>S. schenckii</i>
682	<i>S. brasiliensis</i>	Her	<i>S. schenckii</i>

A partir da identificação das espécies foi possível uma correlação com as formas clínicas da esporotricose. Como demonstrado na Tabela 7, tanto a forma linfocutânea quanto a cutânea fixa, tiveram como agentes etiológicos as duas espécies aqui classificadas.

Tabela 7. Correlação entre as espécies *S. schenckii* e *S. brasiliensis* identificadas e as formas clínicas da esporotricose.

Esporotricose - Formas clínicas			
Linfocutânea		Cutânea fixa	
Código	Espécie	Código	Espécie
44	<i>S. schenckii</i>	22	<i>S. schenckii</i>
55	<i>S. schenckii</i>	37	<i>S. schenckii</i>
101	<i>S. schenckii</i>	76	<i>S. schenckii</i>
467	<i>S. brasiliensis</i>	547	<i>S. schenckii</i>
568	<i>S. brasiliensis</i>	571	<i>S. schenckii</i>
682	<i>S. brasiliensis</i>	680	<i>S. brasiliensis</i>
695	<i>S. schenckii</i>	707	<i>S. brasiliensis</i>
702	<i>S. schenckii</i>	751	<i>S. schenckii</i>
738	<i>S. brasiliensis</i>	769	<i>S. schenckii</i>
776	<i>S. schenckii</i>	781	<i>S. schenckii</i>
780	<i>S. schenckii</i>	Her	<i>S. schenckii</i>
797	<i>S. schenckii</i>		
809	<i>S. schenckii</i>		

Na tabela 8 estão dispostos os percentuais das formas clínicas da esporotricose causadas pelas espécies identificadas: *S. schenckii* e *S. brasiliensis*.

Tabela 8. Percentual das 24 espécies de *Sporothrix* spp. por forma clínica da esporotricose.

Esporotricose Forma clínica	<i>S. schenckii</i>	<i>S. brasiliensis</i>
Linfocutânea	69,2 %	30,8 %
Cutânea fixa	81,8 %	18,2 %

6 DISCUSSÃO

Por mais de 100 anos, a esporotricose foi considerada tendo *Sporothrix schenckii* como único agente causador, mas estudos recentes mostraram que *Sporothrix schenckii* trata-se de um complexo de espécies. Desde então, métodos fenotípicos e moleculares vem sendo desenvolvidos por diversos autores como meios para identificar as espécies pertencentes ao complexo, contribuindo para a epidemiologia, tratamento e prevenção da doença (MARIMON et al. 2007, 2008).

No presente estudo foram reproduzidos os métodos fenotípicos para classificar as cepas provindas de pacientes assistidos em um hospital em João Pessoa. Das 24 amostras analisadas, 66,7% (n=16) eram de pacientes do sexo feminino, o que vai de acordo com o estudo epidemiológico de Barros et al. (2010), os quais apontam o maior acometimento das mulheres o que deve-se a maior permanência destas em casa e assim, ter mais contato com os felinos, que atualmente, são o maior transmissor da infecção para o homem. Segundo dados da Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro (2016), área endêmica da esporotricose, 66,2% dos indivíduos acometidos entre 2013 a 2016 eram mulheres. Ainda de acordo com estudos de Barros et al. (2008; 2010), a forma linfocutânea é a mais comum dentre os casos de esporotricose humana, nos resultados obtidos, tivemos um total de 54,2%, seguida de 45,8% da forma cutânea fixa.

A partir de espécimes clínicas destas lesões anteriormente citadas, se fez a cultura para a identificação fenotípica do possível agente infeccioso implicado. A primeira etapa da identificação foi a análise macromorfológica da colônia em que foram observadas diferenças quando comparadas com os resultados apresentados por Marimon et al. (2007), Rodrigues (2010) e Abreu (2017). Segundo Marimon et al. (2007) as colônias quando cultivadas em meio PDA, eram laranja pálida à laranja acinzentadas e de coloração castanho escura em meio CMA. Rodrigues (2010) relata que as colônias tinham cor branca a creme em meio PDA, assim como, Abreu (2017), onde as colônias apresentaram uma coloração clara após 21 dias de incubação em PDA. .

