



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**Influência do tolueno como contaminante dos solos na imunopatogenia de
*Sporothrix schenckii***

Damiana Téllez Martínez

Araraquara
2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**Influência do tolueno como contaminante dos solos na imunopatogenia de
*Sporothrix schenckii***

Damiana Téllez Martínez

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologias aplicadas à Farmácia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos
COORIENTADOR: Prof. Dr. Raúl Bonne Hernández

Araraquara/SP
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

T275i Téllez Martínez, Damiana
Influência do tolueno como contaminante dos solos na imunopatogenia de *Sporothrix schenckii* / Damiana Téllez Martínez – Araraquara, 2018.
132 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Imunologia.

Orientadora: Iracilda Zeppone Carlos.
Coorientador: Raúl Bonne Hernández.

1. *Sporothrix schenckii*. 2. Esporotricose. 3. Virulência. 4. Tolueno. 5. Resposta imune.
6. Superóxido dismutase. 7. Contaminação ambiental. 8. Meio ambiente I. Carlos, Iracilda
Zeppone, orient. II. Bonne-Hernández, Raúl, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES).

Dedicat6ria

A mi hijito amado Alexander Damian, quien es mi alegrfa, mi esperanza y toda la certeza de mi vida. Quien me impulsa a recorrer caminos impensados, a encontrar mis fuerzas y vencer todos mis miedos. Tu sonrisa es mi luz y tu amor son mi refugio. Eres mi bien m1s preciado, mi gran amor. Te amo hijo con todo mi coraz6n. Dios te bendiga.

A mis queridos mami y papi que hicieron de mi lo que soy. A ellos que me arrullaron en sus brazos, en sus mimos y en sus afectos.

A mi bella mami Ana Ilsy, mi amada madre, cuyo inmenso y generoso coraz6n me ensefio a amar y a sofiar, a encontrar fuerzas para superar los obst1culos, a no cejar. Por ti aprendf que en las cosas m1s simples est1 la belleza de la vida. Mucho de ti hay en mf y me enorgullece. Tu ternura e inmenso amor son mi inspiraci6n. Te amo mama. Tu apoyo en cada momento de mi vida fue y es fundamental, sin ti hubiera sido m1s diff cil la escarpada.

A Bruno, mi papi adorado. Fui afortunada de tenerte y siempre estar1s en mis pensamientos y mi alma. Contigo aprendf a sofiar, a no olvidar quien soy ni de d6nde vengo. Contigo aprendf a ir lejos y hallar siempre el camino de volver. Y aunque hoy las l1grimas y la tristeza me abruman me queda el consuelo de ser tu hija, de ser mucho de ti, de ser como t1, no s6lo en lo ffsico sino tambi6n en lo abstracto, en la idea, en el pensamiento. Eso me reconforta, me enorgullece y me alivia. Te amo papi y te amar6 siempre. Gracias por todo tu amor, por tu ejemplo de vida.
Descansa en paz. S6 que est1s junto a Dios.

La dedico tambi6n a Brunito mi hermano amado, con quien he compartido juegos y travesuras de ni os, ilusiones y responsabilidades de adultos. Su amor, sus historias de la naturaleza que sabe amar, su alegrfa, su compa afia en todos los momentos, y principalmente en aquellos m1s duros son mi gran aliento.

A Alexander, mi amor, conmigo en todos los intentos, en los aciertos y desaciertos. Caminos andados juntos llenos de ilusiones, alegrfas, la vida compartida. Tu apoyo incondicional fue invaluable para lograr este empefio, sin tu fuerza, conocimiento y voluntad habrfa sido imposible hacerlo.

Y la dedico tambi6n a mi abuelita Iberia, mi abuela amada. Que me ensefio y nos ensefio a todos junto a mi abuelo Chencho, que es ser una familia, y que eso somos: una familia. Tu cari afio que me envolvi6 desde ni a me hace feliz, inclusive hoy a pesar de la distancia. Te amo abue.

A todos y cada uno de mi querida familia, quienes me dieron su amor siempre. Jam1s olvidar6 que estuvieron ahf con mi madre en el duro momento que mi padre parti6.

Los amo a todos.

Agradecimientos

A Dios, mi mayor y más profundo agradecimiento. A Él, quien me ha confortado siempre, especialmente en estos años difíciles de separación de parte de mi familia. A ÉL, quien me ha infundado aliento en todo momento y lugar. Gracias Padre!

A mi tutora, Iracilda Zeppone Carlos, por creer en mí y por la confianza que me dio para realizar este trabajo. Por su gran apoyo en todos estos años, por abrirnos no sólo las puertas del laboratorio sino también las de su casa, las de su bella familia. Muchas gracias por el cariño.

Agradezco a mi co-tutor Prof. Dr. Raúl Bonne por sus indicaciones precisas. Fueron importantes todas sus consideraciones para el trabajo.

Mi profundo agradecimiento al Prof. Dr. Alexander Batista Duharte por todo el apoyo y enseñanzas transmitidas para concretar este arduo proyecto. Sin su ayuda habría sido imposible.

A Deyvis, mi coterráneo, con el que compartí conocimientos y cuya compañía familiar me recuerda nuestra querida gente cubana.

Mi más sincera gratitud a Marcia y Mercia Carlos, quienes han sido y son familia para mí. Gracias por todo su amor.

Mis agradecimientos a todo el grupo del laboratorio de Inmunología Clínica, con el cual compartí momentos de alegría: A Marisa y a Lucas, por su sincera amistad y cariño. Gracias por los momentos de aprendizaje y alegrías en estos años. Ma, hasta por el presente de plantita que solo florecen en junio! Agradezco también a Francine, Amanda y Juliana por los momentos compartidos.

También quiero agradecer a aquellos que estaban cerca y ni yo misma sabía hasta que el trabajo me cruzó en sus caminos, todos excelentes personas: Rosângela y Jaqueline Derissi (Jaqui) por la gentileza de siempre y el apoyo todas las veces que lo necesité. A Vinícius, del laboratorio de Toxicología Ambiental, gracias por la paciencia y el interés de que los experimentos salieran

bien; al Prof. Dr. Salvador Lepera, por su disposición para ayudarme. A Julián, el colombiano, que me permitió ganar confianza en técnicas que me inspiraban respeto. A Juliana por su alegría de poder ayudar, gracias. A Caroline Barcelós por su gran disposición y cariño. Y a todos los que de alguna manera hicieron posible la realización de este lo que considero mi hermosos trabajo.

Quiero agradecer en la pos-graduación a Cláudia y a Daniela, por la acogida y su cariño. Siempre tan dispuestas a ayudar.

A mi querida amiga Niela González, por su sincera amistad desde los tiempos en la Universidad.

Gracias a los profesores de la UNESP que me apoyaron y a aquellos cuyas consideraciones hicieron posible mejorar este trabajo.

Agradezco el apoyo financiero de la **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES)** para la realización de este trabajo.

También agradezco a todos los que de alguna u otra forma me apoyaron para realizar la tesis.

Al generoso pueblo brasileño, muchas gracias por la oportunidad y su acogida.

GRACIAS A TODOS!!!!!!

SUMÁRIO

Lista de figuras	i
Lista de Quadros	v
Lista de abreviaturas e siglas	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1.- TESE	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 A esporotricose e o agente causal	2
2.2 Patogenia de <i>S. schenckii</i>	6
2.3 Histologia das lesões cutâneas	6
2.4 Condições ambientais extremas observadas nos nichos ecológicos de <i>Sporothrix</i>	7
2.5 Contaminantes químicos: Os hidrocarbonetos de petróleo	9
2.6 Natureza do tolueno e a sua liberação para o meio ambiente	10
2.7 Degradação do tolueno por microrganismos	12
2.8 Fatores de virulência desenvolvidos em resposta ao estresse ambiental	14
2.8.1 Produção de Melanina	17
2.8.2 Componentes da parede celular	18
2.8.3 Sistema antioxidante	19
2.9 Resposta imune contra <i>S. schenckii</i>	21
2.10 JUSTIFICATIVA	24
2.11 HIPÓTESES DE TRABALHO	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26

3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Fluxograma de experimentos	27
4.2	Fungo	29
4.3	Animais de experimentação.....	29
4.4	Condições de crescimento	29
4.5	Efeito da concentração de tolueno no crescimento de <i>S. schenckii</i>	30
4.6	Determinações analíticas	30
4.6.1	Curva padrão de tolueno. Linearidade e intervalo	31
4.6.2	Identificação e quantificação de tolueno por cromatografia gasosa	31
4.7	Crescimento em tolueno	32
4.8	Ensaio de viabilidade celular utilizando microscopia de fluorescência	33
4.9	Mudanças do fungo após exposição a tolueno	33
4.9.1	Morfologia das colônias.....	33
4.9.2	Micromorfologia.....	34
4.9.2.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
4.9.2.2	Microscopia eletrônica de Transmissão (MET).....	34
4.9.3	Conversão à fase de levedura.....	35
4.9.4	Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase	35
4.9.4.1	Obtenção do extrato de enzimas	35
4.9.4.2	Atividade da SOD	36
4.9.4.3	Teste qualitativo de atividade da Catalase	36
4.9.5	Sensibilidade ao estresse oxidativo.....	37
4.9.6	Espécies Reativas de Oxigênio intracelular.....	37
4.9.7	Proteínas da parede celular do fungo cultivado em tolueno	37
4.9.7.1	Obtenção de proteínas da parede	38
4.9.7.2	Dosagem de proteínas	38
4.9.7.3	Separação de proteínas por eletroforese bidimensional 2D-PAGE	38

4.10	Resposta à infecção	39
4.10.1	Obtenção dos macrófagos peritoneais	39
4.10.2	Produção de óxido nítrico (NO).....	40
4.10.3	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da produção de citocinas ..	40
4.11	Resposta à infecção pela via subcutânea	41
4.11.1	Histopatologia.....	42
4.11.2	Obtenção do soro	42
4.11.3	Citocinas Th1/Th2/Th17	42
4.11.4	Análise das populações Th1/Th17/Tregs.....	43
4.12	Análise estatística	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Sobrevivência de <i>S. schenckii</i> a diferentes concentrações de tolueno após 24 h de exposição	44
5.2	Determinações analíticas	45
5.2.1	Identificação e quantificação de tolueno por cromatografia gasosa	45
5.3	Cinética de crescimento em tolueno.....	45
5.4	Viabilidade do fungo durante a exposição	47
5.5	Mudanças morfológicas do fungo após exposição ao tolueno	48
5.5.1	Morfometria das colônias	48
5.5.2	Micromorfologia do fungo crescido em tolueno. O incremento de corpos eletrodensos ou melanosomas.	50
5.5.3	Conversão à fase de levedura.....	53
5.5.4	Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	53
5.5.5	Atividade da catalase	54
5.6	Resistência de <i>S. schenckii</i> ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio ..	55
5.7	Espécies Reativas de Oxigênio intracelular.....	55
5.8	Proteínas da parede celular do fungo cultivado em tolueno	56
5.9	Resposta à infecção	57

5.9.1	Produção de Óxido Nítrico (NO).....	58
5.9.2	Padrão de citocinas pro e antiinflamatórias durante a infecção	59
5.9.3	Padrão de citocinas Th1/Th17	60
5.10	Virulência de <i>S. schenckii</i> em modelo subcutâneo.....	60
5.10.1	Histopatologia.....	61
5.10.2	Fenotipagem de linfócitos T1/Th17 e Treg em baço.....	63
5.10.3	Padrão de citocinas do perfil Th1/Th2/Th17 em soro	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	74
8	REFERÊNCIAS	75
9	APÊNDICE	91
	Anexos.....	91
10	CAPÍTULO 2.-Artigo publicado	95

Lista de figuras

- Figura 1. Distribuição mundial de casos de esporotricose** (Carlos e Batista-Duarte, 2015). 4
- Figura 2. Evolução do número de áreas contaminadas cadastradas no Estado de São Paulo (Lei 13577/2009). Distribuição por atividade.** Fonte: CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Dezembro 2017 10
- Figura 3. Fluxograma de trabalho** 28
- Figura 4. Sistema de estudo utilizado para os experimentos com válvulas *Mininnert*** 32
- Figura 5. Sobrevivência de *S. schenckii* crescido na ausência ou presença de tolueno após 24 horas de exposição.** A) Porcentagem de sobrevivência em relação ao controle (não tratado). B) Unidades Formadoras de Colônias UFC/mL expressa em unidades logarítmicas. Os resultados são apresentados como a média $UFC \pm$ desvio padrão de duplicatas de três experimentos independentes. ***($p < 0,001$), ****($p < 0,0001$) 44
- Figura 6. Crescimento de *S. schenckii* na presença de 0,01% (v/v) de tolueno em SDB e 30°C.** Inóculos de $1,5 \times 10^6$ células viáveis aproximadamente, foram introduzidos em frascos erlenmeyer com tampas *Mininnert* providas de selos de teflon. O crescimento foi avaliado pela contagem de UFC e foram plotados como a média \pm desvio standard de duplicatas de cinco experimentos independentes. Os valores de concentração de tolueno mostram-se como a média \pm desvio standard de dois experimentos independentes (linha vermelha contínua). Foram utilizados frascos com a mesma concentração de tolueno sem o fungo para diferenciar as perdas de solvente (frascos estéreis, linha vermelha descontínua). 46
- Figura 7. Crescimento de *S. schenckii* na presença de 0,10 % (v/v) de tolueno e sem tolueno.** Inóculos de $1,5 \times 10^6$ células viáveis foram incubados em SDB e 30°C, em frascos erlenmeyer com tampas *Mininnert* providas de selos de teflon. O crescimento foi avaliado pela contagem de UFC e foram plotados como a média \pm desvio standard de duplicatas de três experimentos independentes. 47
- Figura 8. Viabilidade celular aos 5 dias de incubação avaliada com os marcadores fluorescentes Calcofluor White M2R (superior) e FUN-1 (inferior):** (A, B) Controle, (C, D) 0,01%(v/v) tolueno, (E, F) 0,10%(v/v). A fluorescência azul indica uma membrana íntegra e a laranja-vermelho significa atividade metabólica. Note-se a presença de estruturas intravacuolares de cor laranja-vermelho que evidenciam atividade metabólica. 48

- Figura 9. Macromorfometria de *S. schenckii*.** (a) células fúngicas de cada tratamento foram semeadas em placas de Petri contendo SDA e incubados em atmosfera livre de tolueno. (b) incubadas em atmosfera de tolueno. Os resultados mostram a média de medições do diâmetro (mm)±desvio padrão de duplicatas de três experimentos independentes **49**
- Figura 10. Morfologia das colônias em atmosfera de tolueno aos 19 dias de incubação** (A) com tolueno (B) controle sem tolueno. Note-se o menor diâmetro das colônias e o micélio em forma de pontas bem elevadas e de aparência brilhante e translúcida. Barra de escala: 1 mm **49**
- Figura 11. Morfologia de conídios e leveduras de *S. schenckii* 16345 em fase exponencial do crescimento crescidos a diferentes concentrações de tolueno.** Microscopia eletrônica de conídios. (A) sem tolueno, (B) 0,01% e (C) 0,10%. Leveduras crescidas (D) sem tolueno, (E) 0,01 e (F) 0,10% de tolueno. Magnificação 25000x (barra 1µm). **50**
- Figura 12. Superfície conidial de *S. schenckii* tratados com tolueno determinada por microscopia eletrônica de transmissão.** Setenta e uma células da fase exponencial de cada tratamento foram analisadas. **51**
- Figura 13. Mudanças na espessura da parede celular de *S. schenckii* em fase exponencial de crescimento influenciada pela exposição ao tolueno em diferentes concentrações.** A) sem tolueno, B) 0,01%, C) 0,10%. A espessura da parede celular foi analisada com o programa ImageJ. Os resultados apresentam-se como a média de espessura ± desvio padrão de 42 células de cada grupo. Barra de escala: 1µm. **51**
- Figura 14. Acúmulo de material eletrodens em vesículas citoplasmáticas semelhantes a melanossomas em conídios de *S. schenckii* expostos ao tolueno.** Secções ultrafinas de células fúngicas foram preparadas para MET e mostram estruturas com diferentes eletrodensidade. O número de corpos eletrodensos representam a média ± desvio padrão de 161 conídios por grupo (Magnificação 5000x, 40.000X, barra =1µm) ****p valor<0,0001. **52**
- Figura 15. Mudanças da Atividade de Superóxido Dismutase.** (1): Sem Tolueno; (2): Tolueno 0,01%; (3): Tolueno 0,10%. Foram colocados 23 µg de proteínas em cada poço. **54**
- Figura 16. Atividade de catalase observada pela força da reação e a evolução da formação de bolhas (oxigênio).** A) Sem Tolueno, B) 0,01%, C) 0,10%. Os testes foram realizados em triplicata. **54**

- Figura 17. *S. schenckii* crescido em tolueno torna-se mais resistente ao estresse por peróxido de hidrogênio.** Mecanismos enzimáticos para a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio desenvolvidos pelo fungo crescido em tolueno permitiram que sobrevivesse até concentrações de oxidante de 62,50 mM 55
- Figura 18. Acúmulo de ERO em células de *S. schenckii* coradas com DHR-123 e detectadas por citometria de fluxo.** Conídios crescidos sem e com tolueno foram tratados com H₂O₂ (linha vermelha) e usaram-se como controle culturas sem tratar com H₂O₂ (linha preta). A) crescidos sem tolueno, B e C) crescidos a 0,01% e 0,10% tolueno. D) Intensidade média de fluorescência (IMF) após o tratamento com H₂O₂ por 30 min a 30°C. 56
- Figura 19. Mudanças no perfil de proteínas da parede celular de *S. schenckii* extraídas com SDS/DTT e coradas com azul de Coomassie.** (A) Sem tolueno, (B) 0,10% tolueno. 57
- Figura 20. Carga fúngica em camundongos Balb/c infectados com *S. schenckii* tratados com tolueno (UFC)/g em baço e fígado.** Grupos de animais foram inoculados via intraperitoneal com 1×10^7 conídios/mL, e a infecção foi avaliada aos 21 dias. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes *(p < 0,01); *(p < 0,001); *(p < 0,0001). 58
- Figura 21. Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados por *S. schenckii* expostos a diferentes concentrações de tolueno.** Os macrófagos foram estimulados in vitro com conídios termoinativados ou LPS. A concentração de NO foi detectada pelo método de Greiss. *(p < 0,001); *(p < 0,0001). 58
- Figura 22. Perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados por *S. schenckii*,** crescidos a diferentes concentrações de tolueno em comparação com camundongos infectados com fungos não expostos a tolueno (ST) ou não infectados (PBS). Os macrófagos foram estimulados in vitro com conídios termoinativados e as citocinas foram quantificadas no sobrenadante por ELISA *(p < 0,05); *(p < 0,01). 59
- Figura 23. Perfil de Th1/Th17 em esplenócitos de camundongos Balb/c infectados por *S. schenckii* expostos a diferentes concentrações de tolueno,** em comparação com camundongos infectados com fungos não expostos a tolueno (ST) ou não infectados (PBS). Os esplenócitos foram estimulados in vitro com Concanavalina A e as citocinas foram quantificadas no sobrenadante por ELISA *(p < 0,01). 60

- Figura 24. Progressão da esporotricose aos 21 dias de infecção.** A) Lesões da pele nos grupos infectados. O grupo infectado 0,10% apresentou lesões na pele mais persistentes com disseminação à cauda e fígado. B) Disseminação a órgãos: lesões macroscópicas em fígado e baço do grupo infectado com fungos crescidos em tolueno, apresentando aumento de tamanho conforme incrementa-se a concentração de tolueno a que o fungo foi exposto. Carga fúngica em pele e fígado aumentou nos animais infectados com fungo exposto a 0,10% de tolueno. **61**
- Figura 25. Reação inflamatória supurativa na pele de camundongos Balb/c.** Observaram-se infiltrados mononucleares com células epitelioides e presença de leveduras, mais numerosas no grupo infectado com fungos crescidos a 0,10%. (seta preta: leveduras). A) grupo não infectado, B) Grupo infectado com fungo não exposto a tolueno, B e D) Infectados com fungos crescidos a 0,01 e 0,10% tolueno. **62**
- Figura 26. Histopatologia do fígado de camundongos Balb/c mostrando a reação granulomatosa e supurativa.** Granulomas com infiltrados mononucleares, células epitelioides e leveduras nos grupos infectados. No grupo 0,10% observou-se granuloma de tipo corpo estranho com células gigantes e necrose central. (seta preta: leveduras, cabeça de seta: células gigantes, estrela: área de necrose). A) Não infectado, B) Infectado Sem Tolueno, C e D) infectados com fungo crescido a 0,01 e 0,10% tolueno, respectivamente. **62**
- Figura 27. Fenotipagem de linfócitos Th1/Th2/Th17 em baços de camundongos Balb/c infectados com fungos expostos ou não ao tolueno.** *(p <0,05); **(p <0,01). **63**
- Figura 28. Fenotipagem de linfócitos Treg em baços de camundongos Balb/c infectados com fungos expostos ou não ao tolueno.** *(p <0,05); **(p <0,01). **64**
- Figura 29. Citocinas Th1, Th2 e Th17 em soro determinadas por CBA em citômetro de fluxo.** *(p <0,05); **(p <0,01); *** (p <0,001); *****(p <0,0001) **65 e 66**

Lista de Quadros

Quadro 1. Mecanismos utilizados por <i>S. schenckii</i> para sua proteção no meio ambiente e no hospedeiro	16
Quadro 2. Concentrações de tolueno utilizadas para 50 mL de meio	30
Quadro 3. Áreas obtidas para concentrações de tolueno da curva padrão	45
Quadro 4. Concentração inicial de tolueno nas duas fases do sistema determinadas por Cromatografia a gás.	47
Quadro 5. Morfometria de conídios de <i>S. schenckii</i> 16345 realizada com microscopia eletrônica de transmissão	57
Quadro 6. Índice de corpos eletrodensos observados em <i>S. schenckii</i>	53

Lista de abreviaturas e siglas

ATCC	American Type Culture Collection. É uma organização privada sem fins lucrativos dedicados à aquisição, preservação, autenticação e distribuição de diversos materiais biológicos.
CBA	Cythometric Bead Array. É uma aplicação de citometria de fluxo que permite quantificar múltiplas proteínas simultaneamente.
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.
CO ₂	Gás Carbônico
CONAMA 420	CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. RESOLUÇÃO Nº420, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2009. Publicado no DOU nº 249, de 30/12/2009, págs. 81-84.
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin. Receptor de lectina do tipo C presente na superfície de ambos os macrófagos e células dendríticas.
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio Imunoenzimático
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
IFN- γ	Interferon Gamma
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons
kGy	Kilogray. Unidade derivada da dose de radiação ionizante
MAPK	Mitogen activated protein kinase

mM	Milimolar
Na-HEPES (DH)	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt
PAMPS	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
pg	Picograma
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
PTFE	Politetrafluoroetileno ou Teflon
RPMI-C	Roswell Park Memorial Institute Medium-complete
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSG-1	Heterotrimeric G protein alpha subunit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Th	Linfócitos T helper (auxiliadores)
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UV	Ultravioleta
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas/mililitro

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea emergente que acomete animais e humanos, causada por espécies patogênicas do fungo *Sporothrix schenckii sensu lato*. A doença, distribuída em todo o mundo, é mais frequente na América Latina e países como Brasil, Uruguai, Peru e Colômbia constituem áreas endêmicas. No Brasil, a doença tornou-se um problema de saúde em razão do aumento de casos, manifestando-se com uma intrigante transmissão zoonótica por gatos. Os fatores ambientais extremos modificam a fisiologia dos microrganismos, permitindo sua sobrevivência e induzindo mudanças na virulência dos fungos patogênicos com incidência direta no sistema imune. O tolueno encontra-se dentre os principais contaminantes dos solos como consequência dos derramamentos de gasolinas, resíduos da indústria, dentre outras fontes de poluição, porém, o efeito deste contaminante sobre a virulência do fungo *S. schenckii* ainda não foi elucidado. Neste estudo foi avaliado o crescimento e a virulência de *S. schenckii* quando exposto ao tolueno. O fungo sobreviveu a 0,01 e 0,10% (vol/vol) de tolueno, sendo a população reduzida até 17,5 e 5,4%, respectivamente. O consumo de tolueno na concentração 0,01% mostrou uma redução de 26% após 48 horas. As enzimas superóxido dismutase e catalase nos fungos expostos ao tolueno foram altamente expressas, o qual permitiu uma maior remoção das espécies reativas de oxigênio intracelular nos fungos expostos, e uma menor sensibilidade à exposição de H₂O₂ sendo que resistiram até 62,5 mM, entretanto, àqueles não crescidos em tolueno cresceram somente até 31,25 mM. A presença de melanossomas em conídios expostos ao tolueno foi significativamente maior. A virulência avaliada em camundongos Balb/c infectados com fungos expostos a 0,10% de tolueno pela via intraperitoneal apresentou maior carga fúngica em baço e fígado e mais alta produção de óxido nítrico, IL-1 β , TNF- α e IL-10 em macrófagos peritoneais. A resposta à infecção pela via subcutânea mostrou também maior carga fúngica no fígado e pele dos animais infectados com fungo expostos a 0,10%, e revelou uma marcada reação inflamatória granulomatosa como resposta a uma maior virulência desses fungos demonstrados por estudos anatomopatológico. A resposta imunológica associada mostrou uma elevação dos linfócitos Th1/Th17 e Tregs no soro por meio da liberação de mediadores da imunidade específica: IFN γ , IL-17 e IL-10. No modelo subcutâneo também se observou um aumento dos níveis de linfócitos do perfil Th1 e Th1/Th17 com fenotipagem CD3⁺CD4⁺CD25⁺IFN γ e CD3⁺CD4⁺CD25⁺ IFN γ /CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ IL-17; tais modificações das populações linfocitárias tiveram uma expressão na citocinas do padrão Th1 (IL-2, IFN γ , TNF), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) e Th17 (IL-17). Também se observou um

aumento das células Tregs com fenótipo CD3+CD4+CD25+Foxp3+ e a citocina antiinflamatória IL-10 como reflexo da necessidade de compensar a excessiva resposta inflamatória causada pela virulência do fungo. Os resultados mostram o aumento da virulência de *S. schenckii* após a exposição ao tolueno, o que corrobora a hipótese de que influências ambientais produzem mudanças na virulência fúngica e constitui uma maneira de explicar, pelo menos em parte, o surgimento de possíveis surtos em regiões altamente poluídas.

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*. Esporotricose. Virulência. Tolueno. Resposta immune. Superoxido dismutase. Contaminação ambiental. Meio ambiente.

ABSTRACT

Sporotrichosis is an emerging subcutaneous mycosis that affects animals and humans, caused by pathogenic species of the fungus *Sporothrix schenckii sensu lato*. It is distributed worldwide, being more frequent in Latin America and the countries of Brazil, Uruguay, Peru, and Colombia constitute endemic areas. In Brazil, the disease has become a health problem due to the increase in cases, manifested with an intriguing zoonotic transmission by cats. Extreme environmental factors modify the physiology of microorganisms, allowing their survival and inducing changes in the virulence of pathogenic fungi with direct incidence in the immune system. Toluene is one of the main contaminants of soils as a consequence of the spills of gasolines, industrial waste, among other sources of pollution, but the effect of this contaminant on the virulence of the *S. schenckii* fungus has not been elucidated yet. This study evaluated the growth and virulence of *S. schenckii* when exposed to toluene. The fungus survived 0.01 and 0.10% (vol / vol) toluene, with the population reduced to 17.5 and 5.4%, respectively. The consumption of toluene in the concentration 0.01% showed a reduction of 26% after 48 hours. The enzymes superoxide dismutase and catalase in the toluene-exposed fungi were highly expressed, which allowed a greater removal of of intracellular oxygen reactive species in the exposed fungi, and a lower sensitivity to the exposure of H₂O₂ being resistant up to 62.5 mM, however, those not grown in toluene grew only up to 31.25 mM. The presence of melanosomes in conidia exposed to toluene was significantly higher. Virulence evaluated in Balb/c mice infected with fungi exposed to 0.10% of toluene by the intraperitoneal route presented higher fungal load in spleen and liver and higher production of nitric oxide, IL-1 β , TNF- α and IL-10 in peritoneal macrophages. The response to infection by the subcutaneous route also showed a greater fungal load on the liver and skin of animals infected with fungus exposed to 0.10%, and showed a marked granulomatous inflammatory reaction in response to a higher virulence of these fungi demonstrated by anatomopathological studies. The associated immune response showed an increase of Th1/Th17 lymphocytes and Tregs in serum by the release of mediators of the specific immunity: IFN γ , IL-17 and IL-10. In the subcutaneous model, the levels of lymphocytes of the Th1 and Th1/ Th17 profile were also observed with phenotyping CD3+CD4+CD25+IFN γ and CD3+CD4+CD25+IFN γ /CD3+ CD4+ CD25+ IL-17; such modifications of the lymphocyte populations had an expression in Th1 (IL-2, IFN γ , TNF), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) and Th17 (IL-17) cytokines. An

increase of Treg cells with CD3+CD4+CD25+Foxp3+ phenotype and IL-10 anti-inflammatory cytokine was also observed as a reflection of the need to compensate for the excessive inflammatory response caused by the virulence of the fungus. The results show the increased virulence of *S. schenckii* after exposure to toluene, which corroborates the hypothesis that environmental influences produce changes in fungal virulence and is a way of explaining, at least in part, the emergence of possible outbreaks in regions highly polluted.

Keywords: *Sporothrix schenckii*. Sporotrichosis. Virulence. Toluene. Immune response. Superoxide dismutase. Environmental pollution. Environment

CAPÍTULO 1.- TESE

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose granulomatosa, subaguda ou crônica que acomete animais e seres humanos, causada pelos fungos patogênicos do gênero *Sporothrix schenckii* *sensu lato*. Está distribuída mundialmente sendo mais frequente em regiões de clima tropical e subtropical, existindo áreas endêmicas. A doença está incluída no grupo das micoses profundas oportunistas, e atinge habitualmente a pele, o tecido subcutâneo e os vasos linfáticos, mas pode afetar também órgãos internos em pessoas imunocomprometidas.

No Brasil, especialmente no Rio de Janeiro, a doença tornou-se um problema de saúde, em razão do aumento de casos nos últimos anos manifestando-se com uma intrigante transmissão zoonótica por gatos (Pereira *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014). A esporotricose na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro ficou evidenciada, nesta última década, como uma doença urbana, não laborativa, de localidades nas quais, segundo informações oficiais, as condições de infraestrutura e saneamento são precárias (Marques, 2000; Silva *et al.*, 2012).

A elevação dos níveis de contaminação dos solos por hidrocarbonetos do petróleo transformou-se em um grave problema mundial nas últimas décadas. O tolueno e outros hidrocarbonetos aromáticos como xilenos, benzeno e etilbenzeno, são poluentes onipresentes (Cruden *et al.*, 1992; Atlas, 1995; Huertas *et al.*, 1998). Apesar de sua importância, há uma notável escassez de dados no que se refere ao impacto da poluição na virulência dos microrganismos que habitam os solos. A influência dos fatores ambientais na virulência tem sido demonstrada em diferentes fungos patogênicos, porém os efeitos de vários desses fatores ainda não foram estudados em *S. schenckii*. Este fungo tem capacidade para sobreviver em ambientes contaminados com tolueno e utilizá-lo como fonte de carbono (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006). Esta descoberta nos fez pensar que a interação de *S. schenckii* com o solvente em solos contaminados poderia modificar o seu estado de virulência e influir na imunopatogenicidade do fungo. Portanto, torna-se importante a realização de estudos da influência da contaminação com tolueno na virulência e patogênese do fungo, e também para fornecer novas estratégias e ferramentas de prevenção e/ou controle da enfermidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A esporotricose e o agente causal

A esporotricose é uma micose subaguda ou crônica que acomete animais e seres humanos, causada pelos fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix*. A doença está incluída no grupo das micoses profundas oportunistas e atinge habitualmente a pele, o tecido subcutâneo e os vasos linfáticos, mas pode afetar também órgãos internos em pessoas imunocomprometidas.

O agente causal foi descrito inicialmente por Schenck em 1898 nos Estados Unidos da América (EUA), em um paciente de 36 anos com abscesso na mão e linfangite nodular no antebraço. O fungo isolado foi estudado pelo micologista Erwin F. Smith, que concluiu que pertencia ao gênero *Sporotrichum* (Schenck, 1898). Este fungo foi incluído no gênero *Sporotrichum*, que compreende fungos basidiomicetos que não são dimórficos nem patogênicos para humanos ou outros animais (Schell *et al.*, 1999). Hektoen e Perkins em 1962 deram ao agente da esporotricose a denominação *Sporothrix schenckii* (Hektoen e Perkins, 1962). Esta nomenclatura permaneceu até 1962, quando Carmichael relatou as diferenças nas conidiações de membros do gênero *Sporotrichum* e dos isolados de casos de esporotricose (Carmichael, 1962).

No Brasil, o fungo foi identificado pela primeira vez em humanos por Lutz e Splendore em 1907. Esses autores relataram também o primeiro caso de infecção natural em animais, desta vez em ratos (Lutz e Splendore, 1907). A esporotricose felina adquirida de forma natural foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos por Singer e Muncie em 1952, e no Brasil em 1956 (Freitas *et al.*, 1956). Porém, a suscetibilidade de gatos para a infecção por *S. schenckii* já havia sido demonstrada experimentalmente décadas antes, em 1909 (de Beurmann *et al.*, 1909).

Taxonômicamente, as espécies do gênero *Sporothrix* pertencem ao reino *Fungi*, divisão *Ascomycota*, ordem *Ophiostomatales*, família *Ophiostomataceae*. *Sporothrix schenckii*, ao longo de muitas décadas foi classificado como uma única espécie, porém, em estudos recentes baseados em análises fenotípicas e genotípicas (morfologia dos conídios, sequência do gene nuclear da calmodulina e MALDI-TOF, entre outras) forneceram uma nova classificação para as espécies do gênero: (1) *S. globosa*, (2) *S. brasiliensis*, (3) *S. mexicana*, (4) *S. luriei*, (5) *S. schenckii sensu stricto* e (6) *S. albicans*, esta última até agora

não patogênica. (Mendoza *et al.*, 2005; Marimón *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2011; Mora-Montes *et al.*, 2015). Ditas espécies, são descritas também como *Sporothrix schenckii sensu lato*. *Sporothrix* compreende 51 táxons, divididos em uma clade clínica (principalmente patógenos humanos), que inclui *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*, e uma clade ambiental composta por alguns outros complexos de espécies como *S. pallida* e *S. candida* com cinco espécies cada, *S. inflata* com três espécies, *S. gossypina* com 12 espécies e *S. stenoceras* com seis espécies (Orofino-Costa *et al.*, 2017).

Sporothrix schenckii sensu stricto habita em substratos de solos com pH entre 3,5 a 9,4, ricos em plantas e material em decomposição, excretas de animais e celulose, a temperaturas próximas a 31°C e umidade relativa do ar acima de 92% (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2011). São fungos dimórficos, ou seja, encontram-se na fase leveduriforme quando crescidos a 37°C, ou na fase miceliar quando crescidos entre 25°C e 30°C, além de serem saprófitas e geofílicas (Barros *et al.*, 2010).

Morfologicamente, as colônias de isolados clínicos de *S. schenckii* produzem colônias elevadas, com um aspecto membranoso, superfície enrugada ou dobrada e com coloração entre o branco e o marfim, transformando-se mais tarde de marrom a cinza escuro e preto (Lacaz, 1998). A fase saprófita micelial é caracterizada por hifas delgadas de 1,5 a 2,0 µm de espessura, hialinas, septadas e ramificadas, contendo finos conidióforos cujo ápice forma uma pequena vesícula com dentículos dispostos simodidamente. Cada dentículo produz um conídio, cada um medindo aproximadamente 2 a 4 µm (ou entre 3-6 µm), organizados em grupos semelhantes a flores. Os conídios separam-se dos conidióforos, por vezes dispostos lado a lado seguidos bilateralmente às hifas (Mendonça *et al.*, 1976; Travassos e Lloyd, 1980). Os conídios apresentam-se piriformes, ovais ou esféricos, de paredes grossas e com coloração negra, o que lhes confere o aspecto dematiaceous, uma característica clássica das espécies do gênero *Sporothrix* (Findlay *et al.*, 1979; Travassos e Lloyd, 1980). As leveduras são polimórficas mostrando-se redondas, ovoides e assemelhando-se a um "charuto" medindo entre 2,5 a 5 µm de comprimento (Travassos e Lloyd, 1980; Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

A esporotricose, distribuída mundialmente (Magand *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2013; Zhou, *et al.*, 2014; Chakrabarti *et al.*, 2015; Carlos *et al.*, 2015; McGuinness *et al.*, 2016), é mais frequente em regiões de clima tropical e subtropical, sendo a micose subcutânea mais comum nas Américas, especialmente no Brasil, México, Peru, Colômbia e Uruguai. Também é mais frequente no Japão, China, Austrália, Índia e África do Sul (Vismer *et al.*, 1997; Bustamante e Campos, 2001; Liu *et al.*, 2003; Carrada-Bravo e Olivera-Macias,

2013) (Figura 1). As principais áreas de endemidade estão localizadas em América Latina. Os países como México tem uma alta prevalência da enfermidade, o estado de Jalisco é considerado uma área endêmica (Bonifaz *et al.*, 2007). Abancay, uma região nas terras altas do centro-sul do Peru, considera-se uma área hiperendêmica com uma incidência estimada de aproximadamente 50 a 60 casos por 100.000 habitantes por ano (Pappas *et al.*, 2000;). No Brasil, principalmente Rio de Janeiro, é considerada uma região endêmica, aonde a doença tornou-se um problema de saúde em razão do aumento de casos, manifestando-se com uma intrigante transmissão zoonótica por gatos (Taboada *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2011, 2014).

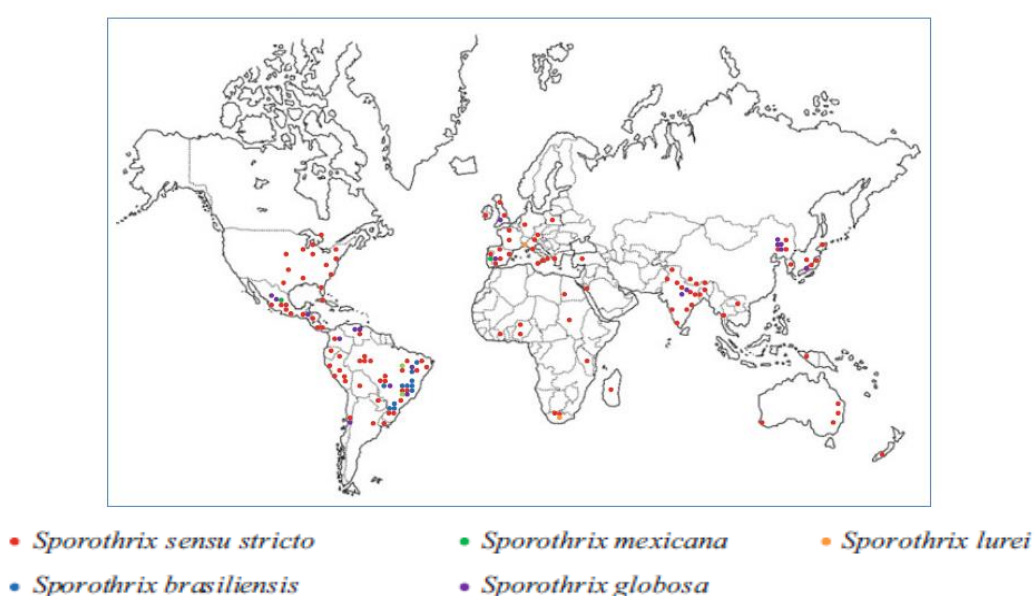


Figura 1. Distribuição mundial de casos de esporotricose (Carlos e Batista-Duarte, 2015).

O papel dos felinos na transmissão da micose ganhou atenção desde os anos 1980, quando Read e Sperling relataram um surto envolvendo cinco pessoas expostas a um gato com esporotricose (Read e Sperling, 1980). Desde então, relatórios sucessivos de diferentes regiões geográficas caracterizaram um novo grupo de risco para aquisição de esporotricose, composto por donos de gatos e veterinários (Yegneswaran *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2011). A primeira epidemia de esporotricose zoonótica foi detectada no Rio de Janeiro (Barros *et al.*, 2004, Schubach *et al.*, 2004). Desde 1998, o setor de Doenças Infecciosas em Dermatologia e Serviço de Zoonoses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro, vem acompanhando um

número crescente de casos humanos e felinos provenientes da cidade do Rio de Janeiro e arredores (Schubach *et al.*, 2001, 2002, 2005; de Lima Barros *et al.*, 2001, 2011).

Neste estado foram reportados e tratados 1.848 casos de esporotricose em humanos entre 1997 e 2007 (Silva *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2010), e até o ano 2011 tem sido reportados mais de 4000 casos (Pereira *et al.*, 2014). Já em gatos foram diagnosticados 2301 casos até 2012 (Pereira *et al.*, 2014). Segundo o Boletim Epidemiológico 012/2014 da Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro baseado no banco de dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação do Estado do Rio de Janeiro (SINAN/RJ) durante os anos de 2013 e 2014 foram notificados 830 casos em humanos, evidenciando o aumento alarmante da doença (Ministério da Saúde, 2014). Desde 1998 até 2014 foram reportados 244 cães (Viana *et al.*, 2015) e, em 2015 foram diagnosticados 4.703 casos de gatos (Gremião *et al.*, 2017) no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (FIOCRUZ), representando a maior epidemia de transmissão zoonótica registrada.

A esporotricose na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro ficou evidenciada, nesta última década, como uma doença urbana, não laborativa, de localidades nas quais, segundo informações oficiais, as condições de infraestrutura e saneamento são precárias (Marques, 2000 em Silva *et al.*, 2012). Pavimentação incompleta, presença de lixo, mato e entulho, são condições propícias para a criação de roedores e a presença de felinos nesses ambientes onde o fungo se desenvolve.

Em outras regiões do Brasil também foram relatados surtos de esporotricose (Rodrigues *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013; Gremião *et al.*, 2017). No Estado de São Paulo há relatos de casos eventuais, sendo que no período de 1956 a 2001 foram identificados 51 casos em gatos e 15 em pacientes humanos (Montenegro *et al.*, 2014). Em um estudo realizado entre 2011 e 2013 na região do Distrito Administrativo de Itaquera, São Paulo, do total de 1.463 domicílios pesquisados, em 77 (5,3%) foi detectado a presença de 114 felinos com esporotricose. Destes, 68,4% foram confirmados laboratorialmente e 31,6% dos casos por critério clínico epidemiológico. O número de humanos e de cães com esporotricose identificados neste estudo foram 12 e 1, respectivamente (Montenegro *et al.*, 2014). Em outras áreas de Brasil também foram relatados vários casos de esporotricose (de Araujo *et al.*, 2015; Bazzi *et al.*, 2016).

2.2 Patogenia de *S. schenckii*

Uma vez que o fungo penetra na derme, depois de feridas ou escoriações da pele produzidas por materiais infectados como espinhos, feno, madeira, lascas, arame farpado, ferramentas de jardinagem ou flores (da Rosa *et al.*, 2005), ele pode permanecer restrito ao local da inoculação ou atingir outros órgãos. A esporotricose apresenta diferentes manifestações clínicas: cutânea, linfocutânea, disseminada, cutânea e extracutânea ou sistêmica. A forma fixa pode aparecer como uma lesão indolor, infiltrada, eritematosa ou violácea (Vasquez-del-Mercado *et al.*, 2012), que pode se tornar ulcerada ou verrucosa de duração variável (Roldán-Marín *et al.*, 2009).

A forma linfocutânea é a manifestação mais comum e caracteriza-se por úlceras superficiais papulosas e nodulares e/ou lesões de placa vegetativa na pele e ao longo da trajetória dos vasos linfáticos drenantes. A forma cutânea disseminada da esporotricose consiste em múltiplas lesões distantes na pele devido à disseminação hematogênica ou múltiplas inoculações do fungo. Já na forma extracutânea ou sistêmica, caracteriza-se por múltiplas lesões cutâneas e viscerais envolvendo ao fígado, articulações, baço, ossos, medula óssea, pulmões, olhos, testículos e sistema nervoso central, associadas à imunodeficiência celular (Edwards *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2001; Ramos e Silva *et al.*, 2012). A esporotricose pulmonar primária é outro tipo clínico dessa infecção, causada pela inalação de conídios infecciosos em ambientes contaminados (Aung *et al.*, 2013).

2.3 Histologia das lesões cutâneas

S. schenckii quando em contato com o tecido do hospedeiro desencadeia inicialmente uma reação inflamatória aguda com afluxo predominante de neutrófilos. Estas células são substituídas gradualmente por macrófagos, presentes de forma difusa, que progride até formar uma reação granulomatosa e supurativa mista na derme e tecido subcutânea, frequentemente acompanhada por microabscessos e fibrose (Gross e Ihrke, 2003; Larsson, 2011). Além das células polimorfonucleares intactas o granuloma da esporotricose geralmente contém restos celulares, material caseoso, linfócitos e células gigantes (multinucleadas do tipo Langhans), plasmócitos e fibroblastos, bem como células de levedura de *S. schenckii* dentro de células fagocíticas ou no meio extracelular (Lacaz *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2010).

Embora *S. schenckii* possa ser visto em tecidos com colorações de hematoxilina e eosina (H&E) utilizadas rotineiramente, outras técnicas histoquímicas como a impregnação da prata Gomori metenamina (GMS) (Grocott) e ácido periódico de Schiff (PAS) podem ser empregados para visualização de fungos (Larone, 2002; Morris-Jones, 2002; Barros *et al.*, 2010). Também permitem caracterizar a morfologia e quantificar o número de organismos.

Ao exame histopatológico as lesões podem ser analisadas de acordo com o processo inflamatório (granulomatoso ou inespecífico), grau de ativação de fagócitos predominantes nos granulomas (macrófagos ou células epitelióides), organização do granuloma (bem formado ou mal formado) e intensidade dos tipos celulares no infiltrado (Miranda *et al.*, 2013). Além disso, podem ser analisadas a presença de necrose, ulceração e alterações epidérmicas (Quintella *et al.*, 2011).

2.4 Condições ambientais extremas observadas nos nichos ecológicos de *Sporothrix*

Tradicionalmente os surtos devidos às espécies *Sporothrix* estão frequentemente ligados a uma fonte ambiental, envolvendo principalmente a inoculação traumática de material contaminado ambiental nos tecidos cutâneos e subcutâneos dos indivíduos (Zhang *et al.*, 2015). Porém, os fatores ambientais que podem estar associados às modificações da virulência do fungo não têm sido suficientemente estudados (Téllez *et al.*, 2014, Batista-Duarte *et al.*, 2015). Os fungos pertencentes às espécies *Sporothrix* tem sido isolados em diferentes ambientes agressivos tanto físicos, químicos e até biológicos. *S. schenckii* é capaz de resistir condições extremas, tais como temperaturas muito baixas (Pasarell e McGinnis, 1992; Mendoza *et al.*, 2005) e pressão osmótica alta por vários anos (Castellani, 1967; Capriles *et al.*, 1993, Mendoza *et al.*, 2005, Ferreira *et al.*, 2009). Do mesmo modo, existem evidências de que *S. schenckii* é capaz de resistir à influência de radiações. A exposição deste fungo a diferentes níveis de luz UV resultou em viabilidade conservada. No entanto, foi observada uma alta frequência de alterações morfológicas, como colônias menores ou alterações de forma, dependendo da dose de UV (Torres-Guerrero e Arenas-López, 1998). Os autores demonstraram que as leveduras de *S. schenckii* expostas à radiação gama permaneceram viáveis até 9,0 kGy, porém o metabolismo proteico foi fortemente afetado. E relataram também que 7.0 kGy de radiação gama aboliu a capacidade de produzir infecção, mas manteve a viabilidade, atividade metabólica e morfologia do fungo (de Souza *et al.*, 2011).

Sporothrix schenckii também é capaz de interagir com outros microrganismos em seus habitats. Steenbergen e colaboradores (2004) relataram a interação da ameba *Acanthameobae castellanii* com vários fungos, entre eles *S. schenckii*, e encontraram que as leveduras deste fungo provocaram a morte da ameba quando ingeridas por estas.

Com relação aos contaminantes químicos, *S. schenckii* tem sido isolado em ambientes altamente poluídos (Dixon *et al.*, 1991; Ulfig, 1994; Ulfig *et al.*, 1996; Peciulyté, 2010; Chao *et al.*, 2012), ambientes com ampla variação de pH 2.2-12.5 (Tapia Noriega *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 2009), em pisos ao redor das piscinas, em cogumelos dessecados, pulgas, formigas e na crina de cavalos (Carrada-Bravo, 2013). *S. schenckii* também foi isolado em ambientes contaminados com metais pesados, sugerindo que eles podem ser resistentes a seus efeitos tóxicos em contato com a natureza (Ulfig *et al.*, 1996; Kacprzak e Malina, 2005). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a tolerância dos fungos aos metais pesados, incluindo sequestro extracelular com quelação e ligação da parede celular, principalmente utilizados para evitar a entrada de metais; o sequestro físico intracelular de metal por ligação a metalotioneínas (MTs), e o efluxo da célula através de transportadores específicos (Valix e Loon, 2003; Anahid *et al.*, 2011; Jarosławiecka e Piotrowska-Seget, 2014).

Vários estudos relataram a capacidade de *S. schenckii* para resistir, e mesmo para metabolizar diferentes compostos químicos orgânicos. Zeyer e colaboradores (1981) observaram que, de 160 microrganismos testados, apenas *S. schenckii* degradou significativamente o ácido cianúrico sob condições aeróbias. Eles descobriram que durante o crescimento, a cepa foi capaz de utilizar o ácido cianúrico como sua única fonte de nitrogênio, com uma liberação concomitante de carbono como dióxido de carbono. As células em repouso degradaram o composto em dióxido de carbono e amônia (Zeyer *et al.*, 1981). Este estudo gerou uma patente relativa a um processo microbiano para a degradação do ácido cianúrico em águas residuais contendo ácido cianúrico.

Outros estudos revelaram o efeito de vários fungicidas contra diversos fungos patogênicos, e *S. schenckii* apresentou a maior resistência em comparação com outros fungos (Morehart e Larsh, 1967).

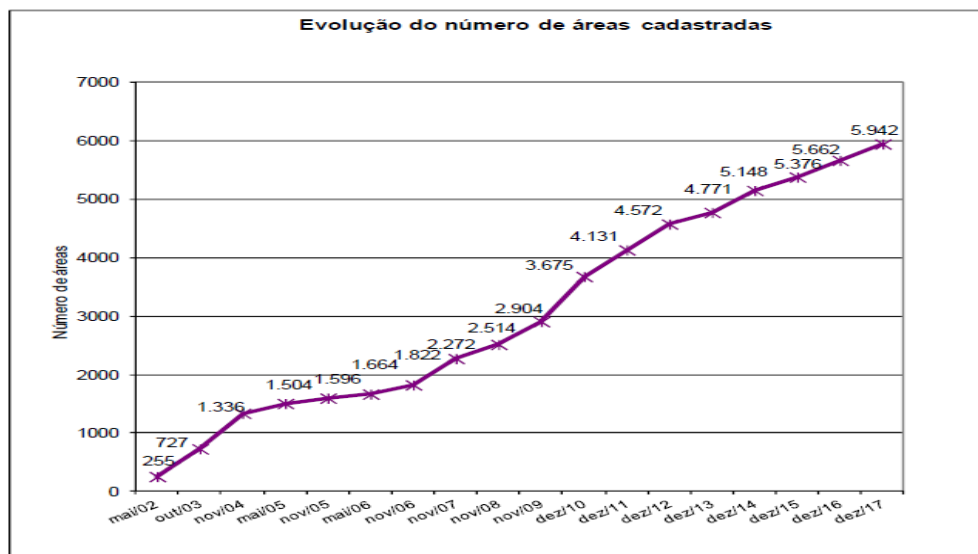
Por outro lado, um estudo interessante revelou que vários fungos, incluindo *S. schenckii*, foram isolados em biofiltros para o tratamento de correntes de gás de hidrocarbonetos. Os dados dessa pesquisa mostraram que as cepas degradadoras de hidrocarbonetos voláteis estão intimamente relacionadas com um número muito restrito de

espécies fúngicas patogênicas que causam graves micoses, especialmente infecções neurológicas, em indivíduos imunocompetentes (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006).

2.5 Contaminantes químicos: Os hidrocarbonetos de petróleo

A contaminação dos solos por hidrocarbonetos do petróleo transformou-se em um grave problema mundial. O mundo atual está cada vez mais dependente do petróleo e de seus derivados para a manutenção da atividade industrial. A contaminação por hidrocarbonetos de petróleo é cada vez mais frequente, visto a demanda do petróleo e seus derivados (gasolina, óleo diesel, entre outros). Durante a exploração, refinamento, transporte ou operações de armazenamento do petróleo e/ou de seus derivados, podem ocorrer derramamentos acidentais ou não, ocasionando a contaminação de solos, rios, etc. com perigos à saúde. Brasil tem uma elevada contaminação de solos com materiais que causam ou que podem causar danos à saúde humana, animal ou ao meio ambiente (Lei 13.577/2009).

Um informe recente da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo revelou um aumento de áreas contaminadas neste estado, onde 72% destas correspondem às atividades dos postos de combustíveis, e 19% corresponde ao setor industrial (Figura 2) (CETESB, 2017). Segundo a CETESB dentre os principais poluentes encontram-se: o diesel, a gasolina, os solventes aromáticos: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), assim como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), metais e solventes halogenados.



Distribuição por atividade - dezembro de 2017

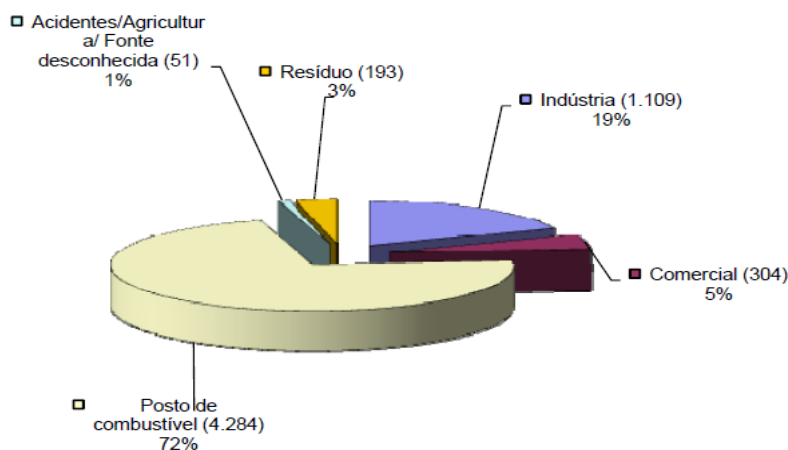


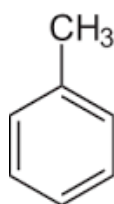
Figura 2. Evolução do número de áreas contaminadas cadastradas no Estado de São Paulo (Lei 13577/2009). Distribuição por atividade. Fonte: CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Dezembro 2017

2.6 Natureza do tolueno e a sua liberação para o meio ambiente

O tolueno e outros hidrocarbonetos aromáticos como xilenos, benzeno e etilbenzeno, são poluentes onipresentes (Cruden *et al.*, 1992; Atlas, 1995; Huertas *et al.*, 1998) e são conhecidos sob o acrônimo BTEX. O tolueno constitui, junto com os outros hidrocarbonetos, uns dos principais constituintes da gasolina, e cuja composição pode ser variável em dependência da fonte do petróleo, das mesclas em estoques, etc. (Kostecki e

Calabrese, 1993). Classifica-se como poluente prioritário devido à sua alta mobilidade e toxicidade (Mehlman, 1992), podendo ser transportados rapidamente através do solo e da água subterrânea devido a sua volatilidade e solubilidade (Costa *et al.*, 2008).