No estudo de Madrid et al. (2011) foi observado a coloração de creme-acinzentadas ou creme-acastanhada das colônias, o que se pode comparar com

as colônias classificadas como mescladas nesta pesquisa. Entretanto, a maioria das cepas deste estudo apresentaram coloração negra, marrom escura à preta, o que nos leva a acreditar que houve uma grande produção de melanina por algumas delas. A melanina é um importante fator de virulência do gênero *Sporothrix* spp., pois serve como um fator de resistência para a sobrevivência do fungo ao meio ambiente e as agressões que pode sofrer (ALMEIDA-PAES et al., 2009; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000).

As amostras quando disponibilizadas pelo SM-LAC/HULW-EBSERH, semeadas em meio ASA, já apresentavam uma coloração negra, depois isoladas em PDA a maioria persistiu com esta coloração desde o início de seu crescimento. É sabido que a glicose é um grande influenciador da produção de melanina pelo fungo (ALMEIDA-PAES et al., 2009). Entretanto, em outros estudos (MARIMON, et. al., 2007; RODRIGUES, 2010; ABREU, 2017) as colônias conseguiram mostrar-se de coloração clara em meio PDA. Uma hipótese para esta cor escura seria o fato do clima mais quente desta região tropical do Brasil, o que pode ter feito com que o fungo desenvolvesse mecanismos de defesa como a melanina em sua forma filamentosa, aumentando a sua termotolerância.

Em questão do crescimento vegetativo foi notável a alta termotolerância das cepas, onde as mesmas, em temperaturas como 35 e 37°C cresceram acima da média observada em outros estudos. Exemplo disto é que as médias de crescimento a 35 e 37°C por Rodrigues (2010) foram respectivamente de 9,76 e 6,03; enquanto que em nossos resultados, as médias para as mesmas temperaturas foram respectivamente de 29,4 e 10,1°C, mostrando que estes isolados apresentaram alta resistência a temperatura de incubação.

As cepas de *Sporothrix* spp. também foram incubadas na temperatura de 40°C, onde não foi observado crescimento de colônia após 21 dias, entretanto, estes mesmos inóculos quando reincubadas por 14 dias a temperatura ambiente, houve crescimento vegetativo, o que mostra que ocorreu uma inibição de crescimento, ou seja, um efeito fungistático, mas não a inativação das células fúngicas, o que seria um efeito fungicida, diferentemente do estudo de Rodrigues (2010) que após os 14 dias de incubação as cepas de *Sporothrix* spp. permaneceram inertes quanto ao crescimento.

A termotolerância também é um importante fator de patogenicidade de

Sporothrix spp. e esta relacionada a disseminação do fungo para os órgãos (TACHIBANA et al., 2001; MADRID et al., 2011). A partir disso, foi medida a taxa de inibição do crescimento que foram relativamente baixas quando comparadas as relatadas por Rodrigues (2010).

Neste estudo, quando foi correlacionado as formas formas clínicas da esporotricose com a taxa de inibição do crescimento das cepas por temperaturas foi observado 39,8% de inibição a 35°C e 78,4% a 37°C na forma cutânea fixa e de 33,8% a 35°C e 74,9% a 37°C na forma linfocutânea. Resultados estes que corroboram com os estudos de Fernandes et al. (2009) e Mesa-Arango et al. (2002), que ao testarem a termotolerância de cepas nestas temperaturas, demonstraram uma maior inibição do crescimento na forma cutânea fixa, quando comparadas a outras formas clínicas. Esta inibição de crescimento das cepas na cutânea fixa também concorda com o diâmetro médio das colônias por formas clínicas, em que na linfocutânea mostrou maior potencial de crescimento das cepas nas temperaturas de 30, 35 e 37°C.

Na análise microscópica houve a produção de numerosos conídios sésseis pigmentados em todas as 24 cepas estudadas, apresentando morfologia semelhante entre elas. Os conídios sésseis, geralmente foram globosos, subglobosos e ovóides; enquanto que os simpodiais eram obovóides ou elípticos, com diâmetro médio de 3,18 µm para os sésseis e 3,07 µm para os simpodiais. Todas as espécies do Complexo *S. schenckii*, exceto *S. luriei*, apresentam conídios sésseis pigmentados, segundo Marimon et al. (2007, 2008) esta coloração é devido a produção de melanina pelo fungo, que em meio contendo glicose pode ter sua produção aumentada (ALMEIDA-PAES et al., 2009). Como nesta pesquisa os conídios não exibiram grande variabilidade nas formas como descrito por Marimon et al. (2007) e Rodrigues (2010), os parâmetros micromorfológicos foram avaliados com cautela e usados como dados complementares com os outros parâmetros fenotípicos para a identificação das espécies fúngicas.