O tolueno é produzido principalmente a partir do petróleo, constitui a matéria-prima na produção de benzeno, e é um componente chave para o aumento de octanagem na mistura da gasolina. É amplamente usado como matéria-prima na produção de outros produtos químicos tais como solvente em tintas, revestimentos, adesivos e produtos farmacêuticos (Beauregard, 1993). A fórmula molecular de tolueno é $C_6H_5CH_3$; sua estrutura molecular é representada como a seguir:



Segundo Beauregard (1993) o tolueno é liberado ao ambiente de várias fontes criadas pelo homem:

(1) as emissões de veículos motorizados, derramamentos ou vazamentos durante as atividades de comercialização de gasolina, vazamentos de produtos químicos. Estas fontes de contaminação são chamadas de inadvertidas e representam 65% das emissões;

(2) de processos nos quais o tolueno é usado (33%)

(3) da produção de tolueno (2%).

Além dessas fontes, o tolueno pode atingir o solo pela disposição de lodos municipais ou resíduos de refinaria. A presença de tolueno nos solos é significativa em escala local.

O tolueno possui uma alta volatilidade associada à sua alta pressão de vapor e baixa solubilidade em água, motivo pelo qual tende a volatilizar, e como consequência a maior quantidade encontra-se no ar, mas também é encontrado em menor quantidade no lençol freático e nos solos. A média de volatilização relatada para este solvente encontra-se num intervalo de 2,2 a 28 dias (Howard, 1990; Anderson *et al.*, 1991; Kostecki, 1993)

Embora uma grande quantidade de tolueno volatilize uma quantidade do que se derrama fica retido no solo. Quando em contato com o solo, o contaminante pode ficar retido (sorvido) ou pode percolar até o subsolo. Apesar da alta taxa de volatilidade, a sua migração depende da capacidade de retenção do solo e o volume vazado. De forma geral, quando ocorre um vazamento o contaminante tende a descer pela influência da gravidade e das forças capilares. Se o volume vazado for pequeno em relação à capacidade de retenção

do solo e a pluma de contaminação não tiver atingido o nível d'água, a massa do contaminante tenderá a ficar retido (US EPA, 1996, Batista dos Anjos, 2012).

O transporte no solo também depende da temperatura, a umidade e do teor de matéria orgânica. A migração do tolueno também é moderadamente retardada pela sua adsorção em solos ricos em matéria orgânica, mas será lixiviada em solos com baixo teor orgânico (Wilson *et al.*, 1981, Jim e O'Connor, 1990; García-Peña *et al.*, 2001). Ou seja, o solvente é rápida e extensivamente sorvido quando adicionado a um solo que contem grande quantidade de matéria orgânica.

O tolueno foi escolhido como modelo para o estudo, uma vez que ele é amplamente utilizado como matéria prima fundamental para vários produtos, possui uma moderada mobilidade nos solos, e porque tal como outros BTEX, a sua sorção nesta matriz é retardada pela presença de matéria orgânica, solos nos que *Sporothrix* habita normalmente. Além disso, devido a que o tolueno pode ser facilmente degradado por os microrganismos do solo.

2.7 Degradação do tolueno por microrganismos

Uma vez no ambiente, os contaminantes podem estar sujeitos a uma combinação de processos que podem afetar o seu destino e comportamento (Hodgson, 2004 em Costa *et al.*, 2008; Holt, 2008). As substâncias potencialmente tóxicas podem ser degradadas por processos abióticos e bióticos que ocorrem na natureza. No entanto, algumas delas resistem ditos processos e são capazes de persistirem no ambiente por longos períodos.

O tolueno e muitos outros solventes orgânicos provocam a morte dos microrganismos devido ao rompimento da sua membrana celular (Sikkema *et al.*, 1995; Isken *et al.*, 1996). Porém, diversos microrganismos possuem capacidade de sobreviverem por adaptação ou mutações nestes ambientes com substancias tóxicas, e podem utilizá-las como fonte de carbono participando nos processos de biodegradação (Cox *et al.*, 1993, Cerniglia, 1997; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2001).

O tolueno que fica retido no solo é biodegradado na maioria dos solos num intervalo de 2 a 92 dias, segundo relatam estudos de degradação sob diferentes condições experimentais (Slooff e Blokzijl, 1988; Davis e Madsen, 1996).

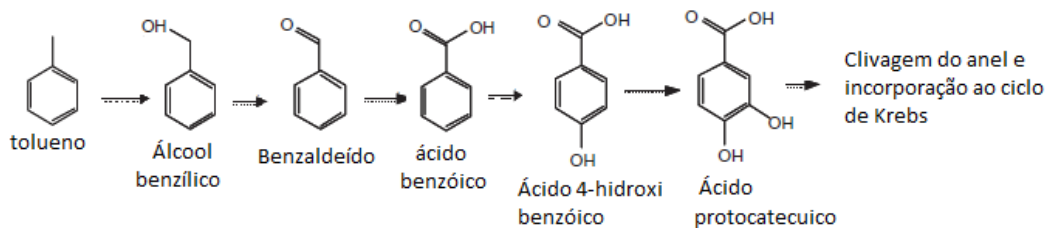
Os mecanismos desenvolvidos pelos microrganismos para a biodegradação consistem por uma parte na indução de enzimas específicas para a degradação do substrato, e por outra, na alteração da atividade enzimática originada por processos de adaptação genética como a recombinação, transposição ou mutação. Também podem estar implicados

processos de transferência genética de forma que por transformação, transdução ou conjugação, o microrganismo adquire genes que permitem ampliar sua diversidade metabólica (van der Meer *et al.*, 1991). Estes processos facilitam-se pelo fato de que muitas rotas metabólicas estão localizadas em plásmidos transmisíveis ou transposons. Outros autores relatam alguns plásmidos que contêm genes implicados em rotas metabólicas de compostos aromáticos (Frantz e Chakrabarty, 1986).

Muitos padrões catabólicos destes compostos têm sido descritos, particularmente nas bactérias, em cepas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Gibson, 1970; Inoue, 1989; van der Meer *et al.*, 1991; Huertas *et al.*, 1997). Porém, a degradação aeróbica nos fungos tem sido menos estudada do que em bactérias (Holland *et al.*, 1988; Yadav e Reddy, 1993; Weber *et al.*, 1995; Cox *et al.*, 1997; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2001). Embora a biodegradação de tais poluentes esteja bem documentada em procariotos, não foi até meados da década de 1990 quando foi demonstrada uma capacidade semelhante em fungos filamentosos, em que a cepa de *Cladosporium sphaerospermum* foi descrita por sua capacidade de crescer em tolueno como única fonte de carbono e energia, mineralizando-o completamente (Weber *et al.*, 1995).

Os fungos filamentosos desenvolveram uma habilidade extraordinária para se adaptar às mudanças do ambiente, em grande parte devido a sistemas de defesa enzimáticos que os protegem de compostos exógenos tóxicos– xenobióticos (Črešnar e Petrič, 2011). Em geral, os fungos estão envolvidos em três modos principais de metabolismo de hidrocarbonetos, cada um com seus próprios mecanismos enzimáticos: (1) reações de transformação parcial; (2) degradação completa de hidrocarbonetos na presença de um segundo substrato compatível; e (3) utilização independente de hidrocarbonetos como única fonte de carbono para o crescimento.

O possível padrão metabólico para a assimilação de tolueno em *Sporothrix spp.* (CBS 110552) envolve essencialmente a atividade das enzimas do complexo citocromo P-450 monoxigenases e ocorre via hidroxilação do grupo metila a álcool benzílico, o qual é oxidado adicionalmente a ácido benzóico via benzaldeído; o ácido benzóico então é hidroxilado em ácido protocatecuico (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006). Nos fungos, a clivagem do anel dos compostos catecólicos ocorre mais comumente na posição orto, dando origem a ácidos mucônicos, que são incorporados ao metabolismo do núcleo por meio da via do 3-oxoadipato (Cain *et al.*, 1968). A seguir o esquema da Rota metabólica para a assimilação aeróbica do tolueno em *Sporothrix* (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006).



Fonte: Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006 (Adaptado)

2.8 Fatores de virulência desenvolvidos em resposta ao estresse ambiental

As estratégias dos fungos patogênicos para sobreviverem às condições ambientais adversas podem prepará-los para resistir às condições no hospedeiro (Casadevall *et al.*, 2003). A patogenicidade é definida pela capacidade de um micróbico de causar dano em um hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 1999). A virulência é definida como a capacidade relativa de um micróbico para causar dano em um hospedeiro e é uma propriedade que só pode ser expressa em um hospedeiro suscetível, e em cuja interação tanto o micróbico como o hospedeiro trazem suas próprias propriedades emergentes (Casadevall e Pirofski, 1999; Casadevall *et al.*, 2011). Deste ponto de vista, a virulência constitui uma propriedade do patógeno, porém é modulada pela suscetibilidade e a resistência do hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 1999). Embora tanto a patogenicidade como a virulência só possam manifestar-se num hospedeiro suscetível, a patogenicidade é uma variável descontínua, isto é, existe ou não patogenicidade, enquanto a virulência é uma variável contínua, ou seja, é definida pela quantidade de dano ou doença que se manifesta (Pirofski e Casadevall, 2012).

Dano é um termo abrangente que engloba danos às células, tecidos e órgãos. Os danos no nível celular incluem necrose, apoptose e transformação maligna. Danos nos níveis de órgãos e tecidos incluem inflamação granulomatosa, fibrose resultante de inflamação crônica e tumor (Casadevall e Pirofski, 1999).

Os fatores de virulência podem ter vários papéis funcionais, incluindo a capacidade de facilitar a aderência microbiana, a invasão, ou ambos, também facilita a promoção do crescimento do micróbico em um hospedeiro evitando a sua detecção, a inibição da fagocitose e a regulação da capacidade de sobrevivência intracelular (Casadevall e Pirofski, 1999).

A origem e manutenção da virulência em fungos dimórficos são enigmáticas. A interação do fungo com um hospedeiro mamífero não constitui um requisito para a sobrevivência daqueles e sua virulência (Steenbergen *et al.*, 2004). Muitos fatores de virulência parecem ter capacidade “dual”, ou seja, conferem vantagens de sobrevivência tanto nos hospedeiros animais como no ambiente. Casadevall e colaboradores em 2003 chamaram a este fenômeno como virulência 'ready-made', o que pode ser definido como a capacidade dos fungos para produzir fatores de resistência que por sua vez convertem-se em fatores de virulência, permitindo a sua adaptação e sobrevivência tanto no ambiente quanto no hospedeiro (Casadevall *et al.*, 2003).

Vários fatores de virulência têm sido descritos em *S. schenckii*, dentre os quais se encontram a produção de melanina, o dimorfismo, compostos da parede celular, proteases, etc., alguns dos quais se descrevem posteriormente. O Quadro 1 resume alguns desses importantes fatores de virulência presentes neste fungo.

Quadro 1. Mecanismos utilizados por *S. schenckii* para sua proteção no meio ambiente e no hospedeiro (Téllez *et al.*, 2014)

Atributo	Função		Referencias
	No ambiente	No hospedeiro	
Parede celular	Protege a célula de mudanças drásticas do ambiente externo	Protege a célula de condições agressivas no tecido do hospedeiro	Oda <i>et al.</i> , 1983; Carlos <i>et al.</i> , 2003; Madrid <i>et al.</i> 2010; López-Esparza <i>et al.</i> , 2013
Melanina	Proteção da luz ultravioleta, proteção de temperatura extrema, suscetibilidade reduzida para degradação enzimática.	Resistente à fagocitose e oxidação através de células fagocíticas. Resistência antifúngica	Almeida-Paes <i>et al.</i> , 2009 Romero-Martínez <i>et al.</i> , 2000, Morris-Jones <i>et al.</i> , 2003
Ergosterol	Proteção contra oxidação por amebas da terra?	Proteção contra oxidação através de células fagocíticas	Sgarbi <i>et al.</i> , 1997
Dimorfismo	Morfologia de micélio em sua fase saprofítica à 25°C	Morfologia de leveduras em tecidos de hospedeiro à 35-37°C	Nemecek <i>et al.</i> , 2006; Gauthier <i>et al.</i> , 2008
Polimorfismo genético	Geração de diversidade de linhas para sobreviver a tensão ambiental?	Resistência antifúngica. Perfil de virulência diferente	Romeo and Criseo, 2013
Adesinas	Em outros fungos, genes de adesão são ativados através de fatores ambientais diversos como carbono e/ou nitrogênio, carência de alimentos, mudanças em pH ou níveis de etanol.	Adesão para matrix dérmica e subendotelial, transposição da barreira endotelial, imunomoduladores	Verstrepen <i>et al.</i> , 2003; Sampermans <i>et al.</i> , 2005; Figueiredo <i>et al.</i> , 2007; Lima <i>et al.</i> , 1999, 2001, 2004; Ruiz-Baca <i>et al.</i> , 2008; Nascimento <i>et al.</i> , 2008; Teixeira <i>et al.</i> , 2013
Proteinases	Função nutricional	Lesão tecidual; degradação de anticorpos	De Rosa <i>et al.</i> , 2009; Monod <i>et al.</i> , 2002
Catalase	Proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS) de amebas do solo?	Proteção contra ROS dos fagócitos do hospedeiro	Davis <i>et al.</i> , 1991; Xiao-Hui <i>et al.</i> , 2008;
Superóxido dismutase	Proteção contra oxidantes derivados do oxigênio	Crescimento intracelular	Pérez-Sánchez <i>et al.</i> , 2010
Sideróforos	Captação de ferro no meio ambiente	Captação de ferro dentro do hospedeiro	Pérez-Sánchez <i>et al.</i> , 2010
SSG-1	Sobrevivência em condições de stress e limitações de nutrientes dentro do hospedeiro e no meio ambiente.		Pérez-Sánchez <i>et al.</i> , 2010

2.8.1 Produção de Melanina

As melaninas são macromoléculas hidrofóbicas carregadas negativamente e de alto peso molecular, formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos (Hamilton *et al.*, 2002). Os pigmentos resultantes são de cor marrom-escuro ou preta e encontram-se dentre os materiais bioquímicos mais estáveis, insolúveis e resistentes. A maioria das melaninas fúngicas é derivada da molécula precursora 1,8-di-hidroxi-naftaleno (DHN) e são conhecidas como melaninas DHN; a via biossintética que fornece a DHN foi denominada via policetídea e reside principalmente em ascomicetos e deuteromicetos (Bell *et al.*, 1986). Alternativamente, alguns fungos produzem melanina a partir da 1-3,4-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA) (Eisenman e Casadevall, 2012).

O pigmento aumenta a resistência dos fungos aos danos ambientais, e vai além, pois também contribui à virulência dos agentes patogênicos. Os fungos melanizados resistem à radiação e podem sobreviver a climas adversos, incluindo a Antártida e reatores nucleares contaminados (Zhdanova *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2010). Foram também encontrados em máquinas de lavar louça, onde devem resistir ao calor e a ação de detergentes (Zalar *et al.*, 2011).

A melanina fúngica pode influenciar a resposta imune do hospedeiro, interferindo com a função normal das células fagocíticas. Por exemplo, as células de *Fonsecaea pedrosoi* melanizadas reduzem a capacidade de *burst* oxidativo dos macrófagos (Cunha *et al.*, 2010). Dado que as melaninas podem reduzir a suscetibilidade das células fúngicas ao dano oxidativo (Wang *et al.*, 1994) a melanização pode aumentar a sobrevivência das células fúngicas no tecido, o que pode alterar a resposta inflamatória em virtude do aumento da carga microbiana (Mednick *et al.*, 2005).

Em células de mamíferos, a melanina é sintetizada por células especializadas conhecidas por melanócitos. A biossíntese da melanina ocorre em melanossomas, organelas relacionadas ao lisossomo. A formação de melanossomas passa por vários estágios morfológicos. Nos estágios iniciais, um andaime estriado pode ser visto. A melanina é gradualmente depositada, criando a aparência de faixas escuras no melanossoma. Eventualmente, melanossomas elípticos, escuros, formam-se e são secretados para queratinócitos próximos, onde eles têm um papel protetor contra a radiação ultravioleta (Raposo e Marks, 2002; Tolleson, 2005; Eisenman e Casadevall, 2012).

Embora a maioria dos fungos filamentosos sintetize a melanina por meio da via policetídea, o como e onde ocorre a biossíntese da melanina, e de que forma ela é

depositada como grânulos extracelulares, não está ainda bem elucidada. Porém, Upadhyay e colaboradores (2016) relataram que a proteção pela melanina depende de sua localização subcelular. Os autores descobriram que todas as enzimas envolvidas nos primeiros passos da biossíntese da melanina são recrutadas nos endossomas através de uma via de secreção não convencional. Em contraste, as enzimas tardias da melanina acumulam-se na parede celular. Tal compartimentalização subcelular da maquinaria biossintética da melanina ocorre tanto em *Aspergillus fumigatus* como em *Aspergillus nidulans*. Assim, a biossíntese de melanina fúngica parece ser iniciada em endossomos com exocitose levando à deposição extracelular de melanina, muito parecida com a síntese e o tráfico de melanina de mamíferos em melanossomas derivados endossomicamente (Upadhyay *et al.*, 2016). Vários estudos anteriores também relacionam a presença de melanossomas em fungos (Garrison *et al.*, 1979; Franzen *et al.*, 1999; San-Blas *et al.*, 1996).

A via DHN é responsável pela melanização da parede celular em *S. schenckii*, protegendo-o de danos físicos e químicos, e provavelmente agindo como um sequestrador de radicais livres (Romero-Martinez *et al.*, 2000). Estudos demonstram que os conídios e leveduras de *S. schenckii* produtores de melanina são mais resistentes à fagocitose pelos macrófagos e aos compostos oxidativos que as cepas não produtoras (Romero-Martínez *et al.*, 2000; Morris-Jones *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2006; Castelo-Teixeira *et al.*, 2010).

Garrison e colaboradores (1979) reportaram pela primeira vez a presença de corpos eletrodensos no citoplasma de leveduras de *S. schenckii*, notavelmente similares tanto *in vitro* como *in vivo*. As inclusões descritas parecem análogas aos corpos eletronicamente opacos relatados anteriormente em leveduras e hifas de *S. schenckii* (Garrison *et al.*, 1977). Embora a origem e a função dessas inclusões vacuolares e seu conteúdo permaneçam para ser determinada, sua ocorrência em células de *S. schenckii* *in vivo* é digna de destaque (Garrison *et al.*, 1979). Outros autores também observaram organelas de 231 ± 38 nm de diâmetro com um conteúdo eletrodense sugestivo de melanina em células de leveduras de *S. schenckii* (Almeida-Paes *et al.*, 2017).

2.8.2 Componentes da parede celular

A parede celular dos fungos é uma estrutura dinâmica que mantém o equilíbrio osmótico da célula, a proteção física contra outros microrganismos ou incluso contra a ação fagocítica das células do hospedeiro (Oda *et al.*, 1983; Latgé, 2010). A composição e organização da parede celular podem variar amplamente em resposta a alterações na

composição do meio de cultura e em resposta ao estresse devido às condições ambientais (Klis *et al.*, 2002).

A virulência de *S. schenckii* tem sido atribuída à presença de alguns componentes da parede celular envolvidos na interação com o hospedeiro, tais como as adesinas (Bernal *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 1999, 2001; Ruiz-Baca *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2009). A glicoproteína com peso molecular de 70 kDa (3-carboximuconato ciclase) (gp-70), o maior componente antigênico da porção proteica do complexo peptídico-polissacarídeo de *S. schenckii*, é uma glicoproteína tipo adesina que se une à laminina e fibronectina (Ruiz-Baca *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2013). Outra adesina, de peso molecular 47 kDa, isolada de leveduras e identificada como a enzima glicolítica enolase, foi reportada como imunogênica. A sua alta expressão nos isolados *S. schenckii* ATCC 16345 e *S. brasiliensis*, pode ser um alvo relevante no tratamento e prevenção da esporotricose (Portuondo *et al.*, 2016, 2017).

Outro componente da parede celular, o ergosterol, considera-se elimine as espécies reativas de oxigênio produzindo o peróxido de ergosterol, um mecanismo de proteção para escapar das espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose (Sgarbi *et al.*, 1997). Os polissacarídeos também foram reportados como inibidores da fagocitose (Oda *et al.*, 1983). Fernandes e colaboradores (1999) tem relatado que a virulência de conídios de *S. schenckii* parece ser paralela à composição de açúcares de parede celular, sendo que os conídios de 4 e 7 dias de incubação foram mais virulentos e apresentaram maior conteúdo de ramnose do que os conídios menos virulentos de 12 dias de incubação.

2.8.3 Sistema antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas nos processos metabólicos celulares aeróbicos. Eles incluem espécies como superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais reagem com vários alvos intracelulares, incluindo lipídeos, proteínas e DNA. Embora as ERO sejam geradas durante o metabolismo aeróbico normalmente, os efeitos biológicos nesses alvos intracelulares dependem de sua concentração. Durante o estresse oxidativo os níveis de ERO estão aumentados e são citotóxicos, e podem resultar em danos como a morte celular, mutações, aberrações cromossômicas e carcinogênese (Cerutti, 1985).

A concentração intracelular de ERO depende da produção e/ou remoção pelo sistema antioxidante. Este sistema inclui enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD), a

catalase (CAT) e uma peroxidase específica do substrato, a glutathiona peroxidase (GPx), dentre outras. A SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (O₂), enquanto a catalase e a peroxidase convertem o peróxido de hidrogênio em água e, no caso da catalase, em oxigênio e água. O resultado é que as duas espécies potencialmente perigosas, superóxido e peróxido de hidrogênio, são transformadas em água (Weydert *et al.*, 2010).

As células eucarióticas geralmente contêm a manganês-SOD (MnSOD) na matriz mitocondrial, a cobre-zinco-SOD (CuZnSOD) que está localizada predominantemente no citoplasma e no núcleo e a SOD extracelular (EC-SOD) (Weydert *et al.*, 2010). As MnSODs foram relatadas como importantes na defesa celular contra o estresse oxidativo e na patogênese de infecções fúngicas humanas (Cox *et al.*, 2003; Giles *et al.*, 2005).

Os organismos patogênicos são expostos a espécies reativas de oxigênio geradas por células fagocíticas. A SOD desempenha um papel na virulência e acredita-se que a diminuição da virulência de cepas mutantes de SOD se deve ao aumento da suscetibilidade às células fagocíticas do hospedeiro (Lynch *et al.*, 2000; Youseff *et al.*, 2012).

A primeira linha de defesa contra danos mediados por H₂O₂ é constituída pelas enzimas catalase e peroxidase. Um aspecto importante dessa defesa é a capacidade, por parte de muitos organismos, de induzir essas enzimas protetoras em resposta a um aumento do estresse oxidativo. Estudos gênicos e bioquímicos demonstraram que *Neurospora crassa* possui três catalases codificadas por três genes estruturais separados e que as atividades específicas das três enzimas variaram em resposta ao estresse mediado por superóxido e choque térmico (Chary *et al.*, 1989). Em outro estudo tem sido relatado que a catalase desempenha um papel importante na desintoxicação de H₂O₂ em *C. albicans* e *C. glabrata*, a atividade foi maior em *C. albicans* e *C. parapsilosis* em comparação com *C. glabrata* e *C. krusei* (Ramirez-Quijas *et al.*, 2015).

O acúmulo de ERO juntamente com a condensação da cromatina, a externalização da fosfatidilserina e a quebra do DNA constituem marcadores apoptóticos ou evidência de morte celular. A morte celular em fungos foi evidenciada por Madeo e colaboradores (1997, 1999, 2004). Outros estudos também relacionaram estes marcadores apoptóticos em fungos (Phillip *et al.*, 2003; Andrés *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2013).

2.9 Resposta imune contra *S. schenckii*

A defesa imune contra os fungos requer participação tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo. A imunidade inata responde imediatamente a um agente invasor e induz a ativação da resposta imune adaptativa por meio da apresentação de antígenos, co-estimulação e produção de mediadores solúveis como as citocinas (Plato *et al.* 2015). As células do sistema imune inato, particularmente as células fagocíticas apresentadoras de antígenos (APCs) (dendríticas e macrófagos) são capazes de reconhecer estruturas moleculares conservadas na superfície dos patógenos (PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*)) por meio de receptores de reconhecimento de padrão, como os PRR (*pattern recognition receptors*) presentes nessas células (Abdelsadik e Trad, 2011). Os PAMPs presentes nos fungos, como os carboidratos (β -glucanas), glicoproteínas (mananas), ácidos nucleicos (DNA e RNA), glicolípídeos (lipopolissacarídeos), peptidoglicano, lipoproteínas e outros, são reconhecidos pelo menos por um dos receptores presente dentre as 4 grandes famílias de PRRs: (1) receptores de lectina C (CLRs), como dectina 1, dectina 2, DC-SIGN, mincle e receptor de manose; (2) receptores semelhantes a NOD (domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo), como o inflamassoma NALP3; ou NLRP3; (3) receptores *scavenger* (CD5 e CD36); e (4) a família de receptores semelhantes a Toll (TLR), protagonistas no reconhecimento na imunidade inata em vertebrados (Netea *et al.*, 2006; Romani, 2011).

As respostas de macrófagos M1/M2 descrevem as duas atividades principais e opostas dos macrófagos. A atividade M1 inibe a proliferação celular e causa dano tecidual, enquanto a atividade M2 promove a proliferação celular e o reparo tecidual. Os nomes M1 e M2 foram escolhidos porque os macrófagos M1 e M2 promovem respostas Th1 e Th2, respectivamente. Os produtos de respostas Th1 e Th2 (por exemplo, IFN- γ , IL-4) também regulam negativamente a atividade M2 e M1, respectivamente (Mills, 2012).

O sistema imune adaptativo desempenha um papel crucial na resposta imune, com participação imprescindível das células T e B. As células T compreendem os tipos citotóxico e “*helper*”, as quais, por sua vez, podem assumir diversos fenótipos efetores ou de memória. As células T “*helper*” (Th) podem ser subdivididas em um número cada vez maior de subtipos. As células Th1 e Th2 foram as primeiras descritas (Mosmann e Coffman, 1987). Mais recentemente, dois outros importantes subtipos de células Th foram descritos: as células T regulatórias (Treg), as quais expressam o fator de transcrição “*forkhead box P3*”

(Foxp3) e exercem várias funções imunossupressoras, e as células Th17, assim denominadas pela produção característica de IL-17A (Zhu e Paul, 2010; Nakayamada *et al.*, 2012).

As células Treg são uma subpopulação de células T especializadas que controlam a resposta imune e, assim, mantém a homeostasia e a tolerância a auto-antígenos. Várias populações de células Treg CD4⁺ foram identificadas, incluindo Foxp3⁺, Tr1, Th3, Foxp3⁻ e CD4⁺VEGFR1^{high} (Shin *et al.*, 2015). As células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ são as mais importantes com atividade supressora e desempenham um importante papel no controle da autoimunidade, da rejeição a transplantes e da reação inflamatória exacerbada a diversos patógenos (Miyara e Sakaguchi, 2007). As células Treg podem ser divididas em naturais, derivadas do timo, e induzíveis, derivadas de células T “naive” da periferia e diferenciadas em células efetoras (Belkaid *et al.*, 2009; Richards *et al.*, 2015).

Por outro lado, as opsoninas (imunoglobulinas), colectinas e componentes do complemento (C3bi) aumentam o repertório de reconhecimento antigênico favorecendo a internalização e morte dos microrganismos pelos macrófagos (Stuart e Ezekowitz, 2005).

Estudos realizados em nosso laboratório utilizando diferentes modelos murinos de infecção por *S. schenckii*, evidenciaram o importante papel da imunidade inata no controle da infecção por esse fungo (Carlos *et al.*, 2009). Os estudos demonstraram que os macrófagos e as células dendríticas são células efetoras importantes na resposta imune inata permitindo uma ligação com a resposta adaptativa (Alegranci *et al.*, 2013; Verdan *et al.*, 2012). Na resposta a *S. schenckii* o adequado balanço entre a resposta de macrófagos M1/M2 permite uma resposta fungicida por meio dos macrófagos M1 no começo da infecção, e um controle do dano inflamatório nos tecidos infectados em etapas posteriores mediados pela resposta de macrófagos M2 (Alegranci *et al.*, 2013). Entre os mediadores de macrófagos envolvidos na eliminação do fungo encontram-se o óxido nítrico, o peróxido de hidrogênio e as citocinas pró-inflamatórias (Gonçalves *et al.*, 2015; Maia *et al.*, 2016).

Em estudos prévios tem se demonstrado que os macrófagos quando ativados em cultura com componentes da parede celular do fungo produzem citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α que estimulam a resposta fagocítica (Carlos *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2016) e liberam compostos intermediários do nitrogênio e do oxigênio com função fungicida (Carlos *et al.*, 2003; Sheisa *et al.*, 2012). Outros estudos demonstraram *in vitro* a efetividade do óxido nítrico (NO) na eliminação das células leveduriformes de *S. schenckii*, no entanto esse efeito se tornou limitado quando avaliado em modelo de esporotricose murina (Fernandes *et al.*, 2000, 2008). Essa supressão da resposta imune contra o fungo foi previamente relatada por Carlos e colaboradores (Carlos *et al.*, 2003), evidenciou-se o papel

do NO com uma forte participação na eliminação do *S. schenckii* nas primeiras três semanas da infecção, comprovada pela diminuição do crescimento do fungo no fígado e baço. Por outro lado, entre a quarta e sexta semana de infecção, a alta produção do NO, estimulada pelo IFN- γ e IL-12, aumentou a suscetibilidade dos animais à infecção nos mesmos órgãos avaliados (Carlos *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2006). Também foi demonstrado o papel das citocinas pró-inflamatórias e o peróxido de hidrogênio na defesa contra *S. schenckii* em um modelo de infecção sistêmica (Maia *et al.*, 2016).

De modo geral, a ativação dos PRRs desencadeia uma cascata de eventos intracelulares produzindo a ativação de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86 nas APCs e a produção de citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 (Lahiri *et al.*, 2008) e quimocinas, cuja função é orquestrar a reposta antifúngica (Goodridge e Underhill, 2007). Alguns dos PRRs implicados no reconhecimento de *S. schenckii* têm sido abordados nos últimos anos identificando-se o papel imuno estimulante dos componentes da parede deste fungo. Foi demonstrado o reconhecimento do fungo por receptores de reconhecimento de padrões do tipo “Toll-like receptor” (TLR) TLR-4 utilizando camundongos C3H/HeJ deficientes do receptor TLR-4 (Sassá *et al.*, 2009; 2012). A produção de NO, TNF- α e IL-10 foi diminuída nos camundongos C3H/HeJ, demonstrando que o TLR-4 está envolvido no reconhecimento de frações lipídicas da parede celular de *S. schenckii*.

O receptor TLR-2 também participa no reconhecimento de componentes da parede celular deste fungo. Negrini e colaboradores (2013) demonstraram que os macrófagos obtidos de camundongos *knockout* para o receptor TLR-2 (TLR2 $^{-/-}$) apresentaram diminuição tanto na fagocitose como na produção de TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-10 quando estimulados em cultura com os antígenos solúveis e lipídicos da parede celular do fungo, indicando a importância desse receptor no reconhecimento do fungo. Negrini (2013) também demonstrou que a produção de IL-17 foi independente de TLR-2 com os animais TLR-2 $^{-/-}$, apresentando alta produção deste mediador quando comparados aos animais selvagens, portando o receptor TLR-2 (Negrini *et al.*, 2013).

Outros importantes receptores da imunidade inata que estão envolvidos na defesa contra *S. schenckii* recentemente descritos são o inflamassoma NLRP3 e a Dectina-1. Gonçalves e colaboradores (2017) usando camundongos *knockout* (KO) NLRP3, ASC e caspase-1 mostraram que esses animais foram mais suscetíveis à infecção do que o tipo selvagem, sugerindo que as respostas desencadeadas por NLRP3 contribuem para a proteção do hospedeiro durante a infecção por *S. schenckii*. Por outro lado, Jellmayer e colaboradores (2017) mostraram que a expressão de Dectina-1 por macrófagos peritoneais foi aumentada

nos dias 10 e 15 pós-infecção, juntamente com uma elevada produção de NO e secreção *ex vivo* de IL-10, TNF- α e IL-1 β . Os autores mostraram também que o bloqueio da Dectina-1 mediada por anticorpos inibiu a produção de citocinas em camundongos infectados e não infectados, principalmente após a estimulação de β -1,3-glucana.

Paralelamente, nossa equipe também demonstrou o papel da resposta adaptativa contra *S. schenckii* mediada por linfócitos Th1/Th2/Th17 e anticorpos, durante o processo infeccioso (Maia *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2015; Portuondo *et al.*, 2016). Nesses estudos evidenciou-se que as respostas Th1 e Th17 estão envolvidas na eliminação do fungo, entretanto a resposta Th2 favorece a persistência da infecção. Em referência aos anticorpos alguns autores que estes não participam na resposta antifúngica, porém, Nascimento e colaboradores (2008) e de Almeida e colaboradores (2015) demonstraram que anticorpos monoclonais contra gp70 inoculados em camundongos conseguiram proteger contra a infecção experimental. Um resultado similar foi obtido por Portuondo e colaboradores (2016) inoculando soro de animais vacinados com proteínas da parede de *S. schenckii* com adjuvantes de alumínio, os quais protegeram contra uma subsequente infecção pelo próprio fungo. Estes anticorpos favoreceram ao opsonização com aumento da fagocitose.

2.10 JUSTIFICATIVA

Para diferentes fungos patógenos tem sido demonstrada a influência dos fatores ambientais na virulência, apesar de sua importância, existe uma notável escassez de dados do impacto do tolueno contaminante dos solos na virulência dos fungos patogênicos. O tolueno constitui um dos principais hidrocarbonetos contaminantes dos solos onde naturalmente habita *S. schenckii*. Considerando que Brasil é um país com elevada contaminação dos solos, e devido à expansão da atividade petrolífera com expectativas de aumento nas operações de extração, refinação, transporte, comercialização, torna-se importante a realização de estudos que venham avaliar a influência da contaminação química na virulência do fungo e na patogênese da esporotricose, com o intuito de fornecer novas estratégias e ferramentas de prevenção e controle da enfermidade. Com base nesses antecedentes, neste estudo avaliaram-se as mudanças produzidas na virulência de *S. schenckii* no processo de adaptação à contaminação por tolueno, e averiguaram-se os fatores de virulência gerados pelo fungo que modificam a sua patogênese.

2.11 HIPÓTESES DE TRABALHO

No processo de adaptação de *S. schenckii* à contaminação de seu habitat por tolueno, o fungo é capaz de gerar mecanismos de adaptação que por sua vez, podem se transformar em fatores de virulência que modificam a sua patogênese.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do tolueno no crescimento, virulência e imunopatogenia de *Sporothrix schenckii*.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar o efeito do tolueno no crescimento de *S. schenckii*.
2. Determinar o consumo de tolueno pelo fungo *S. schenckii*.
3. Avaliar as mudanças morfológicas e na composição proteica da parede celular dos fungos depois de cultivados em presença de tolueno.
4. Avaliar a atividade das enzimas Superóxido Dismutase e Catalase
5. Avaliar a sensibilidade ao estresse oxidativo e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio dos fungos tratados com tolueno.
6. Determinar os padrões de virulência do fungo exposto ao tolueno em camundongos infectados.
7. Avaliar o comportamento da resposta imune inata e específica em camundongos infectados com cepas de *S. schenckii* expostas a tolueno

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de experimentos

O desenho experimental do presente estudo descreve-se na Figura 3. O fungo *S. schenckii* (ATCC16345), foram mantidos em forma miceliar em meio Mycosel. Um fragmento de 1 cm² aproximadamente, foi colocado em meio Sabouraud Dextrose Broth (SDB) à temperatura de 30° C sob agitação em agitador rotatório a 130 ciclos/min. Aos 4 dias de incubação foram tomadas alíquotas de suspensão fúngica para realizar todos os testes.

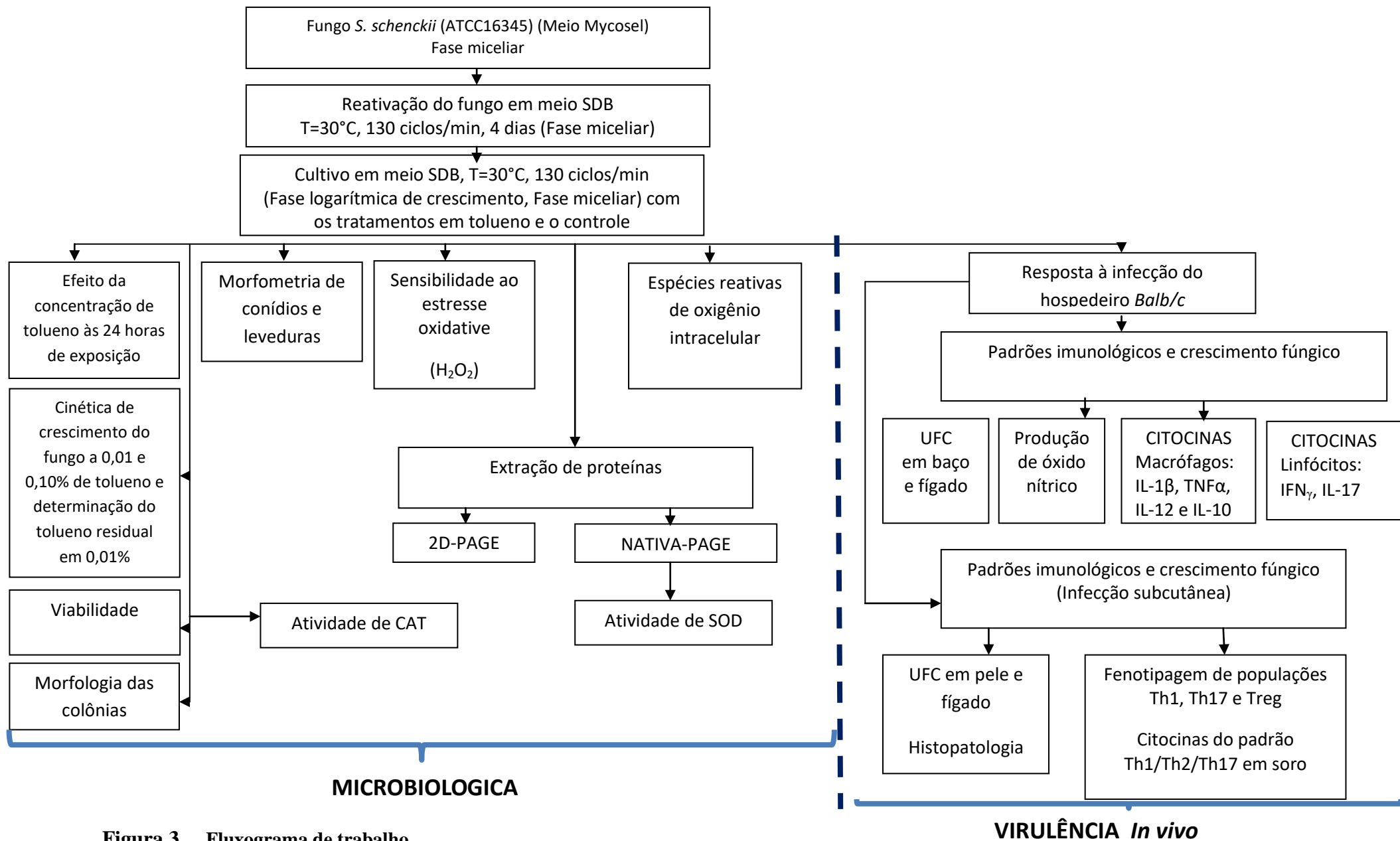


Figura 3. Fluxograma de trabalho

4.2 Fungo

Utilizou-se a cepa *S. schenckii* ATCC 16345 (Ss16345) isolada de um caso de infecção pulmonar humano de esporotricose (Baltimore, MD), e cedida gentilmente pelo Instituto Nacional de Infectologia (INI) Evandro Chagas da Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. Atualmente esta espécie é mantida no laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) de Araraquara, na forma miceliar a 25°C em meio de cultura sólido Mycosel™ (BD Biosciences).

4.3 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos *Balb/c* machos, pesando entre 20 e 25 gramas com 5 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto, SP. Estes animais foram mantidos em mini-isoladores, em grupos de 3 animais, sob condições ambientais estáveis (23°C ± 2°C e 56% de umidade relativa do ar) e ciclos claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram oferecidas ad libitum. Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram submetidos a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Protocolo nº 48/2015).

4.4 Condições de crescimento

Devido aos escassos estudos de crescimento de *S. schenckii* em presença de tolueno em condições controladas (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2001), assim como por conta da volatilidade dessa substância, foram realizados testes preliminares de condições de cultivo, o qual permitisse a repetitividade e a avaliação da imunopatogenia do fungo. Resumidamente, um tapete de aproximadamente 1 cm² da fase miceliar crescido em meio de cultura sólido Mycosel™ (BD Biosciences) a 25° C, foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido Sabouraud Dextrose Broth (SDB) e incubado a 30° C sob agitação constante de 130 ciclos/min durante 4 dias. Após a incubação, alíquotas de conídios foram semeadas para os diferentes experimentos em meio SDB e então incubados por 5 dias sob mesmas condições anteriores.

4.5 Efeito da concentração de tolueno no crescimento de *S. schenckii*

Alíquotas de 1×10^7 UFC/mL do fungo procedente de culturas realizadas como descrito no item 3.1 foram colocados em frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de Sabouraud Dextrose Broth (SDB), selados com válvulas *Mininert* (SUPELCO) de 24 mm com septos de teflon (PTFE) para evitar a evaporação do tolueno (Figura 4). O tolueno foi suplementado a 0,01, 0,10%, 1,0 e 10,0 % (v/v). Em seguida, os frascos foram incubados a 30° C, sob agitação constante de 130 rpm por 24 horas. Culturas sem tolueno foram testadas como controle. A sobrevivência foi determinada após 24 horas de incubação mediante contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas Petri contendo Sabouraud Dextrose Ágar (SDA). Uma alíquota procedente de cada concentração foi semeada em placas de Petri contendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) acrescido de cloranfenicol e incubadas a temperatura ambiente. Os experimentos foram feitos em duplicata. O efeito do tolueno no meio SDB foi testado como controle negativo. A sobrevivência foi calculada segundo a equação:

$$\%Sobrevivência = 100 - \%Inibição$$

$$\%Inibição = \left(1 - \frac{UFC \text{ tratamento}}{UFC \text{ controle}}\right) * 100$$

Quadro 2. Concentrações de tolueno utilizadas para 50 mL de meio.

(v/v) %	0,01	0,10	1,00	10,00
Concentração estimada no sistema (µg/mL)	86.23	862,3	8623	86230

4.6 Determinações analíticas

O consumo de tolueno foi determinado por injeção em *headspace* em cromatógrafo a gás (CG) (Pelkin Elmer-Clarus 680) equipado com detector de ionização de chama (FID). Um volume de 650 µL foi injetado a uma coluna Elite-624 (30 m de comprimento, 0.25 mm diâmetro interno x 1,4 µm diâmetro de filme), e composição Crossbond® 6% cyanopropylphenyl/94% dimethylpolysiloxane. Foi usado o gás Hélio ultrapuro (99.995%) como carregador (13 *psia* e 1 ml/min) e foi usado hidrogênio como combustível para o FID.

A temperatura do injetor foi 180°C. A temperatura do forno de CG foi programada como segue: mantido a 60°C por 1 min, seguido aquecimento a 20°C/min até 180 °C, e finalmente mantido a 180°C por 15 min. e para o detector FID 200°C.

4.6.1 Curva padrão de tolueno. Linearidade e intervalo

A curva padrão foi realizada em frascos contendo meio de cultura com cinco diluições num intervalo de concentrações que vão desde 5.39 até 172,4 µg/mL de tolueno. Depois de preparados, estes padrões externos de qualidade foram analisados em CG para obter os cromatogramas e as áreas dos picos em função da concentração.

4.6.2 Identificação e quantificação de tolueno por cromatografia gasosa

Amostras foram tomadas a cada 24 horas e depositaram-se em vials de 10 mL selados com tampas de alumínio e septos de teflon. Os tubos foram colocados em auto injetor “*headspace*” (Perkins Elmer Turbo Matrix Trap, USA) acoplado a cromatógrafo a gás (CG, Perkins Elmer, USA) para as análises e ajustado a 180°C. As medições foram realizadas em modo “*Splitless*”. A identificação do tolueno foi realizada pelo tempo de retenção. A quantificação determinou-se pela área embaixo da curva fornecida pela cromatografia e comparando-as com as obtidas dos padrões. As amostras foram analisadas em iguais condições que os padrões.

O cálculo da concentração de tolueno no meio de cultura foi baseado no coeficiente de partição água-ar (K_{wa}) (coeficiente adimensional da lei de Henri) (MacKay e Shiu, 1981; EPA, 2017) à temperatura de trabalho 30°C, pela seguinte equação:

$$K_{wa} = \frac{C_{gás}}{C_{aq}} ;$$

Onde, $C_{gás}$ e C_{aq} , são as concentrações de tolueno na fase gasosa e aquosa, respectivamente.

A validade do método foi feita segundo Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 de ANVISA para amostras biológicas.

4.7 Crescimento em tolueno

Culturas suplementadas com 0,01% (v/v) de tolueno foram utilizadas para avaliar o crescimento e o consumo de solvente. Foi escolhida esta concentração tomando como referência os valores das normas de proteção ambiental para solos e águas subterrâneas da CETEBS 2014, sendo que para categoria industrial o valor limite é de 80 mg/1000 kg solo seco. Também foram levados em conta os valores permissíveis para hidrocarbonetos aromáticos em solos do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 420), cujos valores são de 35, 40 e 95 mg/kg para as áreas agrícola, residencial e industrial, respectivamente.

Os testes foram realizados em frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de Sabouraud Dextrose Broth (SDB), selados com válvulas *Mininert* (SUPELCO) de 24 mm com septos de teflon (PTFE) (Figura 4), sob agitação constante (130 rpm) e 30°C por 5 dias. O crescimento foi avaliado pela contagem de UFC e a concentração de tolueno foi determinada por Cromatografia a Gás (CG) com *headspace* segundo a técnica analítica descrita no item 3.6. As amostras foram comparadas com culturas de fungo sem tolueno, e com culturas estéreis para diferenciar as perdas de solvente devido a processos abióticos e aqueles relacionados com o consumo de tolueno (Fan & Scow, 1993; Prenafeta *et al*, 2006)

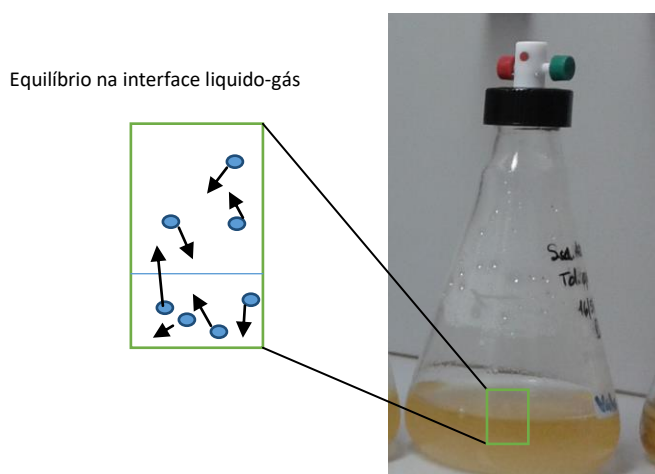


Figura 4. Sistema de estudo utilizado para os experimentos com válvulas *Mininert*

4.8 Ensaio de viabilidade celular utilizando microscopia de fluorescência

A viabilidade celular ao quinto dia do crescimento foi determinada segundo o teste LIVE/DEAD® yeast viability *kit* da Molecular Probes, o qual combina FUN-1 com um marcador de superfície fúngica o Calcofluor™ White M2R. Foram centrifugadas 10^7 células na fase exponencial do cultivo a 10000xg durante 5 minutos e temperatura ambiente, lavadas e ressuspendidas em tampão 2% D-(+) glucose e 10mM Na-HEPES (DH) (pH 7.2) em tubos de microcentrífuga. A suspensão foi corada com uma solução de FUN-1 e Calcofluor com uma concentração final de 20 μ M e 25 μ M, respectivamente. A mescla foi incubada a 30°C por 30 minutos. As células marcadas foram observadas em microscópio de fluorescência com filtros multiplas apropriados para DAPI e fluoresceína (λ_{ex} =480 nm, λ_{em} =530 nm). As células com paredes celulares íntegras mostram uma cor azul, e aquelas ativas metabolicamente contem estruturas fluorescentes vermelhas, enquanto aquelas com pouca ou nenhuma atividade mostram uma fluorescência citoplasmática verde difusa extremamente brilhante e falta de estruturas vacuolares (Kwolek-Mirek *et al.*, 2014).

4.9 Mudanças do fungo após exposição a tolueno

4.9.1 Morfologia das colônias

- a) Alíquotas de fungo crescido a 0,01 e 0,10% de tolueno em meio líquido foram semeadas em placa de Petri contendo ágar Mycosel. O diâmetro da colônia foi monitorado aos 6 e 19 dias em atmosfera livre de solvente com paquímetro digital.
- b) Dez microlitros de fungo contendo 4×10^3 conídios/mL foram semeados em placas de Petri contendo SDA e mantiveram-se em atmosfera de tolueno. Mediram-se os diâmetros das colônias com paquímetro digital aos 6 e 19 dias de incubação.

Observaram-se as mudanças morfológicas em microscópio estereoscópico (Leica Pz, Alemanha).

4.9.2 Micromorfologia

4.9.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As mudanças na superfície dos conídios expostos ao tolueno foram observadas por microscopia eletrônica de varredura, entanto a microscopia de transmissão (MET) foi utilizada para avaliar as possíveis mudanças na ultraestrutura. Os conídios e leveduras foram separados do meio de cultura por filtração com gaze estéril (várias camadas) e logo após foram lavadas mediante centrifugação com tampão fosfato salina (PBS, pH 7.0). Colocaram-se em placas de 96 poços e foram fixadas com solução de 2,5% glutaraldeído a 4°C e após, lavadas com o próprio tampão fosfato, desidratadas em série crescentes de etanol (50, 60, 70, 80, 90 e 100%), secadas e cobertas com ouro em um metalizador Balzer Sputtering SCD-030 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein). As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura FEG-MEV (JEOL, modelo 7500F) do Instituto de Química de Araraquara da (UNESP) operado a 2 kV.

4.9.2.2 Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

Conídios crescidos 5 dias a 0,01 e 0,10 % (v/v) de tolueno foram separados das hifas através de várias camadas de gaze estéril, o qual foi confirmado por observação sob o microscópio. Os sedimentos fúngicos foram colocados em solução de fixação contendo 2.5% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,10M (pH 7, 2) (Sigma-Aldrich), overnight a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos e expostas ao dicromato de potássio. As amostras foram lavadas, embebidos em ágar e cortados em pequenos cubos de aproximadamente 0.5 a 1 mm³, e após desidratados em concentrações crescentes de etanol, e foram então colocadas em resina Spurr, seccionadas em blocos ultrafinos com o auxílio de um ultramicrotomo e colocadas em grades de cobre. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM- 100 CXII) equipado com câmera digital (Hamamatsu ORCA-HR), no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, SP. As mudanças nas organelas, na parede celular e na membrana

citoplasmática foram observadas e comparadas com as células não tratadas. As imagens digitais foram capturadas em 5.000X e 40.000X. A espessura da parede celular foi determinada usando quatro medidas independentes para cada imagem, a partir da colocação aleatória de uma grade de pontos cardeais (Renzoni *et al.*, 2011). Os valores reportados representam a média de 42 células para cada grupo. As medições foram determinadas utilizando o software ImageJ.

4.9.3 Conversão à fase de levedura

Após avaliar o crescimento em tolueno foi testada a capacidade de reversão à fase leveduriforme. Frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI) foram inoculados com uma suspensão de conídios (20×10^6 UFC/mL) crescidos a 0,01 e 0,10% (v/v) de tolueno. Frascos sem tolueno foram usados como controle. Cada tratamento foi incubado por 7 dias, em triplicata, e observados ao microscópio ótico. A reversão a leveduras foi documentada em microscópio eletrônico seguindo o protocolo para MEV.

4.9.4 Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase

4.9.4.1 Obtenção do extrato de enzimas

O extrato de enzima de SOD foi preparado segundo Niyomploy e colaboradores (2014) com algumas modificações. Os fungos foram cultivados sob as mesmas condições descritas no item 3.1, para as concentrações 0,01 e 0,10% (v/v) de tolueno num intervalo de 5 dias de incubação. As culturas celulares foram centrifugadas a 500xg por 10 minutos e lavadas três vezes com tampão Tris-HCl 25 mM gelado (pH 8,5). Cinco gramas de massa fúngica de cada tratamento foram sonicadas com tampão de extração Tris/HCl 25 mM, pH 8,5, contendo 2 mM de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e PMSF 1 mM para prevenir a atividade proteolítica. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação e em seguida, foram submetidos a precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%. As misturas foram incubadas “*overnight*”, e depois centrifugadas a 17880xg por 30 minutos. Os precipitados foram resuspendidos, dialisados com água deionizada e concentrados em tubos

AMICON Ultra-3k (Merck-Millipore), segundo as indicações do fabricante. Os volumes concentrados foram coletados e quantificados. As amostras armazenaram-se a -80°C até a separação em eletroforese para determinação da atividade enzimática. Todo o processo de extração e purificação foi realizado a 4°C.

4.9.4.2 Atividade da SOD

A atividade de SOD foi ensaiada fotoquimicamente em géis de poliacrilamida 10% (NATIVA-PAGE) com base na fotorredução do nitroazul de tetrazólio (NBT) e tampão Tris-glicina sob condições não desnaturantes segundo Kuo *et al*, 2013 e Weydert *et al*, 2010 com algumas modificações. O NBT é reduzido a azul de formazana, o qual é inibido por SOD se presente na amostra, apresentando-se como bandas acromáticas. A corrida realizou-se a 100 V, 4°C e 25 mA durante os primeiros 30 minutos, aumentando a 40 mA até completar 3 horas. Em cada poço foram colocados 23 µg de proteínas. O gel foi lavado com água deionizada e colocado em um recipiente com solução corante de 0,10% NBT durante 20 minutos sob agitação leve. Em seguida, a solução foi descartada e o gel lavado com água deionizada, logo depois o gel foi submetido à reação com uma solução composta de riboflavina 0,028 mM, PBS 0,10 M (pH 7) e TEMED 28 mM por 15 minutos no escuro e sob agitação. Após, o gel foi lavado com água deionizada e levado sob uma luz branca fluorescente durante 10-15 minutos. Todo o processo de coloração foi realizado a temperatura ambiente. As bandas foram intensificadas durante 24 horas a temperatura ambiente.

4.9.4.3 Teste qualitativo de atividade da Catalase

Para dividir o fungo em alto ou baixo produtor de catalase foi seguido o protocolo de Metchock *et al.*, 1999 com modificações. As placas de Petri contendo ágar *Mycosel* foram inoculadas com 100 µl de uma suspensão de conídios e incubadas a 28°C. Após, 100 µl de uma solução 3% de peróxido de hidrogênio foi adicionado às colônias. Foi observada a formação de bolhas de oxigênio. A formação de algumas pequenas bolhas após 20 a 30 segundos não são consideradas como positivas. A falta de catalase é definida pela falta ou fraca produção de bolhas.

4.9.5 Sensibilidade ao estresse oxidativo

O fungo foi cultivado em 0,01 e 0,10 % (v/v) de tolueno a 30°C e sob agitação (130 rpm) por 5 dias em meio SDB. Os ensaios de sensibilidade foram realizados segundo o protocolo de Ramírez-Quijas e colaboradores (2015) com modificações. Alíquotas de 20×10^6 conídios/mL foram suspendidas em água deionizada estéril. Diluições exponenciais dessa alíquota foram realizadas em placas de 96 poços contendo as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e incubadas a 28°C por 90 minutos, sob agitação leve. Em seguida, cada diluição foi semeada em placa Petri contendo SDA e incubada a temperatura ambiente. Foram realizados dois experimentos independentes. O fungo crescido sem tolueno foi utilizado como controle. As diluições de H_2O_2 foram feitas em concentrações entre 0 e 125 mM. O crescimento foi observado durante 6 dias.