O perfil de assimilação de açúcares foi o parâmetro que mais apresentou divergências. A metodologia foi seguida conforme descrito por Marimon et al. (2007) e reproduzida por Rodrigues (2010); entretanto, discrepâncias na assimilação dos açúcares rafinose e sacarose foram constantes por certas cepas.

A análise foi realizada duas vezes para observar as diferenças. A glicose como controle positivo foi assimilada por todas as cepas e o controle negativo, que possuía apenas o meio YNB com o inóculo fúngico não apresentou assimilação. O ribitol também não expôs muitas discordâncias, sendo positivo na maioria das amostras.

Muitas das cepas tiveram como resultado negativo para a assimilação da rafinose, sendo positiva para os outros açúcares. Se usássemos apenas a assimilação como parâmetro de identificação estes isolados apontariam para a espécie *S. globosa*. Todavia, como a identificação fenotípica é um conjunto de métodos para desdobrar a bioquímica, fisiologia e morfologia das espécies (MARIMON et al., 2007), comparamos os resultados da assimilação com as características morfológicas e fisiológicas encontradas no estudo. Pós análise, a possibilidade de ser *S. globosa* foi descartada, pois segundo Marimon et al. (2007), Rodrigues (2010) e Rodrigues et al. (2013), esta espécie tem diâmetro maior que 50 mm a 30°C e não apresenta crescimento a 37°C, o que não corrobora com este estudo, onde as 24 cepas cresceram a 37°C.

Desta maneira, ao analisar todas as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, identificou-se as espécies de acordo com estes parâmetros, ressaltando que trata-se de uma classificação sugestiva, devido as discordâncias que apareceram em relação a chave taxonômica proposta por Marimon et al. (2007).

As espécies identificadas neste estudo foram 75% (n=18) *S. schenckii* e 25% (n=6) *S. brasiliensis*. Segundo Rodrigues et al. (2014) das 20 amostras analisadas da região Nordeste 65% (n=13) eram de *S. schenckii* e 20% (n=4) de *S. brasiliensis*. O mesmo autor em 2010, classificou as 3 amostras provenientes do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB como *S. schenckii*, após estudo fenotípico e genotípico.

Segundo dados do Sul e Sudeste, *S. brasiliensis* é a espécie predominante nestas regiões, sendo os gatos os principais hospedeiros e diretamente relacionados com a ocorrência desta espécie em seres humanos. Entretanto, a prevalência da espécie numa mesma região pode variar. No estado do Rio de Janeiro, *S. brasiliensis* é a espécie predominante nos casos de esporotricose humana; enquanto, que em São Paulo, onde não há epidemia felina, a espécie

predominante em humanos é *S. schenckii*.

Ao correlacionar as espécies identificadas com as formas clínicas da esporotricose foi visto que, as duas espécies foram causadoras tanto da forma linfocutânea, quanto da forma cutânea fixa, sendo *S. schenckii* mais prevalente em ambos os casos, respectivamente 69,2% e 81,8%.

Segundo a literatura, a espécie *S. schenckii*, está relacionada as fontes ambientais de infecção, onde animais ou humanos adquirem o fungo através de vegetais contaminados (BARROS et al., 2001). Já *S. brasiliensis* é considerada a espécie mais patogênica do complexo, principalmente, devido a sua termotolerância e estando diretamente relacionado com a transmissão zoonótica da doença (RODRIGUES et al., 2014; ALMEIDA-PAES et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016b).

Apesar do estudo fenotípico da espécie fúngica ser uma ferramenta importante para um maior conhecimento das características do fungo, ele não define, com total certeza, a identificação das espécies. Exemplo disto, foi um trabalho realizado por Mahmoudi et al. (2016), que utilizaram 7 isolados clínicos e pelo método de classificação fenotípica, 3 amostras foram discordantes da classificação molecular. Oliveira et. al. (2011), também relataram problemas na identificação fenotípica, em que, dos 246 isolados do Rio de Janeiro, 25 não puderam ser classificadas dentre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, apenas com seu fenótipo, e uma das cepas foi erroneamente identificada como *S. mexicana*.