4.9.6 Espécies Reativas de Oxigênio intracelular

As ERO endógenas foram avaliadas com corante Dihidrorodamina-123 (DHR-123) (Sigma-Aldrich, USA) segundo o protocolo de Shao e colaboradores (2016) com modificações. Resumidamente, os conídios crescidos em 0,01 e 0,10% de tolueno foram separados por filtração e em seguida, foram coletados e lavados com tampão PBS estéril centrifugando (2190xg, 5 min), e após resuspendidos em PBS em uma concentração de 6×10^6 conídios/mL. Em seguida foram corados com 5 μ g/mL DHR-123 e incubados no escuro a 37°C por 30 min. A fluorescência das células foi analisada em citômetro de fluxo FACS Accuri C6 (Becton-Dickinson, EUA) no canal FL1-A. Em paralelo, a intensidade de fluorescência emitida por células não crescidas em tolueno e tratadas com peróxido de hidrogênio foi usada como controle negativo e positivo, respectivamente.

4.9.7 Proteínas da parede celular do fungo cultivado em tolueno

A fim de identificar as proteínas envolvidas nas mudanças da virulência do fungo exposto ao tolueno foram realizadas análises proteômicas em conídios usando eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

4.9.7.1 Obtenção de proteínas da parede

Para a obtenção de conídios foi utilizado o protocolo descrito por Asif e colaboradores (2006) com modificações. Seis gramas de conídios crescidos em tolueno 0,10% e sem tolueno (controle) foram suspensos em tampão de extração (25mM Tris/HCl, pH 8,5); 2mM DTT; 5mM EDTA, 1% SDS; 1,5%(v/v) β -Mercaptoetanol) mais 1 mM PMSF e em seguida, incubadas por 3 horas sob agitação leve e 4°C. Os sobrenadantes obtidos após centrifugação (5000xg, 10 min) foram passados através de filtros microbiológicos de 0,22 μ m e precipitados com 15% ácido tricloroacético (TCA) durante 1 hora. Após centrifugação (15000xg, 20 min, 4°C) os precipitados foram dialisados contra água milli Q por 24 horas e concentrados em tubos Vivaspin (3000 MWCO) segundo as recomendações do fabricante. As proteínas foram dosadas e estocadas até a eletroforese 2D-PAGE.

4.9.7.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita pelo método do ácido bicinconínico (BCA) segundo as orientações do fabricante (Kit 23225 da Thermo Scientific, Estados Unidos) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão de proteínas. Esse método baseia-se na redução de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo o cobre (I) e formando um complexo com o BCA que é detectado a 562 nm (máxima absorvância).

4.9.7.3 Separação de proteínas por eletroforese bidimensional 2D-PAGE

A separação de proteínas foi realizada como descrito por Asif *et al.*, 2006 com algumas modificações. Brevemente, 620 μ g de extrato proteico foram diluídos em 250 μ L de solução de reidratação (7M Ureia, 2M Thiourea, 2% (w/v) Triton X-100, 0.28% DTT, 0.5% IPG buffer (pH 4–7), 0.002% de azul de bromofenol). Foram adicionadas à solução de reidratação 1.2% De Streak. As amostras foram aplicadas em tiras (IPG) de 13 cm de comprimento (pH 4-7) L (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare) e reidratadas *overnight* a 25°C. Depois de concluída a reidratação, foi realizada a primeira dimensão ou eletroisofoco (IEF) usando o sistema Ethan IPGphor 3 (GE Healthcare). As proteínas

foram separadas a 20°C usando 50 μ A/fita até acumular 19,819 Vh. Em seguida, as fitas foram incubadas em tampão de equilíbrio: 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M ureia, 29.3% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS) contendo 1% (w/v) dithiothreitol (DTT) por 20 min sob agitação (50 rpm). A solução foi descartada e foi incubada com tampão de equilíbrio contendo 2.5% de iodoacetamida sob agitação por mais 20 min. As fitas foram transferidas para electroforese 2D-PAGE 10% (w/v) de acrilamida 30% (w/v) e bisacrilamida 0.8% (w/v). Colocou-se um papel de filtro, ao qual foi aplicado 5 μ L de padrão de massa molar contendo as proteínas β -fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,10 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). A segunda dimensão foi realizada a 45 mA/gel (120 V) até o final do gel, a 4°C. O gel foi corado com Azul Brilhante de Coomassie R-250, *overnight*, lavado várias vezes para descoloração e estocado em uma solução de ácido acético 5% (v/v).

4.10 Resposta à infecção

Para avaliar a resposta à infecção foram utilizados três grupos de camundongos Balb/c: Grupo (I) não infectado (PBS), e Grupo (II), (III) e (IV) infectados com fungo (1×10^6 CFU/mL) tratados com tolueno 0,01 e 0,10% (v/v) e sem tolueno, pela via intraperitoneal. Para contagem de UFC, o baço e o fígado dos camundongos infectados e controles foram extraídos no dia 7 após infecção. Ambos os órgãos foram removidos assepticamente e passados através de uma malha de nylon, com poros de 100 μ m para a fragmentação dos mesmos, auxiliados de pinça anatômica, em placa de Petri estéril contendo 2 mL de PBS. Em seguida, uma diluição (1/1000) da suspensão celular desses órgãos foram plaqueadas individualmente em placas Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA). As UFC foram contadas após 3 dias de incubação à temperatura ambiente (Ferreira *et al.* 2015).

4.10.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais foram inoculados com 3,0 mL de tioglicolato de sódio (DIFCO Lab. LTDA) a 3,0% três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂ e os macrófagos peritoneais foram extraídos como descrito no item 4.8, com a diferença que os macrófagos aqui obtidos foram com uma solução de PSC de *S. schenckii* (40 μ g/mL). As placas foram

incubadas a 37°C por 24 horas em estufa com tensão constante de 5% de CO₂. Em seguida, os sobrenadantes obtidos foram centrifugados a 4°C durante 10 minutos a 14000x g, aliquotados e estocados a -80°C até o momento da dosagem das citocinas.

4.10.2 Produção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) será quantificado por espectrofotometria através do acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células do exsudato peritoneal após aderência pela reação de diazotização com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida (Merck), 0,10% de dicloro N(1-naftil-1-etilenodiamina) (Merck), 2,5% ácido orto-fosfórico (Mallinckrodt Chemical), e água deionizada q.s.p 100 mL) (Green *et al.*, 1982). As células do exsudato peritoneal (5×10^6 células/mL) de animais infectados e o controle foram cultivadas em RPMI-C por 24 horas na presença do fungo crescido em tolueno, fungo sem exposição - controle positivo) ou somente meio de cultura RPMI-C, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação, alíquotas de 50 µL do sobrenadante da cultura destas células foram transferidas para outra placa de cultura de células estéril de 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.), e acrescentou-se 50 µL da solução de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm. As concentrações de óxido nítrico liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecidas, com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio. Os valores foram expressos em µmols de nitrito/ 5×10^5 células.

4.10.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da produção de citocinas

As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10 foram quantificadas nos sobrenadantes da cultura de células do exsudato peritoneal após aderência, e as citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-2 nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos totais, após 24h de cultivo em presença de células fúngicas de *S. schenckii* mortas por calor. Para quantificar a produção de cada citocina, foram utilizados testes imunoenzimáticos ELISA sanduíche (eBioscience®, OptEIA™), de acordo com as instruções do fabricante. As placas de 96 poços (Corning Inc.) foram adsorvidas com 100 µl/cavidade de anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de

rato, anti-citocina de camundongo na concentração adequada para cada citocina, diluído em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) ou carbonato de sódio (pH 9,6), conforme indicado pelo fabricante, e incubadas overnight à 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (tampão de lavagem) e bloqueadas com 200 µL/cavidade com diluente de ensaio (tampão PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado, Sigma-Aldrich, pH 7,2 a 7,4) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 100 µL/cavidade do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas celulares a serem testados. As placas foram então incubadas à temperatura ambiente por 120 min e então foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL por cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina e diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de ensaio. As placas foram incubadas por mais 60 min à temperatura ambiente e posteriormente lavadas mais 5 vezes com tampão de lavagem, sendo então adicionados 100 µL/cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina e incubadas novamente à temperatura ambiente por 60 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 100 µL por cavidade do substrato [10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (Sigma) e 1,2 mM de H₂O₂ (MallinckrodtChemical)] e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de 2N H₂SO₄ por cavidade. Nestas reações há formação de cromóforos, que tiveram sua absorbância lida em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (MultiskanAscent, Labsystems) em 450 nm. As concentrações de cada citocina foram quantificadas com base em uma curva padrão previamente estabelecida e os resultados foram expressos em pg/mL.

4.11 Resposta à infecção pela via subcutânea

Foi utilizado o modelo pela via subcutânea que mimetiza a esporotricose subcutânea. O modelo de infecção subcutânea foi usado segundo Castro e colaboradores (2011) com algumas modificações. Grupos de 5 camundongos BALB/c machos de 2 meses de idade e pesando aproximadamente 30 g, foram mantidos em condições de temperatura controlada, com acesso a água e ração *ad libitum*. Cada camundongo foi inoculado subcutaneamente na região sacral dorsal com 10⁷ conídios de *S. schenckii* suspensos em PBS estéril. O grupo controle não infectado foi injetado com PBS estéril. Para confirmar a contagem de células de

cada inóculo, as células foram coradas com Trypan azul para a contagem de células viáveis. Camundongos infectados e não infectados foram monitorados diariamente por 21 dias para avaliar a progressão da doença e eutanasiados pós-infecção. A lesão cutânea, o fígado e o baço foram removidos para avaliar a carga fúngica e realizar análise histopatológica, conforme detalhado a seguir.

4.11.1 Histopatologia

Os camundongos Balb/c machos de 5 a 6 semanas de idade foram infectados com 10^7 conídios/mL via subcutânea e eutanasiados aos 21 dias após infecção. O fígado e o baço foram removidos assepticamente e fixados em uma solução de 10% formaldeído em tampão fosfato (0,01 M, pH 7.5) por 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os órgãos foram colocados em 70% etanol e embebidos em parafina, cortados em secções e corados com ácido periódico de Schiff (PAS). As observações foram realizadas ao microscópio.

4.11.2 Obtenção do soro

O soro foi obtido após centrifugação do sangue total e estocado até a realização das análises de citoquinas do padrão Th1/Th2/Th17 pela técnica de Cythometric Bead Array (CBA).

4.11.3 Citocinas Th1/Th2/Th17

A determinação das citocinas do padrão Th1/Th2/Th17 foi feita por citometria de fluxo pela técnica "Cythometric Bead Array" (CBA) segundo as indicações do fabricante. O kit de citocina BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 (Catálogo nº 560485), usa a tecnologia de microesferas com distintas intensidades de fluorescência revestidas com anticorpos de captura específicos para IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-10 para detectar essas citocinas simultaneamente nas amostras, no soro de camundongos infetados ou não. O panel de microesferas foi misturado com as amostras e após incubação foram misturadas com anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE). A intensidade da fluorescência da PE de cada complexo sanduíche revela a concentração da citocina. A separação de cada citocina é

detectada no canal vermelho segundo a intensidade de fluorescência da microesfera. O valor da intensidade é específico para cada citocina. A aquisição das amostras foi analisada em um citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences).

4.11.4 Análise das populações Th1/Th17/Tregs

Os baços foram removidos assepticamente e os esplenócitos foram extraídos previamente descritos (Ferreira *et al.*, 2015). Os esplenócitos viáveis foram ajustados para 1×10^7 células/mL em RPMI-1640 completo. Foram utilizados os seguintes anticorpos mAb anti-camundongos: anti-CD16/CD32, anti-CD3-FITC, anti-CD4-APC, anti-IL-17-PE; anti-IFN γ ; anti-CD25-PE; anti Foxp3-PE-Cy7 e respectivos controles de isotipos. Os esplenócitos foram avaliados quanto à frequência de Th1 (IFN γ +), Th17 (IL-17+), Th1/Th17 (IFN+/Th17+) ou Tregs (CD25+Foxp3+). Resumidamente, as células foram coradas para os marcadores extracelulares, depois fixadas e permeabilizadas utilizando o conjunto de tampão de fixação e permeabilização intracelular de eBiosciences e depois coradas para os fatores de transcrição Foxp3. IFN γ e IL-17 intracelular foram detectados após estimulação *in vitro* com coquetel de estimulação celular contendo forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina para induzir a produção de citocinas e Brefeldina A/Monensina para retenção intracelular da expressão de citocinas induzidas (eBioscience). Os eventos foram adquiridos utilizando um citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e analisados no software do fabricante.

4.12 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPrism 5.0. A análise de variância (ANOVA) foi realizada e a prova de Tukey para comparar as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Foram considerados significantes os valores com $p < 0,05$. Em alguns casos foi usado o test t de student.

5 RESULTADOS

5.1 Sobrevivência de *S. schenckii* a diferentes concentrações de tolueno após 24 h de exposição

A sobrevivência de *S. schenckii* ao tolueno foi avaliada em diferentes concentrações do solvente. O fungo foi capaz de sobreviver a 0,01 e 0,10% (v/v) de tolueno (Figura 5A) após 24 horas de exposição, nas condições experimentais usadas. Neste período a população de fungo foi reduzida em ambas as concentrações. A 0,01% apresentou-se um efeito importante na sobrevivência, sendo que esta foi de 17,5% em média. A redução mais drástica da população foi obtida a 0,10% na qual o fungo sobreviveu somente um 5,4%. Nas concentrações 1,0 e 10,0 % (v/v) o crescimento foi inibido totalmente.

A 0,01% de tolueno a concentração celular (UFC) decresceu em média 0,38 unidades logarítmicas, enquanto na concentração 0,10% a redução foi maior de 1,394 unidades quando comparadas com o fungo crescido sem tolueno (Figura 5B).

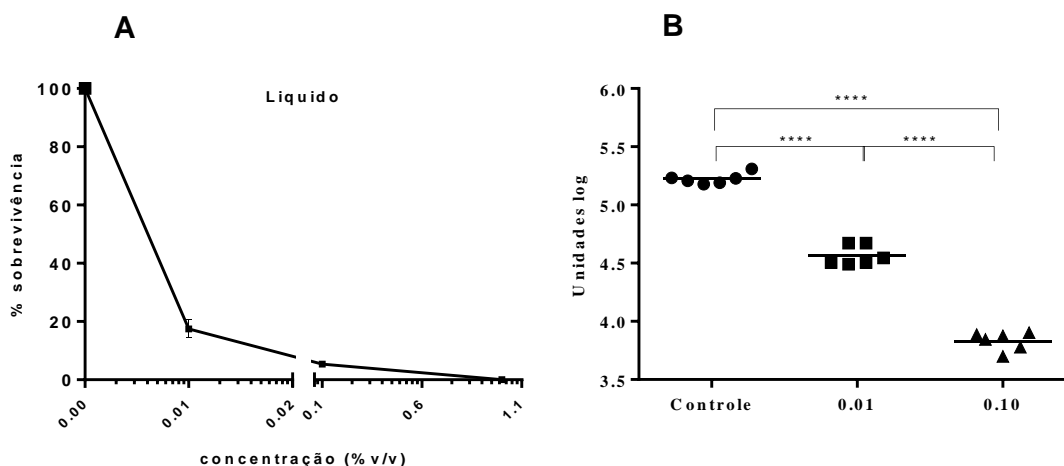


Figura 5. Sobrevivência de *S. schenckii* crescido na ausência ou presença de tolueno após 24 horas de exposição. A) Porcentagem de sobrevivência em relação ao controle (não tratado). B) Unidades Formadoras de Colônias UFC/mL expressa em unidades logarítmicas. Os resultados são apresentados como a média $UFC \pm$ desvio padrão de duplicatas de três experimentos independentes. ***($p < 0,001$), ****($p < 0,0001$)

5.2 Determinações analíticas

5.2.1 Identificação e quantificação de tolueno por cromatografia gasosa

O tolueno foi identificado aos 5,14 min (tempo de retenção). Em anexo mostram-se os cromatogramas obtidos a diferentes concentrações. Quantitativamente a concentração das amostras foi determinada a partir da curva padrão com os valores das áreas dos picos de cada concentração. As médias das áreas obtidas para a curva mostram-se no Quadro 3. Estes valores encontram-se dentro dos critérios de aceitação para curvas de calibração em amostras biológicas estabelecidas por ANVISA em sua resolução 899/2003. A ANVISA estabeleceu como critérios de aceitação da curva de calibração o por cento de desvio padrão (%DP) menor ou igual a 20% e o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98. No estudo a curva de calibração possui um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9987 e os %DP são menores de 20%, indicando a repetitividade do método utilizado para a determinação da concentração do tolueno, sendo que o método é de confiança no intervalo trabalhado. O limite de quantificação obtido foi de 24,7 $\mu\text{g/ml}$ (0,025 $\mu\text{g/l}$) para o sistema utilizado.

Quadro 3. Áreas obtidas para concentrações de tolueno da curva padrão.

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área média \pm %DP (n=2)
Branco	0	0
P1	5,39	55160,50 \pm 4,12
	5,39	
P2	10,78	108716,00 \pm 0,57
	10,78	
P3	21,56	182442,50 \pm 0,42
	21,56	
P4	43,12	309307,00 \pm 3,90
	43,12	
P5	86,23	667999,50 \pm 0,11
	86,23	
P6	172,4	1289094,00 \pm 1,92
	172,4	

5.3 Cinética de crescimento em tolueno

Após comprovar a sobrevivência de *S. schenckii* em tolueno em 24 horas de exposição foi testada a capacidade de se multiplicar e consumir o tolueno depois desse

intervalo. Ambas as culturas partiram de uma concentração de células viáveis de $1,5 \times 10^6$. A população (UFC) a 0,01% de tolueno reduziu-se drasticamente entre 1,5 e 2 unidades *log*, ou seja, até $6,13 \times 10^4$ UFC/mL aproximadamente. Depois da fase de latência o fungo aumentou o número de UFC/mL, sendo que aos 5 dias de incubação atingiu uma concentração de $1,47 \times 10^7$ UFC/mL em média. Ocorreram 7,91 gerações no período de crescimento exponencial enquanto no controle ocorreram 10,33 gerações. O tempo de duplicação (*g*) da cultura neste estudo foi de 12,1 horas para o tratamento e de 11,6 para o não exposto. A cultura sem tolueno cresceu até $1,89 \times 10^9$ UFC/mL.

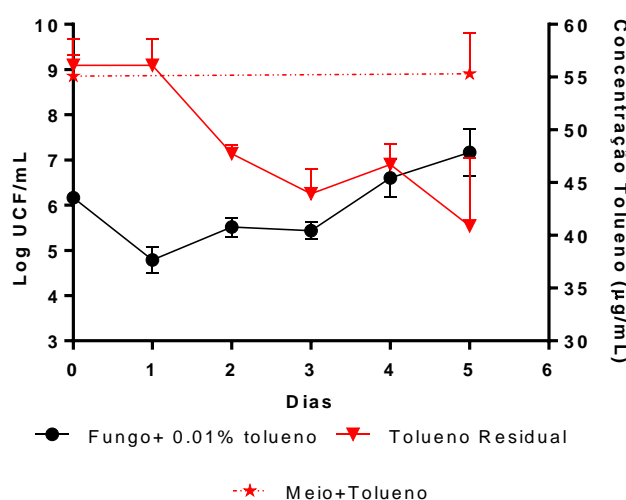


Figura 6. Crescimento de *S. schenckii* na presença de 0,01% (v/v) de tolueno em SDB e 30°C. Inóculos de $1,5 \times 10^6$ células viáveis aproximadamente foram introduzidos em frascos erlenmeyer com tampas *Mininnert* providas de selos de teflon. O crescimento foi avaliado pela contagem de UFC e foram plotados como a média \pm desvio standard de duplicatas de cinco experimentos independentes. Os valores de concentração de tolueno mostram-se como a média \pm desvio standard de dois experimentos independentes (linha vermelha contínua). Foram utilizados frascos com a mesma concentração de tolueno sem o fungo para diferenciar as perdas de solvente (frascos estéreis, linha vermelha descontinua).

Entretanto, nas primeiras 24 horas o tolueno manteve-se sem variação na concentração. Após esse intervalo o solvente diminui em correspondência com o início da fase exponencial de crescimento do fungo (Figura 6). Aproximadamente, um 26% do tolueno subministrado ao sistema de estudo foi consumido às 72 horas de iniciada a incubação. A taxa de diminuição do tolueno ocorreu paralelamente com o incremento da concentração celular (UFC).

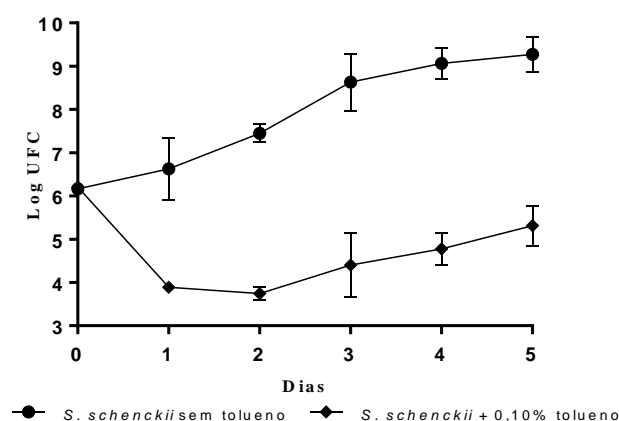


Figura 7. Crescimento de *S. schenckii* na presença de 0,10 % (v/v) de tolueno e sem tolueno. Inóculos de $1,5 \times 10^6$ células viáveis foram incubados em SDB e 30°C, em frascos erlenmeyer com tampas *Mininnert* providas de selos de teflon. O crescimento foi avaliado pela contagem de UFC e foram plotados como a média \pm desvio standard de duplicatas de três experimentos independentes.

A concentração de tolueno no início da cinética mostra-se no Quadro 4.

Quadro 4. Concentração inicial de tolueno nas duas fases do sistema determinadas por Cromatografia a gás.

%(v/v)	Concentração estimada no sistema $\mu\text{g/mL}$	Concentração analítica (Fase líquida) $\mu\text{g/mL}$	Concentração (Fase gasosa) $\mu\text{g/mL}$	Concentração analítica no sistema ($\mu\text{g/mL}$)
0,01	86.23	55.86	28.74	84.60

Já na concentração 0,10% observou-se também uma redução drástica da população no primeiro dia de incubação, porém mais pronunciada como dito no item 4.1. A mesma foi desde 6,21 até 3,89 unidades *log*, completando-se a fase de latência de 48 horas seguida de um crescimento gradual da concentração celular (Figura 7).

5.4 Viabilidade do fungo durante a exposição

Os fungos expostos ao tolueno mantiveram a viabilidade das populações que sobreviveram. A Figura 8 (A, C e E) mostra em cor azul a integralidade da membrana da parede celular. Apesar do efeito tóxico do solvente manteve-se a capacidade reprodutiva das populações (Figura 8 B, D e F).

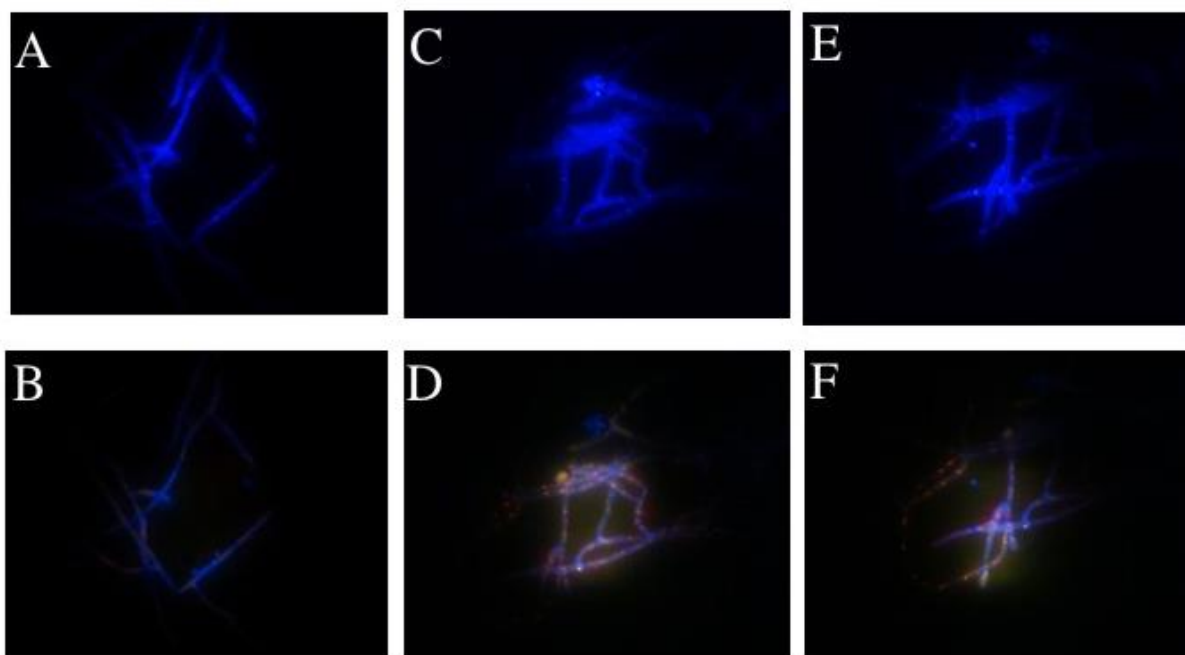


Figura 8. Viabilidade celular aos 5 dias de incubação avaliada com os marcadores fluorescentes Calcofluor White M2R (superior) e FUN-1 (inferior): (A, B) Controle, (C, D) 0,01%(v/v) tolueno, (E, F) 0,10%(v/v). A fluorescência azul indica uma membrana íntegra; e o laranja-vermelho significa atividade metabólica. Note-se a presença de estruturas intravacuolares de cor laranja-vermelho que evidenciam atividade metabólica.

5.5 Mudanças morfológicas do fungo após exposição ao tolueno

5.5.1 Morfometria das colônias

A morfologia das colônias foi avaliada em duas condições. Na condição (a) os fungos crescidos a 0,01 e 0,10% (v/v) de tolueno e depois incubados em atmosfera livre de tolueno não mostraram diferença significativa dos diâmetros aos 19 dias de incubação. Somente houve diferenças entre aqueles crescidos a 0,10% quando comparado com o controle, porém não houve mudanças relevantes no aspecto externo das colônias (Figura 9a).

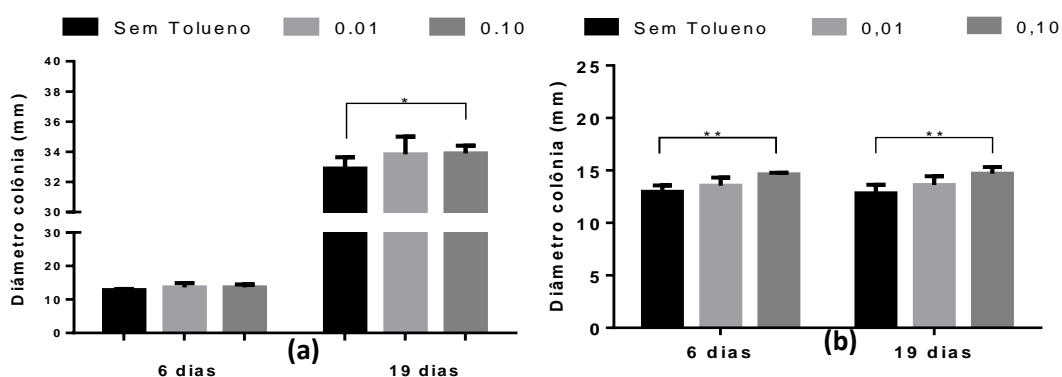


Figura 9. Macromorfometria de *S. schenckii*. (a) células fúngicas de cada tratamento foram semeadas em placas de Petri e incubadas em atmosfera livre de tolueno. (b) incubadas em atmosfera de tolueno. Os resultados mostram a média de medições do diâmetro (mm)±desvio padrão de duplicatas de três experimentos independentes.

Na condição (b), quando mantidas em atmosfera de solvente, o diâmetro das colônias reduziu-se aos seis e 19 dias de incubação (Figura 9b) e a presença de tolueno induziu mudanças morfológicas (Figura 10). Macroscopicamente, as colônias foram de menor diâmetro do que aquelas que cresceram fora da atmosfera de solvente. Apresentaram forma circular, bem elevadas em forma de pontas (micélio), textura áspera e aparência brilhante e translúcida. As bordas são uniformes. No verso, a cor é amarelo creme. Também observou-se uma leve pigmentação preta no micélio.

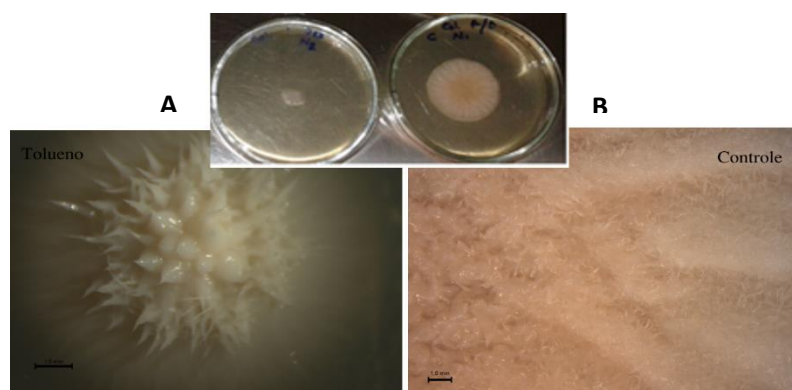


Figura 10. Morfologia das colônias em atmosfera de tolueno aos 19 dias de incubação (A) com tolueno (B) controle sem tolueno. Note-se o menor diâmetro das colônias e o micélio em forma de pontas bem elevadas e de aparência brilhante e translúcida. Barra de escala: 1 mm

5.5.2 Micromorfologia do fungo crescido em tolueno. O incremento de corpos eletrodensos ou melanosomas.

A microscopia eletrônica de varredura revelou conídios assimétricos, de forma oval e com perisporium utriculado (que envolve todo o conídio) (Figura 11). As imagens das leveduras revelam um polimorfismo, que se apresenta desde a forma oval e alongada com forma de charuto, tal como tem sido descrito por outros autores (Castro et al, 2013).

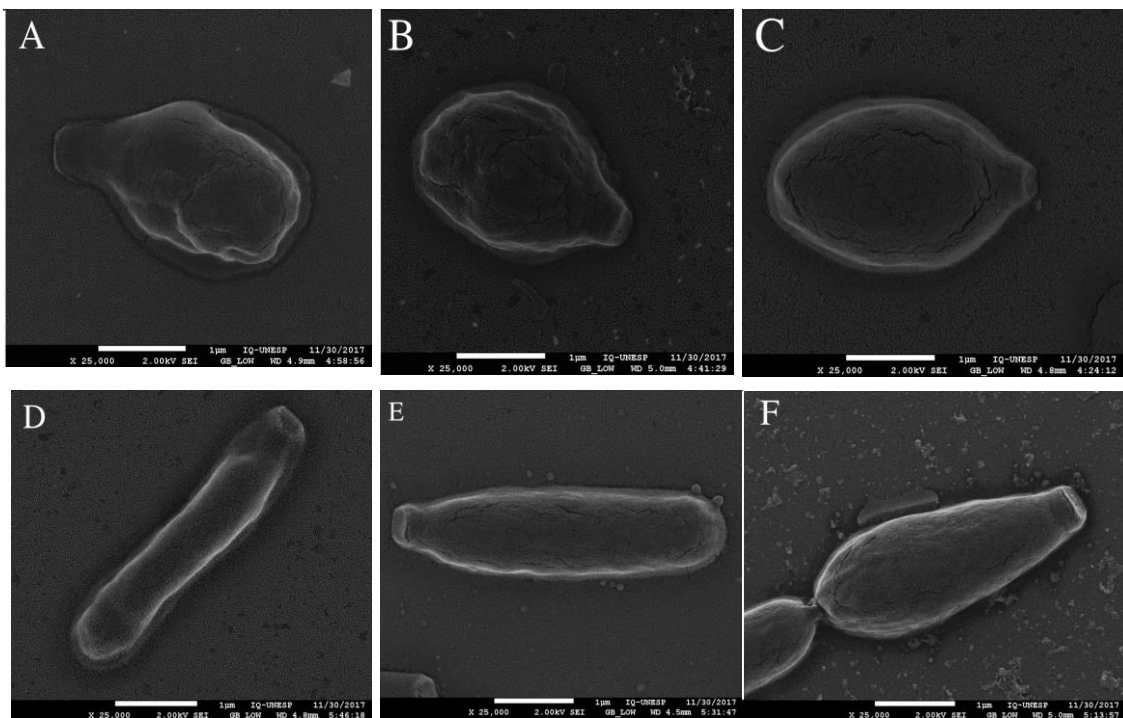


Figura 11. Morfologia de conídios e leveduras de *S. schenckii* 16345 em fase exponencial do crescimento crescidas a diferentes concentrações de tolueno. Microscopia eletrônica de conídios. (A) sem tolueno, (B) 0,01% e (C) 0,10%. Leveduras crescidas (D) sem tolueno, (E) 0,01 e (F) 0,10% de tolueno. Magnificação 25000x (barra 1µm).

A análise morfométrica foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando o programa de análise ImageJ, conforme detalhado na metodologia. Os conídios dos tratamentos com tolueno não diferem em tamanho (Figura 12). Embora a superfície dos tratados com tolueno foi relativamente maior, esta não foi estatisticamente significativa (Quadro 5).

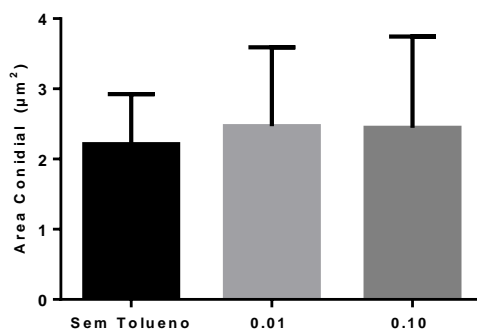


Figura 12. Superfície conidial de *S. schenckii* tratados com tolueno determinada por microscopia eletrônica de transmissão. Setenta e uma células da fase exponencial de cada tratamento foram analisadas.

Quadro 5. Morfometria de conídios de *S. schenckii* 16345 realizada com microscopia eletrônica de transmissão.

	Sem tolueno	Tolueno 0,01% ^b	Tolueno 0,10% ^b
Área ± DP (µm ²) ^a	2.210 ± 0.085	2.470 ± 0.133	2.445 ± 0.154

a. Análises TEM realizada com 71 conídios por grupo.

b. $p > 0.05$ comparado com o grupo sem tolueno.

A parede celular fúngica confere proteção contra estressores ambientais. As observações realizadas em conídios expostos a tolueno mostraram uma redução na espessura da parede celular (Figura 13 A, B e C). O fungo controle possui em média uma parede celular de 0,199 µm, e em 0,10%, a espessura diminuiu até 0,183 µm (Figura 13 D). Na concentração 0,01% houve um leve incremento (0,203 µm), porém, não foi estaticamente significativo quando comparado com o controle.

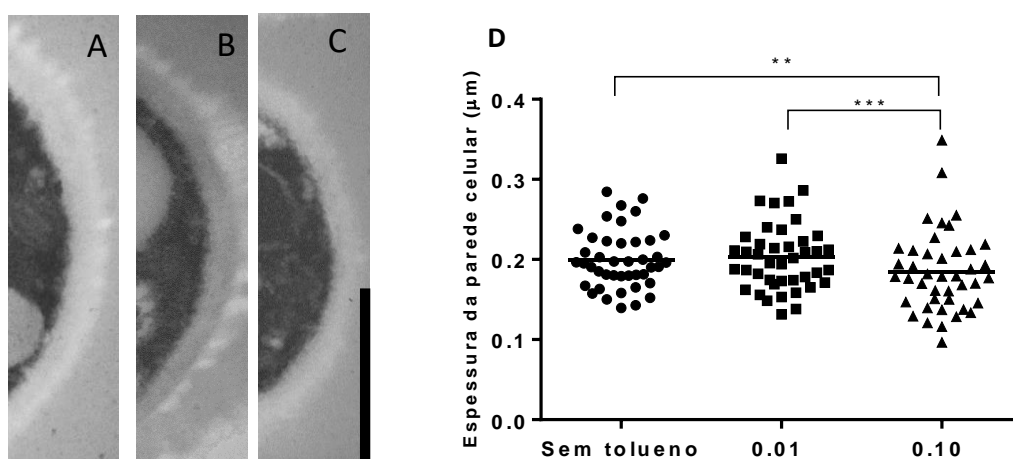


Figura 13. Mudanças na espessura da parede celular de *S. schenckii* em fase exponencial de crescimento influenciada pela exposição ao tolueno em diferentes concentrações. A) sem tolueno, B) 0,01%, C) 0,10%. A espessura da parede celular foi analisada com o programa ImageJ. Os resultados apresentam-se como a média de espessura ± desvio padrão de 42 células de cada grupo. Barra de escala: 1µm.

A ultraestrutura dos conídios foi analisada por MET. Os fungos crescidos em atmosfera de tolueno apresentaram corpos electrodensos de coloração preta semelhantes a melanossomas, os quais podem estar correlacionados com os processos de melanização (Figura 14). As células fúngicas crescidas sem tolueno também mostraram essas organelas, porém, são mais numerosas quando crescidas na presença do solvente. Também foram observadas células que apresentaram estruturas com baixa densidade eletrônica na sua periferia e alta densidade no centro da estrutura, o que parecem ser melanossomas em estágios iniciais de formação.

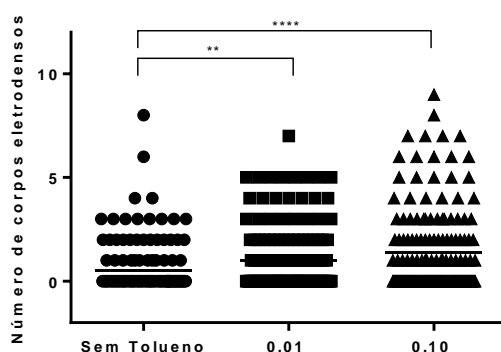
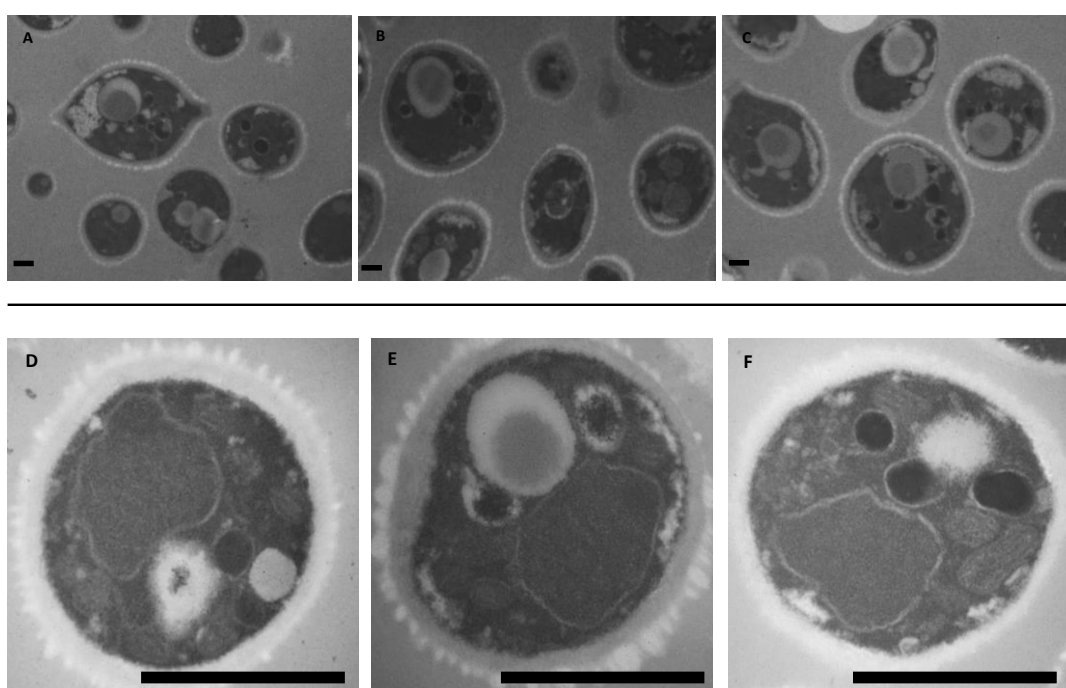


Figura 14. Acúmulo de material eletrodense em vesículas citoplasmáticas semelhantes a melanossomas em conídios de *S. schenckii* expostos ao tolueno. Secções ultrafinas de células fúngicas foram preparadas para MET e mostram estruturas com diferentes eletrodensidade. O número de corpos eletrodensos representam a média \pm desvio padrão de 161 conídios por grupo (Magnificação 5000x, 40.000X, barra = 1 μ m) ****p valor<0,0001.

Com se mostra na Figura 14 e no Quadro 6, a média de corpos intracelulares eletrodensos por célula do grupo sem tolueno foi de 0,52, enquanto que foram obtidos valores de 0,99 e 1,39 para as concentrações 0,01 e 1,10%, respectivamente. Ou seja, a porcentagem de conídios que apresentaram corpos eletrodensos foi 1,8 vezes maior no exposto à maior concentração de tolueno quando comparado com o controle, enquanto nessa concentração foram encontradas 1,3 vezes mais corpos electrodensos por conídio em média.

Quadro 6. Índice de corpos eletrodensos observados em *S schenckii*

	Sem tolueno	0,01%	0,10%
% conídios com corpos eletrodensos	22,98	39,13	40,99
Média de corpos eletrodensos presentes por conídio	2,27	2,62	3,03

Os valores representam a média para 161 conídios analisados. P<0.05

5.5.3 Conversão à fase de levedura

A reversão a levedura foi constatada quando o fungo foi cultivado em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C tal e como se mostra na Figura 11.

5.5.4 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para explorar o sistema antioxidante nas condições de estresse realizou-se o teste de atividade das enzimas do sistema antioxidante SOD e CAT. A exposição do fungo ao tolueno induziu a produção de quantidades elevadas de SOD (Figura 14). No gel, a SOD foi claramente identificada como bandas acromáticas como resultado da inibição do NBT pela SOD. A inibição do NBT é uma medida da quantidade de SOD presente na amostra, e, portanto, da capacidade de detoxificação do fungo na presença de tolueno. Na amostra controle (sem tolueno) houve baixa expressão de SOD, pelo menos nas quantidades testadas.

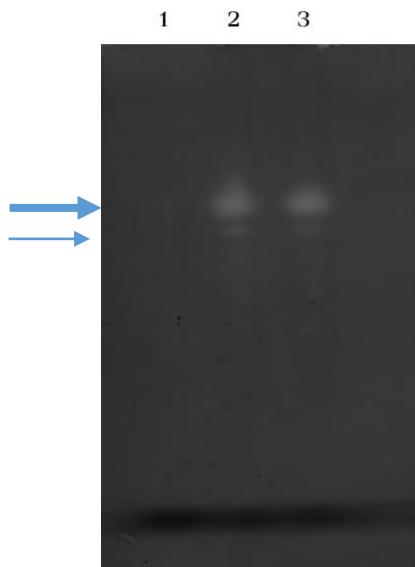


Figura 15. Mudanças da Atividade de Superóxido Dismutase. (1): Sem Tolueno; (2): Tolueno 0,01%; (3): Tolueno 0,10%. Foram colocados 23 µg de proteínas em cada poço.

5.5.5 Atividade da catalase

A catalase converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Espécies potencialmente perigosas, tais como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são convertidos em água. No teste qualitativo de atividade de catalase em colônias observou-se que as colônias procedentes de culturas crescidas em tolueno a 0,01% produziram volumes moderados do oxigênio (formação de bolhas) imediatamente, as crescidas em 0,10% tiveram uma reação mais vigorosa e imediata, demonstrada pelo volume de bolhas formadas (Figura 16). Enquanto que aquelas crescidas sem tolueno produziram menor quantidade do gás.

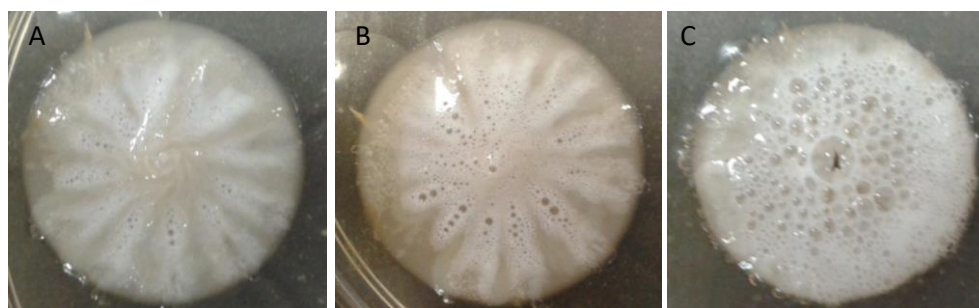


Figura 16. Atividade de catalase observada pela força da reação e a evolução da formação de bolhas (oxigênio). A) Sem Tolueno, B) 0,01%, C) 0,10%. Os testes foram realizados em triplicata.

5.6 Resistência de *S. schenckii* ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio

A resistência ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) depende da efetividade do sistema antioxidante. Os fungos crescidos a 0,01 e 0,10 % de tolueno mostraram uma marcada resistência ao H_2O_2 . Aqueles que cresceram em 0,10% mostraram um crescimento mais robusto quando comparado com o fungo não exposto ao tolueno (controle), crescendo ao dobro da concentração de H_2O_2 (Figura 17), sendo que o controle resistiu 31,25 mM de H_2O_2 , enquanto o fungo crescido em 0,01% e 0,10% resistiram até 31,25 e 62,5 mM H_2O_2 , respectivamente.

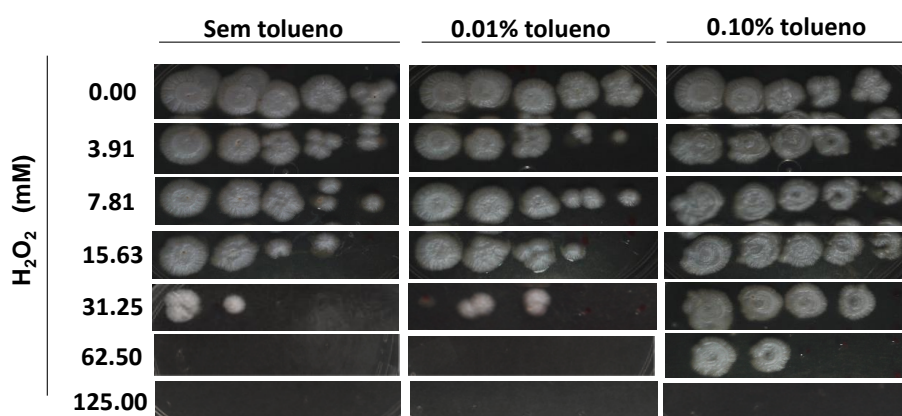


Figura 17. *S. schenckii* crescido em tolueno torna-se mais resistente ao estresse por peróxido de hidrogênio. Mecanismos enzimáticos para a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio desenvolvidos pelo fungo crescido em tolueno permitiram que sobrevivesse até concentrações de oxidante de 62,50 mM.

Em todas as concentrações testadas a massa miceliar do fungo exposto ao tolueno foi mais densa, enquanto para o controle o crescimento foi mais esparso.

5.7 Espécies Reativas de Oxigênio intracelular

A concentração intracelular de ERO depende da remoção dos mesmos pelo sistema antioxidante. O acúmulo intracelular destas espécies reativas foi medido com o corante DHR-123, o qual é oxidado a rodamina pelas ERO, e então detectadas em citômetro de fluxo. Como mostrado na Figura 18 (A, B e C) as células tratadas com 3mM de peróxido de hidrogênio após crescimento em tolueno mostraram níveis menores de ERO intracelulares

quando comparados com o fungo não exposto, o qual foi corroborado pela menor intensidade de fluorescência de rodamina (Figura 18 D).

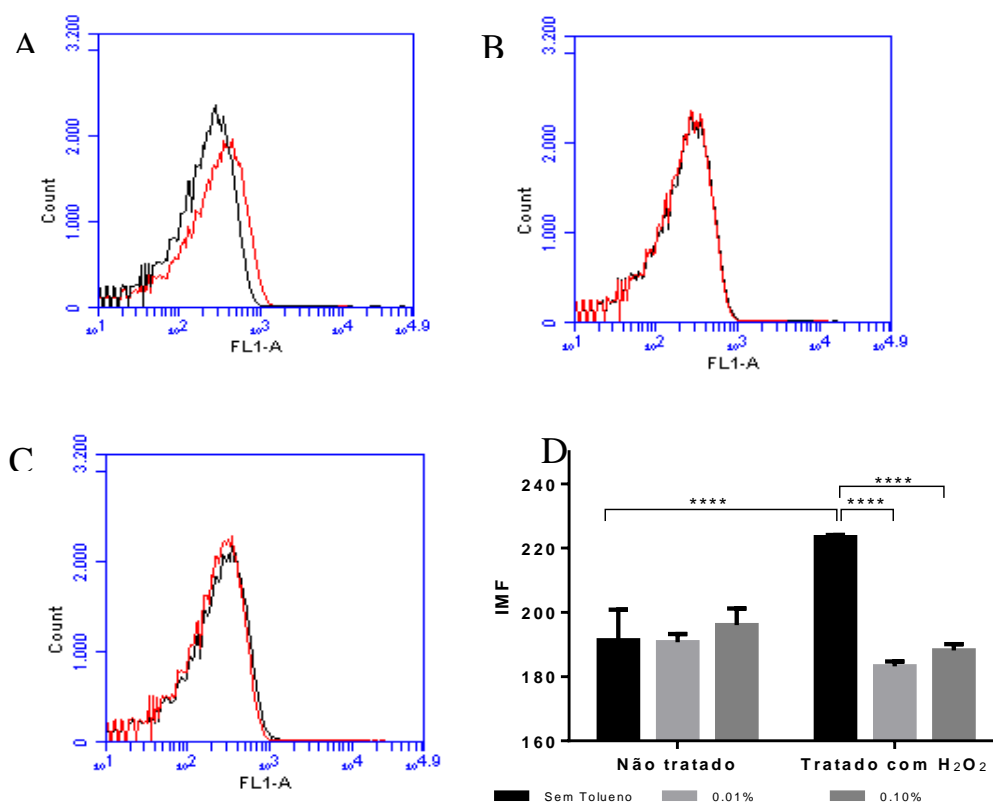


Figura 18. Acúmulo de ERO em células de *S. schenckii* coradas com DHR-123 e detectadas por citometria de fluxo. Conídios crescidos sem e com tolueno foram tratados com H₂O₂ (linha vermelha) e usaram-se como controle culturas sem tratar com H₂O₂ (linha preta). A) crescidos sem tolueno, B e C) crescidos a 0,01% e 0,10% tolueno. D) Intensidade média de fluorescência (IMF) após o tratamento com H₂O₂ por 30 min a 30°C.

A menor quantidade de ERO detectadas na maior concentração de tolueno pode estar relacionada com a alta atividade antioxidante desenvolvida pelo fungo na sua adaptação ao solvente.

5.8 Proteínas da parede celular do fungo cultivado em tolueno

O fungo crescido em tolueno tem diferenças na composição antigênica da parede celular quando comparado com o fungo crescido em condições normais (controle) (Figura 19). As proteínas da parede celular extraídas com SDS/DTT expressas tanto no controle como no fungo exposto se relacionam a seguir: 10, 16, 19, 27, 31, 44 e 52 kDa. As

proteínas de 15, 16, 18, 35, 45, 46 foram expressas somente no grupo tratado com tolueno. Já as proteínas entre 10-14, 20-26, 70 kDa não foram expressas pelo fungo tratado.

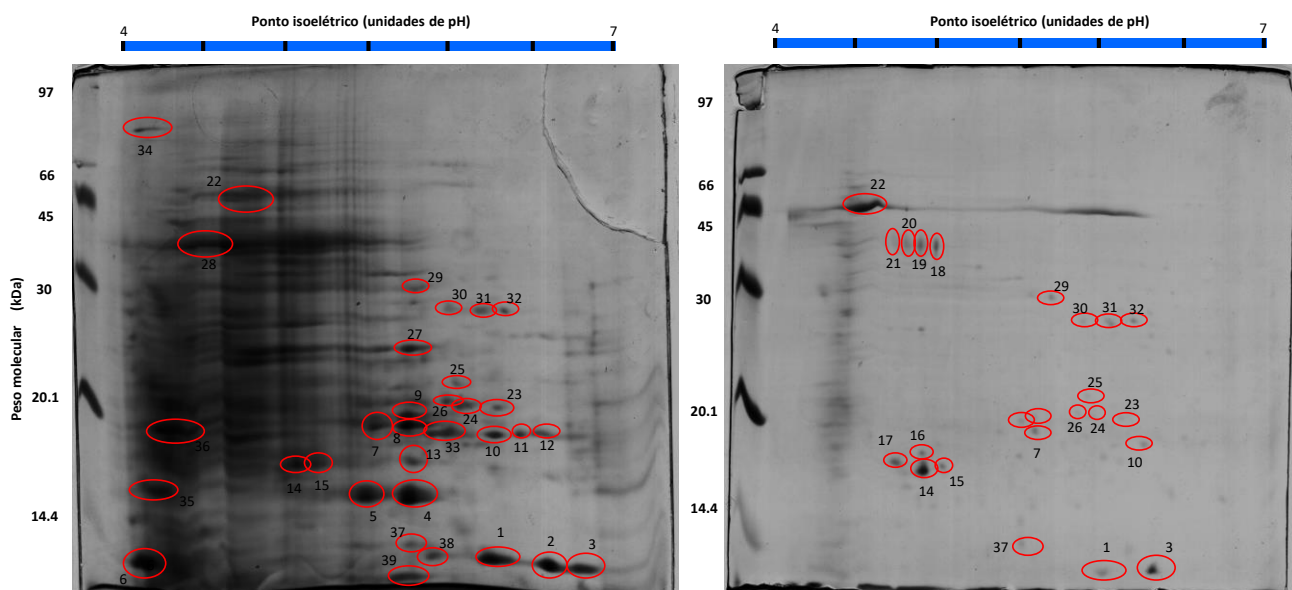


Figura 19. Mudanças no perfil de proteínas da parede celular de *S. schenckii* extraídas com SDS/DTT e coradas com azul de Coomassie. (A) Sem tolueno, (B) 0,10% tolueno.

5.9 Resposta à infecção

O desenvolvimento da infecção sistêmica em camundongos tratados com fungo exposto ao tolueno foi monitorado por contagem das UFC em baço e fígado, aos 7 dias após infecção. O número de UFC em baços foi significativamente superior no grupo de animais tratados com tolueno do que o grupo tratado com fungo não exposto ao xenobiótico (Figura 20). Conforme aumentou a concentração também houve aumento das UFC. O incremento das UFC constitui uma evidência de que a virulência do fungo aumentou.

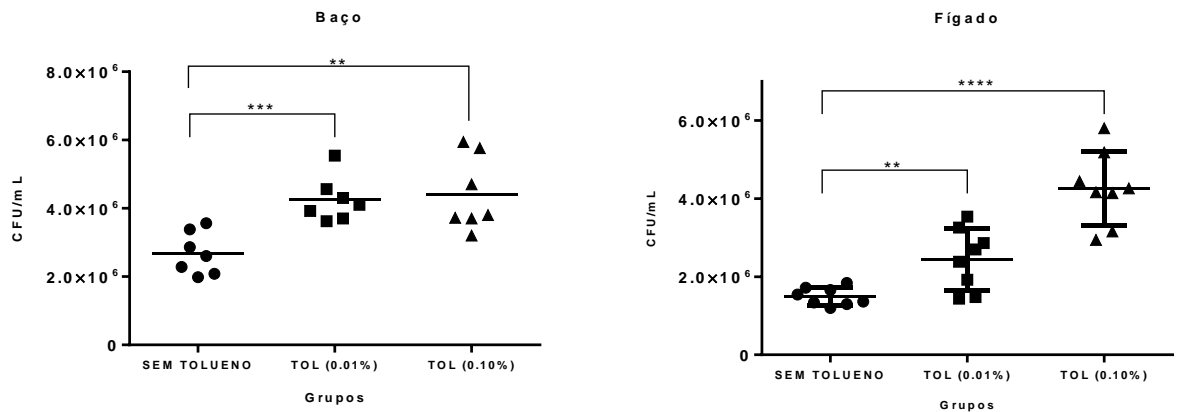


Figura 20. Carga fúngica em camundongos Balb/c infectados com *S. schenckii* tratados com tolueno (UFC)/g em baço e fígado. Grupos de animais foram inoculados via intraperitoneal com 1×10^7 conídios/mL, e a infecção foi avaliada aos 21 dias. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (**(p <0,01); ***(p <0,001); ****(p <0,0001).