Desta forma metodologias moleculares mostram-se de extrema importância para a identificação de espécies morfológicamente semelhantes (OLIVEIRA et al., 2014). Técnicas como o PCR-RFLP (PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação) são rápidas, de fácil metodologia e identificação (RODRIGUES et al., 2014). A realização de estudos moleculares frente as cepas desta pesquisa poderá levar a um melhor entendimento das diferenças morfológicas que foram observadas, e assim, poder intervir de forma mais efetiva na prevenção e tratamento da doença.

7 CONCLUSÃO

- Com base nos estudos realizados pode-se concluir que o sexo feminino é o mais acometido pela esporotricose, sendo a forma linfocutânea da doença a mais prevalente;
- As cepas estudadas demonstraram heterogenicidade quanto aos parâmetros morfológicos que foram avaliados;
- As amostras apresentaram alta pigmentação em suas características macro e micromorfológicas, o que sugere que houve uma maior produção de melanina;
- Os isolados apresentaram alta taxa de crescimento, em comparação com a literatura, nas temperaturas de 30, 35 e 37 °C com ausência total de crescimento a 40 °C, entretanto a temperatura teve efeito fungistático nas cepas ensaiadas.
- O perfil de assimilação de açúcares entre as espécies apresentaram padrões distintos na maioria das cepas, principalmente na rafinose;
- A espécie prevalente dentre as cepas estudadas é *S. schenckii*, que é predominante na região nordeste segundo pesquisas recentes, seguidas de *S. brasiliensis*;
- Tanto *S. schenckii* quanto *S. brasiliensis* foram capazes de causar as duas formas clínicas encontradas neste estudo, sendo *S. schenckii* com um maior percentual em ambas as formas;
- A identificação fenotípica, mostrou-se de grande valia para um melhor conhecimento das características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, oriundas de um hospital em João Pessoa. Entretanto, apresenta divergências que precisam ser melhor estudadas, conjuntamente as metodologias genômicas.

REFERÊNCIAS

ANTUNES , T.A.; NOBRE, M.O.; FARIA, R.O.; MEINERZ, A.R.M.; MARTINS, A.A.; CLEFF, M.B.; FERNADES, C.L.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose cutânea experimental: avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.** v. 42, p. 23,2009.

ALMEIDA-PAES, R., FRASES, S., MONTEIRO, P. C. F., GUTIERREZ-GALHARDO, M. C., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. & NOSANCHUK, J. N. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection.** 11(5): 554-562, April, 2009.

ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, L.C.; OLIVEIRA, M.M.E., GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; NOSANCHUK, J.D. and ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the Sporothrix Complex. **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 212308, 10 pages, 2015.

AUNG, A.K.; TEH, B.M.; MCGRATH, C.; THOMPSON, P.J. Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. **Med Mycology.** v. 51, p. 534-544, Jul, 2013.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. M. P.; GALHARDO, M. C. G.; SCHBACH, A. O.; MONTEIRO, P. C. F.; REIS, R. S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; LAZÉRA, M. S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T. C. M.; MARZOCHI, K. B. F.; WANKE, B.; VALLE, A.C. F. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777-779, 2001.

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

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; WANKE, B. and LAMBERT-PASSOS, S. R. Na epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol. Infect.* v. 136 (9), p. 1192-1196, Sep, 2008.

BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clin. Microbiol.** v. 24, v. 4, p.633-654, 2011.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SANCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. *J. Fungi.* v. 3 (1): 6. Mar, 2017.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; MOCHIZUKI, T. and LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.

CRUZ, L.C.H.. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Vet e Zootec.**, v.20, p. 08-28, 2013.

DIXON, D.M.; SALKIN, I.F.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J.; HAINES, J.H.; KEMNA, M.E. et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **J. Clin. Microbio.**, v. 29, p.1106-1013, 1991.

FERNANDES, G.F.; SANTOS, P.O.; AMARAL, C.C.; SASAKI, 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. **The Open Mycol J**, v. 3, p. 48-58, 2009.

FREITAS, D. F. S. **Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos , clínicos e terapêuticos associados à esporotricose.** Tese (Doutorado em Medicina Tropical) 164f.- INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Rio de Janeiro, Fev. 2014.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira et al. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.