5.9.1 Produção de Óxido Nítrico (NO)

O fungo tratado com tolueno tanto na concentração 0,01% quanto na concentração 0,10% induziram uma alta produção de óxido nítrico estatisticamente significativa em camundongos Balb/c (Figura 21). A alta produção de NO por macrófagos evidencia uma reação potente induzida pela presença de um agente mais virulento, no caso o fungo exposto ao tolueno.

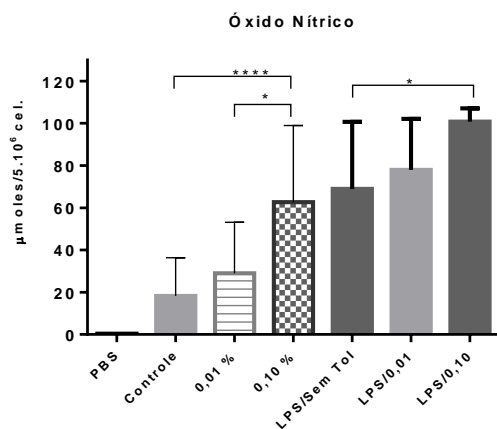


Figura 21. Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados por *S. schenckii* expostos a diferentes concentrações de tolueno. Os macrófagos foram estimulados in vitro com conídios terminativos ou LPS. A concentração de NO foi detectada pelo método de Greiss. ***(p <0,001); ****(p <0,0001).

5.9.2 Padrão de citocinas pró e anti-inflamatórias durante a infecção

A liberação das citocinas TNF- α e IL-10 quantificadas no sobrenadante da cultura de macrófagos foi significativamente maior em presença de cada tratamento com tolueno (Figura 22). A maior concentração testada do solvente (0,10%) induziu maior liberação dessas citocinas quando comparado com o grupo infectado com fungo não crescido em tolueno. Houve balanço das subpopulações de macrófagos M2 e M1, evidenciado pela produção significativa de IL-10 e os altos níveis de TNF- α , indicando um padrão importante de subpopulação de macrófagos M1 durante esta etapa da infecção. Observaram-se baixos níveis de IL-12, o que descreve uma resposta favorável para um perfil Th1.

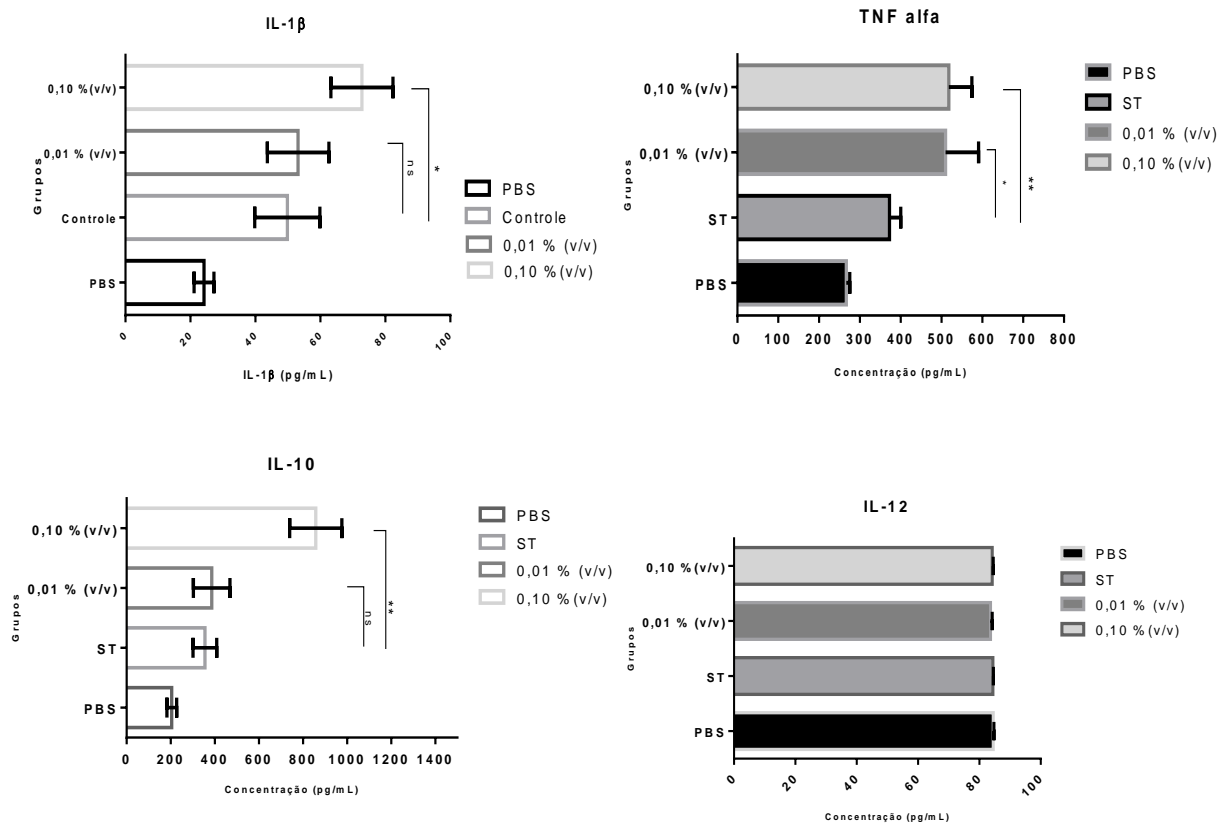


Figura 22. Perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados por *S. schenckii*, crescidos a diferentes concentrações de tolueno em comparação com camundongos infectados com fungos não expostos a tolueno (ST) ou não infectados (PBS). Os macrófagos foram estimulados in vitro com conídios termoinativados e as citocinas foram quantificadas no sobrenadante por ELISA *($p < 0,05$); **($p < 0,01$).

5.9.3 Padrão de citocinas Th1/Th17

S. schenckii exposto ao tolueno induziu a produção de IFN- γ e IL-17 em esplenócitos. Os níveis atingiram os 1000 e 126,4 pg/ml, respectivamente, no fungo tratado com a maior concentração (Figura 23). A menor concentração produziu níveis de 800 pg/mL, bem maior quando comparado com os valores obtidos no grupo de animais infectados sem o fungo exposto ao solvente. Os níveis elevados para IFN- γ apontam uma resposta imune para um perfil Th1.

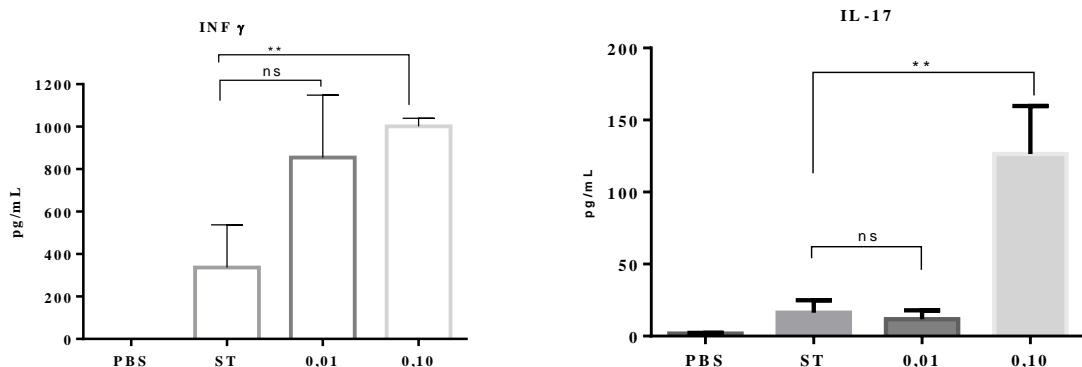


Figura 23. Perfil de Th1/Th17 em esplenócitos de camundongos Balb/c infectados por *S. schenckii* expostos a diferentes concentrações de tolueno, em comparação com camundongos infectados com fungos não expostos a tolueno (ST) ou não infectados (PBS). Os esplenócitos foram estimulados in vitro com Concanavalina A e as citocinas foram quantificadas no sobrenadante por ELISA **($p < 0,01$).

5.10 Virulência de *S. schenckii* em modelo subcutâneo

A progressão da esporotricose subcutânea foi seguida durante 21 dias. Os animais infectados com fungos crescidos em tolueno produziram lesões mais persistentes e supurativas na pele quando comparado com o grupo infectado com fungo não exposto (Figura 24). Em todos os casos foi possível recuperar fungos das lesões primárias 21 dias pós-infecção, porém, no grupo 0,10% foi observada maior carga fúngica (Figura 24).

1.

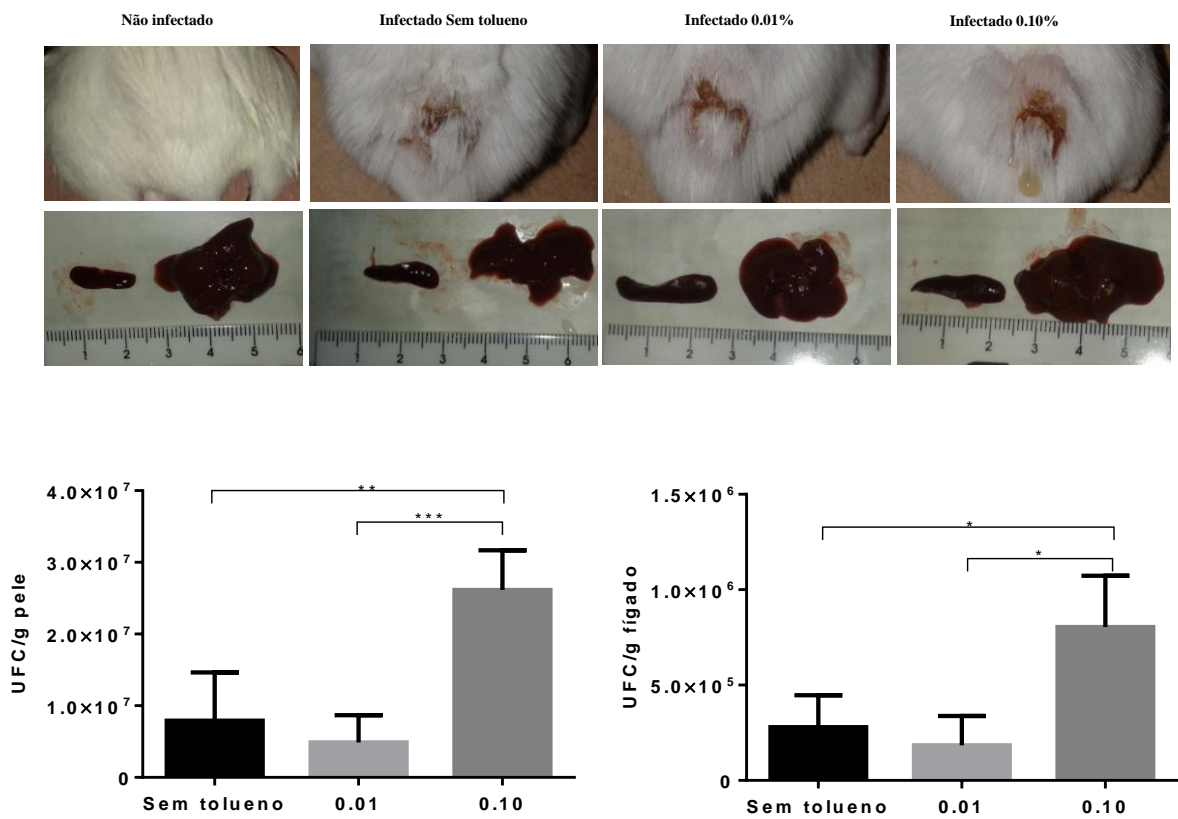


Figura 24. Progressão da esporotricose aos 21 dias de infecção. A) Lesões da pele nos grupos infectados. O grupo infectado 0,10% apresentou lesões na pele mais persistentes com disseminação à cauda e fígado. B) Disseminação a órgãos: lesões macroscópicas em fígado e baço do grupo infectado com fungos crescidos em tolueno, apresentando aumento de tamanho conforme incrementa-se a concentração de tolueno a que o fungo foi exposto. Carga fúngica em pele e fígado aumentou nos animais infectados com fungo exposto a 0,10% de tolueno.

5.10.1 Histopatologia

Foram realizados exames histopatológicos para avaliar a progressão da infecção. Nos sítios da inoculação foram observadas reações inflamatórias agudas que progrediram a uma inflamação supurativa, sendo mais severa no grupo infectado com fungo crescido a 0,10% de tolueno. Nos grupos infectados também foram observadas infiltrações de leveduras na pele e no tecido subcutâneo, porém, foi mais notável no grupo 0,10% (Figura 25). Nos grupos infectados apresentou-se disseminação ao baço e fígado, porém os fungos crescidos a 0,10% de tolueno induziram granulomas (Figura 26).

2.

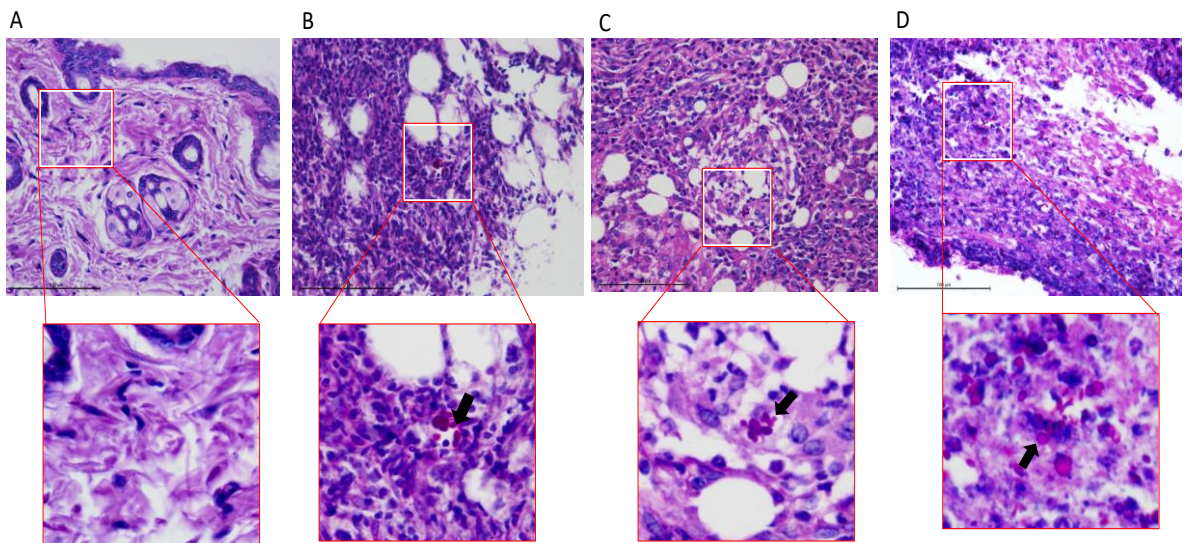


Figura 25. Reação inflamatória supurativa na pele de camundongos Balb/c. Observaram-se infiltrados mononucleares com células epiteliodes e presença de leveduras, mais numerosas no grupo infectado com fungos crescidos a 0,10%. (*seta preta*: leveduras). A) grupo não infectado, B) Grupo infectado com fungo não exposto a tolueno, B e D) Infectados com fungos crescidos a 0,01 e 0,10% tolueno.

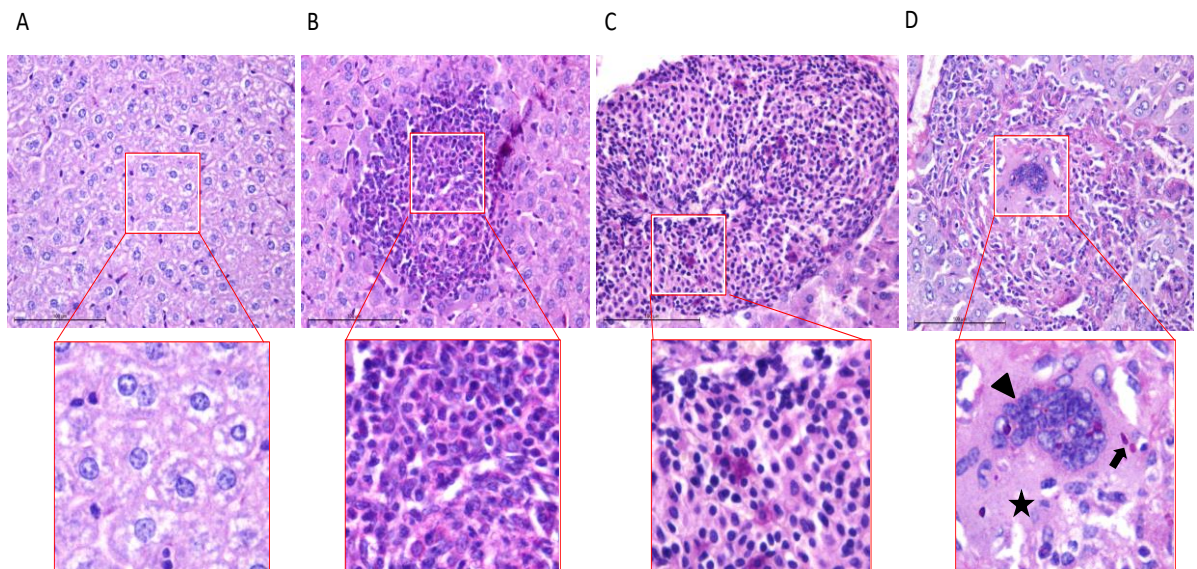


Figura 26. Histopatologia do fígado de camundongos Balb/c mostrando a reação granulomatosa e supurativa. Granulomas com infiltrados mononucleares, células epiteliodes e leveduras nos grupos infectados. No grupo 0,10% observou-se granuloma de tipo corpo estranho com células gigantes e necrose central. (*seta preta*: leveduras, *cabeça de seta*: células gigantes, *estrela*: área de necrose). A) Não infectado, B) Infectado Sem Tolueno, C e D) infectados com fungo crescido a 0,01 e 0,10% tolueno, respectivamente.

5.10.2 Fenotipagem de linfócitos T1/Th17 e Treg em baço

Os grupos infectados com fungos 0,10% tolueno mostraram maior nível de linfócitos Th1, Th17 e Th1/Th17 (Figura 27) com fenotipagem CD3+CD4+CD25+IFN γ e CD3+CD4+CD25+IFN γ / CD3+CD4+CD25+IL-17, respectivamente.

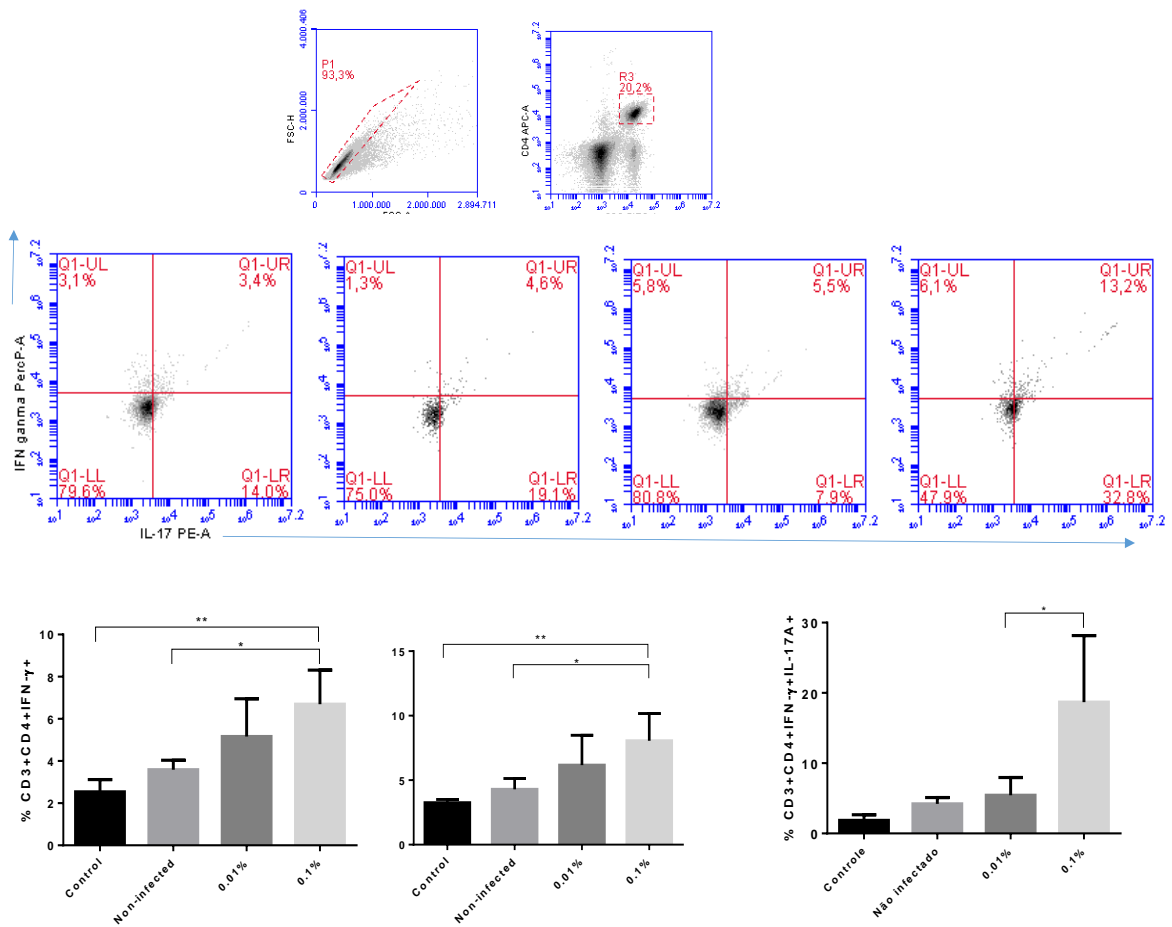


Figura 27. Fenotipagem de linfócitos Th1/Th2/Th17 em baços de camundongos Balb/c infectados com fungos expostos ou não ao tolueno. *(p < 0,05); **(p < 0,01).

Também observou-se uma elevação das células Tregs com fenótipo CD3+CD4+CD25+Foxp3+ (Figura 28).

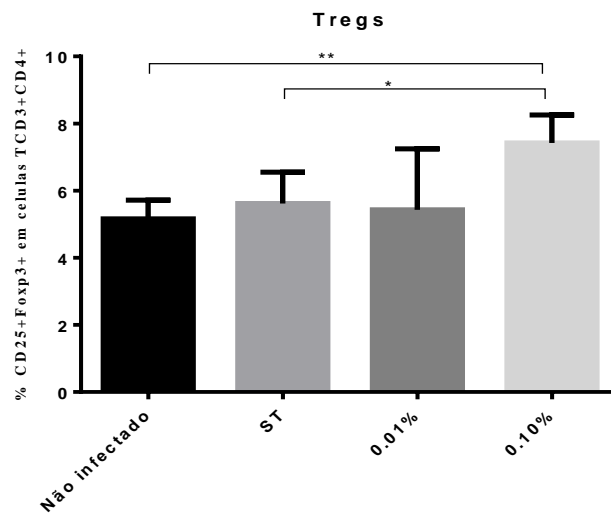
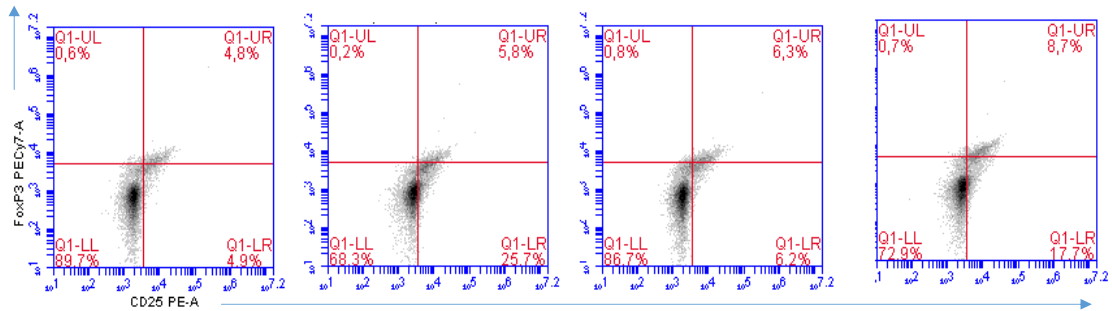


Figura 28. Fenotipagem de linfócitos Treg em baços de camundongos Balb/c infectados com fungos expostos ou não ao tolueno. *(p < 0,05); **(p < 0,01).

5.10.3 Padrão de citocinas do perfil Th1/Th2/Th17 em soro

As citocinas foram dosadas nos soros coletados de sangue periférico de camundongos infectados e não infectados. Os níveis das interleucinas IL-2 e IL-4 não foram estatisticamente significantes, enquanto a IL-6, IFN γ , TNF- α e Th17 foram relevantes na resposta à infecção, principalmente no grupo infectado com fungo 0,10% (Figura 29).