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

GUSMÃO, B. S. Esporotricose felina, uma doença emergente de risco a saúde pública: Aspectos clínicos-epidemiológicos. **Rev. Cien. Med. Vet**, v. 28, p. 1-7, Jan. 2017.

HEIDRICH, D.; SENTER, L.; VALENTE, P.; STOPIGLIA, C.D.O.; VETORATTO, G.; SCROFERNEKER, M.L. Sucesso terapêutico da terbinafina em um caso de esporotricose. **An. Bras. Dermatol.** v. 86, p.182-185, 2011.

HEKTOEN, L. & PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal of Experimental Medicine**. 5: 77-89, Oct. 1900.

LARSSON, C.E. Esporotricose. **Braz. J. Vet Res. Anim. Sci.**, São Paulo. v. 48, p. 250-259, 2011.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O.. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 78(2), p.293-308, 2006.

LUTZ, A. & SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. Contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Rev. Med. S. Paulo**. 10(21): 433-450, 1907.

MADRID, I.M.; XAVIER, M.O.; MATTEI, A.S.; FERNANDES, C.G.; GUIM, T.N.; SANTIN, R. et al. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes Infect.**, v.12, p.162-165, Fev. 2010.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v.2, p.1-13, 2014.

MAHMOUDI, S.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P.; SAFARA, M.; HEIDARI, M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. **Medical Mycology**, v. 54, n. 6, p. 593-599, 2016.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species in clinical interest. **J. Clin. Microbiol.**, v.45(10), p. 3198-3306, Oct. 2007.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Med. Mycology**, v. 46 (6), p. 621-625, Sep. 2008.

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. **Journal of Clinical Microbiology**. 40(8): 3004–3011, Aug. 2002.

OLIVEIRA, M.M.E; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M.M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 257-267, 2011.

OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em micologia médica**. 4ª edição. Rio de Janeiro, 2014.

OROFINO-COSTA, R.; RODRIGUES, A.M.; MACEDO, P.M.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 606-620, Oct. 2017.

PIRES, C. Revisão de literatura: Esporotricose felina. **Rev. Edu. Cont. Med. Vet Zoot.** CRMV-SP. v.15 (1), p. 16-23, 2017.

REIS, E.G.; GREMIÃO, I.D.; KITADA, A.A.; ROCHA, R.F.; CASTRO, V.S.; BARROS, M.B.; et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **J Feline Med Surg** v.14(6): 399-404. 2012.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**. 42: 265-270. 1950.

RODRIGUES, A.M. **Taxonomia polifásica e características proteômicas do Complexo *Sporothrix schenckii***. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, 2010.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, S.; CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Med. Mycology**. v. 51, issue 4, p. 405-412, May, 2013.

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

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; ZHANG, Y.; CAMARGO, Z. P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes and Infection**, v. 3, e32, 2014c.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. **PLOS Pathogen**, v. 12, n. 7, e1005638, 2016b.

ROMERO-MARTINEZ, R., WHEELER, M., GUERRERO-PLATA, A., RICO, G., TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infect. Immun.** v. 68 (6) p. 3696-3703. Jun, 2000.

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. Dermatology**. v. 52, p: 451-459, 2005.

SCORDINO, F. et al. Antifungal susceptibilities of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Italy. **J. Biol. Research**, Italy. V. 88, p. 139-140. Janeiro, 2015.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporothrichia. Bull. **Johns Hopkins Hospital**. 9: 286-290. 1898.

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). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1623–1629, 2004.

SCHUBACH, T. M.; MENEZES, R. C.; WANKE, B. Sporotrichosis. In: GREENE, C.E.(Ed.) **Infectious diseases of the dog and cat**. 4ed. Missouri: Elsevier, p. 645-650, 2012.

SILVA, ET al.. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**. v. 28 (10), p: 1867-1880, Out, 2012.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. Atendimento a esporotricose cresce 400%. Disponível em: <
<http://www.rio.rj.gov.br/web/sms/exibeconteudo?id=6809028>> Acesso em: 14 de abril de 2018.

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.

TEIXEIRA, P.A; de CASTRO, R.A.; FERREIRA, F.R.; CUNHA, M.M.; TORRES, A.P.; PENHA, C.V., et al. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanina expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Med. Mycology**. v. 48, p: 687-695, 2010.

VIKRAM, K.M. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. **Dermatol. Res. Practice**, Article ID 272376 v.2014, 13 pages, India, Dec,2014.