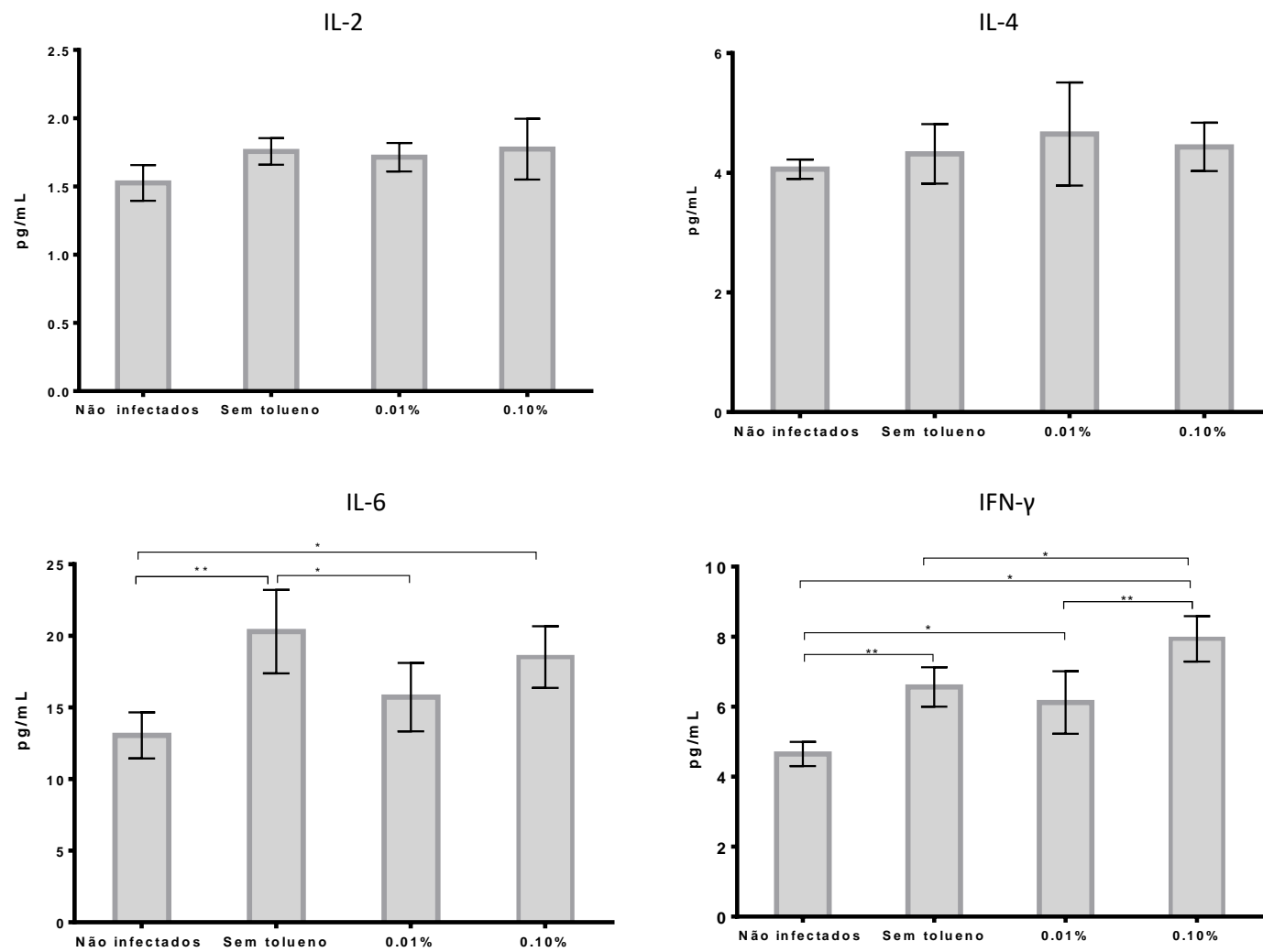


Figura 29. Citocinas Th1, Th2 e Th17 em soro determinadas por CBA em citômetro de fluxo. *(p <0,05); **(p <0,01); *(p <0,001); ****(p <0,0001)**

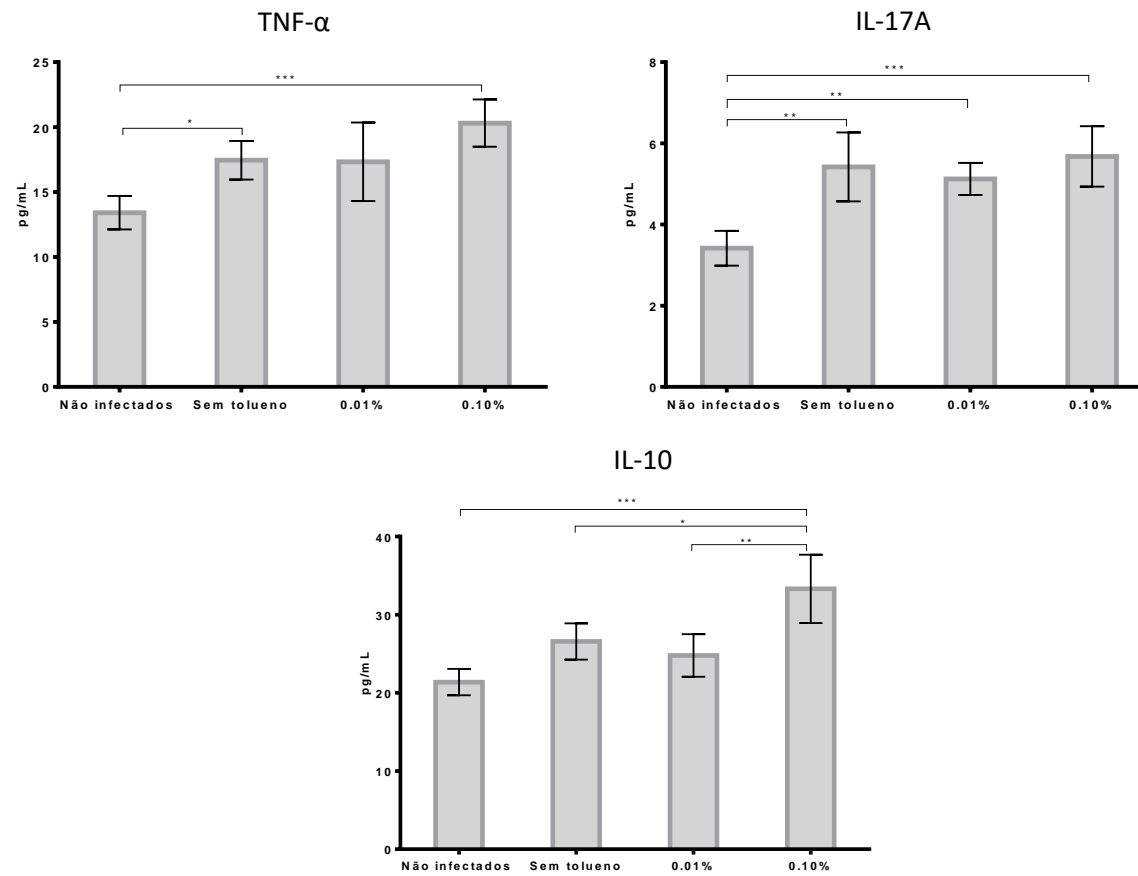


Figura 29. Citocinas Th1, Th2 e Th17 em soro determinadas por CBA em citômetro de fluxo. *(p <0,05); **(p <0,01); *(p <0,001); ****(p <0,0001)**

6 DISCUSSÃO

Pouco se sabe sobre o efeito de condições ambientais extremas na virulência de *S. schenckii*. O fungo vive naturalmente no solo onde coexiste com diversos estressores ambientais (Téllez *et al.*, 2014). Prenafeta-Boldú e colaboradores (2006) relataram que várias cepas de fungos que degradam hidrocarbonetos voláteis, incluindo *S. schenckii*, são agentes causadores de micoses graves. Este fato nos levou a estudar o efeito da exposição ao tolueno, um importante poluente do solo, na virulência de *S. schenckii*. Apesar dos relatos da presença deste fungo em locais contaminados com tolueno, não existiam até então estudos sobre os níveis de tolerância do fungo a este xenobiótico.

Em 2001, Prenafeta-Boldú e colaboradores relataram um fungo do tipo *Sporothrix* capaz de crescer em tolueno: o CBS 110552 (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2001). Eles mostraram por meio de comparações do GenBank que o CBS 110552 é altamente homólogo a cepas pertencentes ao gênero *Sporothrix*. Também descreveram uma rota de degradação do tolueno desse fungo (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006). No entanto, nenhum outro estudo foi feito nesse sentido. Por esse motivo, foi necessário determinar os níveis de tolerância do fungo na presença desse solvente.

O intervalo de concentração de tolueno usado neste estudo é consistente com os níveis relatados em solos contaminados. Segundo a CETESB os valores permissíveis para hidrocarbonetos aromáticos são de 80 mg/1000 kg solo seco e segundo CONAMA 420 os valores são de 35, 40 e 95 mg/kg para as áreas agrícola, residencial e industrial, respectivamente.

Em nosso estudo, *S. schenckii* foi capaz de sobreviver e se adaptar a concentrações de 0,01 e 0,10% de tolueno, correspondendo entre uma e 10 vezes acima do limiar considerado para solos contaminados, respectivamente. As concentrações superiores inibiram o crescimento do fungo. Foi também interessante a redução da concentração de tolueno na cultura com fungos em crescimento. Os níveis do consumo de tolueno, quando analisados por cromatografia gasosa, sugerem que o fungo foi capaz de metabolizar este composto aromático.

O tolueno e os hidrocarbonetos aromáticos são altamente tóxicos para os organismos, pois a partição preferencial desses compostos são as membranas celulares, as quais podem modificar as suas estruturas pela interação com esses compostos, o que leva à morte celular (Sikkema *et al.*, 1995). Os microrganismos degradadores de tolueno não escapam a este

efeito tóxico geral e também são sensíveis a choques de tolueno, apesar de contar com vários mecanismos para assimilá-lo (Weber *et al.*, 1995; Cerniglia, 1997; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2002, 2012; Blasi *et al.*, 2016). Os processos parciais de transformação observados em fungos comumente envolvem a desintoxicação de xenobióticos por meio do sistema enzimático monoxigenase do citocromo-P450 (Cerniglia *et al.*, 1992; van den Brink *et al.*, 1998; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006; Cresnar e Petric, 2011).

Diferentes leveduras negras (*Black yeast*) e fungos têm sido estudados como ferramentas potenciais para a biorremediação (April *et al.*, 1998; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2001, 2006; de Hoog *et al.*, 2003, 2006, 2011; Blasi *et al.*, 2016), em particular dos gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora* e *Pseudallescheria*, possuem alta capacidade de crescimento em ambientes poluídos e de metabolizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono, e Algumas dessas espécies são potencialmente patogênicas e já foram observadas conexões fisiológicas entre a assimilação de hidrocarbonetos e certos padrões de infecção de mamíferos. Porém, pouco se sabe de como essa interação pode modificar a capacidade para infectar humanos e outras espécies (de Hoog *et al.*, 2006; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006). Assim, o efeito dos hidrocarbonetos na virulência fúngica precisa ser elucidado para evitar a possibilidade da ocorrência de riscos biológicos (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006).

Para vários fungos patogênicos humanos, foi demonstrado que os determinantes da virulência necessários para a patogenicidade dos mamíferos também são importantes para a sobrevivência da predação por amebas, fungos e nematoides (Steenbergen *et al.*, 2004; Mylonakis *et al.*, 2002). Por exemplo, Casadevall e colaboradores (2003) relataram que o fungo *C. neoformans* manifesta uma estratégia patogênica intracelular notavelmente similar em macrófagos de mamíferos e amebas. A estratégia de replicação intracelular de *C. neoformans* em amebas e macrófagos compartilha semelhanças surpreendentes, apesar da enorme distância filogenética entre espécies protistas e mamíferos. Essas associações levaram à sugestão de que alguns dos determinantes da virulência para fungos patogênicos humanos foram originalmente selecionados como mecanismos para sobreviver contra predadores de células ameboides (Casadevall *et al.*, 2003).

Neste estudo, após uma redução drástica da população nas concentrações de 0,01 e 0,10% de tolueno na cultura, os fungos sobreviventes sofreram alterações estruturais, como a redução da espessura da parede celular, a estimulação da melanogênese e a produção de catalase e SOD.

A melanina é um fator de virulência que aumenta a resistência dos fungos aos estressores ambientais e à resposta imune no hospedeiro. Fungos melanizados foram

encontrados em climas extremos, incluindo a Antártica, reatores nucleares contaminados, máquinas de lavar louça onde resistem ao calor, detergentes e outras condições extremas (Zhdanova *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2010; Zalar *et al.*, 2011). A melanina aumenta a virulência fúngica e influencia a resposta imune do hospedeiro (Eisenman e Casadevall, 2012) promovendo a ligação do fungo aos tecidos deste e evitando o seu reconhecimento, mascarando vários padrões moleculares a ele associados (Upadhyay *et al.*, 2016). Além disso, a melanina interfere com a função normal das células fagocíticas, incluindo a capacidade oxidativa e a produção de nitritos em macrófagos, previne a acidificação do fagolisossomo e inibe a morte dos fungos dentro dos macrófagos, o que pode contribuir para a disseminação fúngica no hospedeiro (Bocca *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2010).

A presença natural de melanina foi demonstrada em espécies do gênero *Sporothrix* e constitui um fator que favorece a sua virulência e a resistência a drogas antifúngicas (Morris-Jones *et al.*, 2003; Madrid *et al.*, 2011; Almeida-Paes *et al.*, 2016). Embora a melanina nas espécies de *Sporothrix* tenha sido descrita como componente da parede celular, poucos estudos referem-se aos pigmentos fora dessa região. Garrison e colaboradores (1979) reportaram pela primeira vez a presença de corpos eletro-densos no citoplasma de leveduras de *S. schenckii* tanto *in vitro* como *in vivo*.

Em nosso estudo foi observado nos fungos expostos ao tolueno, principalmente na concentração 0,10% maior produção de estruturas citoplasmáticas semelhantes a melanossomas em diferentes fases de formação. Diferentes relatos revelam que a melanização fúngica ocorre em vesículas especializadas e que são análogas aos melanossomas de mamíferos (Franzen *et al.*, 1999; Eisenman *et al.*, 2009; Nosanchuk *et al.*, 2015). O processo de melanização ocorre em vesículas gerando diferentes intermediários altamente reativos. Assim, a melanização nas vesículas protege as células dos efeitos tóxicos desses metabólitos (Nosanchuk *et al.*, 2015).

Em resposta a mudanças ambientais as leveduras remodelam suas paredes, um processo controlado por vias de sinalização evolutivamente conservadas (Hog1) e integridade celular (Mkc1, Cek1). Estas vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) modulam a expressão do gene da parede celular, levando à construção de uma nova parede celular modificada (Ene *et al.*, 2015). Klis e colaboradores (2002) destacaram a flexibilidade da parede celular em termos de crescimento de nova parede celular e adaptação celular à mudança ambiental.

A adesão do fungo às células hospedeiras desempenha um papel central na patogênese. Devido à sua localização, composição e imunogenicidade, a parede celular é a

principal estrutura fúngica envolvida na interação com o hospedeiro, e sua imunogenicidade é mediada por uma variedade de moléculas que inclui glicoproteínas, polissacarídeos, lipídios e pigmentos (Ponton *et al.*, 2001).

Com a exposição ao tolueno produziram-se mudanças no perfil proteico da parede celular dos conídios de *S. schenckii*. As proteínas SDS/DTT extraíveis expressas do fungo crescido a 0,10% de tolueno podem desempenhar um papel importante na sobrevivência do fungo em tais condições, e inclusive ter implicações diretas na patogênese. A capacidade dos constituintes da parede celular, incluindo glucano, quitina e glicoproteínas, de modular (ativar ou deprimir) a resposta imune estão bem documentadas (Chaffin *et al.*, 1998; Ruiz-Baca *et al.*, 2009, 2011; de Almeida *et al.*, 2015; Portuondo *et al.*, 2016).

Estudos revelaram que o tolueno desencadeia a expressão de antioxidantes fúngicos, como forma de detoxicação celular para reduzir o impacto dos danos causados pelas ERO (Blasi *et al.*, 2017). O estresse oxidativo ocorre quando os níveis de ERO excedem a capacidade antioxidante das células como ocorre após a exposição das células à radiação ionizante, produtos químicos, H₂O₂, metais pesados, etc. (Jamieson 1998; Angelova *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2013). A capacidade de evitar ou detoxicar as ERO antimicrobianas produzidas pelos fagócitos em resposta à infecção é um pré-requisito para muitos patógenos microbianos (Holbrook *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2014).

Estudos anteriores mostraram que a catalase e a SOD são as enzimas antioxidantes fúngicas mais importantes contra o dano oxidativo das ERO nos fagócitos do hospedeiro (Hwang *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2003; Giles *et al.*, 2005; Frohner *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015). A catalase e SOD foram extensivamente avaliadas em vários fungos patogênicos incluindo *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon asahii*, e outros (Holdom *et al.*, 1995; Wysong *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2003; Martchenko *et al.*, 2004; Giles *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015). A inativação dos genes SOD e catalase, torna as células de *C. albicans* mais sensíveis à morte fagocitária e atenua a virulência fúngica (Wysong *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2002; Brown *et al.* 2014).

Diversos estudos mostraram que os fungos patogênicos do gênero *Sporothrix* causam dano tecidual e levam a um estado de estresse oxidativo, principalmente a espécie mais virulenta *S. brasiliensis* (Castro *et al.*, 2017; Mario *et al.*, 2017). Os mecanismos de proteção contra as ERO também são considerados um importante fator de virulência em espécies patogênicas de *Sporothrix* (Almeida-Paes *et al.*, 2015).

Dada a importância da catalase e da SOD como fatores de virulência, avaliamos a produção dessas enzimas após a exposição ao tolueno. Aqui mostramos que o tolueno induziu uma maior produção de catalase e SOD nos fungos tratados quando comparado com os fungos não tratados. Essas mudanças adaptativas em resposta ao estressor são capazes de proteger o fungo contra os danos induzidos por suas próprias ERO e as produzidas por células fagocíticas no hospedeiro infectado, evidenciando a virulência fúngica (Casadevall *et al.*, 2003). A resistência dos fungos tratados ou não com tolueno perante o desafio com H₂O₂, foi confirmada por dois métodos. Um método consistiu na realização de diluições seriadas de fungos expostos a diferentes concentrações de H₂O₂ e posteriormente semeados em ágar, também em diluições seriadas (estresse oxidativo) (Ramirez-Quijas *et al.*, 2015), e pelo ensaio da dihidrorodamina-123 por citometria de fluxo (Shao *et al.*, 2016).

Com o intuito de avaliar se as mudanças do fungo após exposição ao tolueno aumentaram a virulência de *S. schenckii*, grupos de camundongos foram infectados por via intraperitoneal ou subcutânea com fungos expostos ao tolueno e tipo selvagem. As cargas fúngicas nos camundongos infectados com *S. schenckii* não expostas e expostas ao tolueno revelaram uma diferença na contagem de UFC no baço e no fígado no dia 7 pós-infecção. Esse achado sugere que a indução de novos fatores de virulência em fungos tratados com tolueno favoreceu sua disseminação no hospedeiro e reduziu a capacidade do sistema imunológico de eliminá-los. Noverr e colaboradores (2004) relataram que a lacase, uma cuproenzima disseminada que catalisa a síntese de melanina na presença de compostos fenólicos, promove a disseminação extrapulmonar de *Cryptococcus neoformans* em um modelo murino de infecção pulmonar. Além disso, estudos em *Candida albicans* mostraram que a catalase fúngica e a SOD degradam as espécies reativas de oxigênio derivadas do hospedeiro para escapar da vigilância imunológica inata, promovendo a disseminação de fungos (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2008; Frohner *et al.*, 2009).

A maior carga fúngica em camundongos infectados com grupos de *S. schenckii* expostos ao tolueno foi associada a níveis mais elevados de óxido nítrico, IL-1 β , TNF- α e IL-10 produzidos por macrófagos peritoneais *ex vivo* e IFN- γ e IL-17 por esplenócitos. Esses achados foram também analisados em um modelo de infecção natural pela via subcutânea em camundongos (Castro *et al.*, 2013). Os fungos tratados com tolueno mostraram nesse outro modelo maior presença no sítio de infecção e disseminação sistêmica como revelado pela contagem de UFC e por histopatologia. O estudo anatomopatológico revelou a formação de granulomas no fígado e infiltração de células inflamatórias no tecido subcutâneo nos fungos tratados com a maior concentração de tolueno, como resposta à

maior virulência desses fungos. Estas alterações no hospedeiro estão associadas à virulência fúngica (Arrillaga-Moncrieff *et al.*, 2009). Neste estudo, também observou-se uma elevação dos níveis de linfócitos do perfil Th1 e Th1/Th17 com fenotipagem CD3+CD4+CD25+IFN γ e CD3+CD4+CD25+IFN γ /CD3+CD4+CD25+IL-17, respectivamente, quando estudadas por citometria de fluxo. Também estas modificações das populações linfocitárias tiveram uma expressão nas citocinas do padrão Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) e Th17 (IL-17), quando avaliadas por CBA, em amostras de soro. Os fungos tratados com tolueno na maior concentração exibiram maior estimulação de citocinas dos perfis Th1/Th17 e menor de perfil Th2. A resposta Th1 e Th17 estão envolvidos na defesa contra *S. schenckii* (Sassá *et al.* 2009; Maia *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2015) e sua estimulação significativa em camundongos infectados com fungos tratados com tolueno revelaram o efeito causado por uma alta carga fúngica no hospedeiro infectado.

Interessantemente, também observou-se uma elevação das células Tregs com fenótipo CD3+CD4+CD25+Foxp3+ e a citocina antiinflamatória IL-10 como reflexo da necessidade de compensar a excessiva resposta inflamatória causada pela virulência do fungo (Roussey *et al.*, 2016). Um padrão similar com estimulação de Th1, Th17 e Tregs associada à infecção sistêmica por *C. albicans* tem sido descrita por outros autores (Pandiyan *et al.*, 2011; Whibley *et al.*, 2014).

Várias evidências sugerem um papel funcional para as células Treg no contexto das doenças fúngicas, porém com consequências aparentemente discrepantes. Alguns deles sugerem que as células Treg aumentaram a imunidade protetora (Pandiyan *et al.*, 2011; Netea *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2008; Schulze *et al.*, 2014) enquanto em outros modelos, as células Treg promovem a disseminação fúngica e imunopatologia (Whibley *et al.* 2014).

Nosso grupo descreveu recentemente em um estudo comparativo da resposta Th1/Th2/Th17/Tregs entre *S. schenckii* e *S. brasiliensis* em camundongos C57BL6 infectados pela via subcutânea, que a maior virulência de *S. brasiliensis* esteve associada a uma maior resposta das populações Th1/Th17 e Tregs (Batista-Duarte *et al.*, 2018). Hoje é aceito que além do papel imunossupressor das Tregs e controlador da resposta imune para evitar excessiva inflamação, elas podem favorecer um desvio para Th17 para favorecer a eliminação do patógeno em estagios avançados da infecção (Diller *et al.*, 2016; Sehrawat and Rouse, 2017).

Em resumo, nossos resultados oferecem, pela primeira vez, evidências de que a exposição de *S. schenckii* a concentrações de tolueno em níveis contaminantes do solo induziu modificações fúngicas que contribuem com a virulência. Novos estudos estão sendo

realizados para determinar alterações bioquímicas e moleculares em nível celular em resposta à exposição ao tolueno e outros xenobióticos, bem como para aprofundar as alterações induzidas no sistema imunológico.

7 CONCLUSÕES

- O fungo *S. schenckii* foi capaz de manter a viabilidade celular até concentrações de 0,10%(v/v) de tolueno.
- O fungo foi capaz de consumir o tolueno e se multiplicar após uma redução drástica da população inicial.
- A presença do tolueno produziu mudanças na forma do micélio, cor e textura, e reduziu o diâmetro das colônias. O tolueno diminuiu a espessura de da parede celular dos conídios e estimulou a formação de corpos eletrodensos semelhantes a melanossomas, os quais encontraram-se em diferentes estágios de formação.
- A composição proteica da parede celular do fungo *S. schenckii* foi modificada após exposição ao tolueno principalmente a 0,10%.
- A exposição ao tolueno incrementou a atividade de SOD e catalase, as quais permitiram a redução nos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares e, portanto, uma maior resistência do fungo ao estresse oxidativo por H₂O₂.
- Nos fungos expostos ao tolueno observou-se uma maior virulência expressa na maior carga fúngica no fígado e baço nos animais infectados, principalmente na maior concentração do composto. Os fungos crescidos em tolueno nas duas concentrações estudadas estimularam a liberação de mediadores inflamatórios (NO, TNF- α) e anti-inflamatório (IL-10) aos 7 dias após infecção, principalmente na maior concentração, o qual evidenciou um possível balanço entre a resposta de macrófagos M1/M2.
- A exposição ao tolueno do fungo também estimulou o padrão Th1/Th17 e Tregs e a liberação de IFN- γ , IL-17 e IL-10 nos soros dos animais infectados.

Os resultados corroboram a hipótese de que o ambiente influencia diretamente a virulência do fungo e constitui uma maneira de explicar ao menos em parte, possíveis surtos em regiões altamente poluídas.

8 REFERÊNCIAS

1. Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Human immunology*, 2011;72,12:1188-1193
2. Alegranci P, de Abreu Ribeiro LC, Ferreira LS, Negrini TeC, Maia DC, Tansini A, et al. The predominance of alternatively activated macrophages following challenge with cell wall peptide-polysaccharide after prior infection with *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 2013;176(1-2):57-65.
3. Almeida-Paes R, de Oliveira LC, Oliveira MM, Gutierrez-Galhardo MC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. *Biomed Res Int*. 2015;2015:212308.
4. Almeida-Paes R, Figueiredo-Carvalho MH, Brito-Santos F, Almeida-Silva F, Oliveira MM, Zancopé-Oliveira RM. Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152796.
5. Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DFS, Valle ACFD, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo resistance. *Med Mycol*. 2017;55(5):507-17.
6. Anahid S, Yaghmaei S, Ghobadinejad, Z. Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica* 2011.18:502–508.
7. Anderson TA, Beauchamps JJ, Walton BT. Organic chemicals in the environment fate of volatile and semivolatile organic chemicals in soil; abiotic vs biotic losses. *J. Environ. Qual*. 1991;20:420-424.
8. Andrés MT, Viejo-Díaz M, Fierro JF. Human Lactoferrin Induces Apoptosis-Like Cell Death in *Candida albicans*: Critical Role of K⁺-Channel-Mediated K⁺ Efflux. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;4081–4088.
9. Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV, Slokoska LS. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res*. 2005;109(Pt 2):150-8.
10. April TM, Abbott SP, Foght JM, Currah RS. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae) *Can J Microbiol*. 1998;44:270–278.
11. Asif AR, Oellerich M, Amstrong VW, Riemenschneider B, Monod M, Reichard U. Proteome of Conidial Surface Associated Proteins of *Aspergillus fumigatus* Reflecting Potential Vaccine Candidates and Allergens. *Journal of Proteome Research*. 2006; 5:954-962.
12. 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*. 2009;15(7):651-5.
13. Atlas RM. Efficacy of bioremediation: chemical and risk-based determinations. In *Bioremediation: The Tokyo '94 Workshop 1995*. OECD Documents, Paris, France
14. Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):633-54.
15. Barros MB, Schubach AeO, do Valle AC, Gutierrez Galhardo MC,

- Conceição-Silva F, Schubach TM, et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis.* 2004;38(4):529-35.
16. Barros MB, Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. [Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic]. *Rev Panam Salud Publica.* 2010;27(6):455-60.
 17. Batista dos Anjos, R. Avaliação de HPA e BTEX no solo e água subterrânea em postos de combustíveis: estudo de caso na cidade de Natal-RN. Brasil. Dissertação de mestrado em Ciências e Engenharia de petróleo. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2012.
 18. Batista-Duarte A; Téllez-Martínez D; Cleverton RA; Portuondo DF; Juliana Jellmayer JA; Polesi MC; Carlos IZ (2018b) Comparative virulence and Th1/Th17/Tregs response induced by *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* in a murine model of sporotrichosis. *Fungal Biology.* In press.
 19. Batista-Duarte A, Téllez MD, D Sgarbi DB, Carlos IZ. Environmental Conditions and Fungal Pathogenicity In: Carlos IZ. *Sporotrichosis. New Developments and Future Prospects.* Springer International Publishing Switzerland.2015
 20. Bazzi T, de Melo SMP, Figuera RA, Kommers GD. Clinical, epidemiological, histomorphological and histochemical characteristics of the feline sporotrichosis. *Pesq. Vet. Bras.* 2016;36.
 21. Beaugregard D. Locating and estimating air emissions from sources of toluene. U.S. Environmental Protection Agency, 1993
 22. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1986;24: 411-451.
 23. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host microorganism interactions. *Annu Rev Immunol* 2009;27: 551–589.
 24. Bernal GS, Sabanero GB, Sabanero ML. Biología del proceso de adhesión de *Sporothrix schenckii* y otros patógenos de humanos hacia los tejidos hospederos. *Investigación y Ciencia.* 2009;43:21-25.
 25. Blasi B, Poyntner C, Rudavsky T, Prenafeta-Boldú FX, Hoog S, Tafer H, Sterflinger K. Pathogenic Yet Environmentally Friendly? Black Fungal Candidates for Bioremediation of Pollutants. *Geomicrobiol J.* 2016;33(3-4):308-317.
 26. Bocca AL, Brito PP, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia.* 2006;161(4):195-203.
 27. Bonifaz A, Saúl A, Paredes-Solis V, Fierro L, Rosales A, Palacios C, et al. Sporotrichosis in childhood: clinical and therapeutic experience in 25 patients. *Pediatr Dermatol.* 2007;24(4):369-72.
 28. Borges TS, Rossi CN, Fedullo JDL, Taborda JP, Larsson CE. Isolation of *Sporothrix schenckii* From the Claws of Domestic Cats (Indoor and Outdoor) and in Captivity in São Paulo (Brazil). *Mycopathologia.* 2013;176: 129.
 29. Brown AJ, Budge S, Kaloriti D, Tillmann A, Jacobsen MD, Yin Z, Ene IV, Bohovych I, Sandai D, Kastora S, Potrykus J, Ballou ER, Childers DS, Shahana S, Leach MD. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol.* 2014;217(Pt 1):144-55.
 30. Bustamante B, Campos PE. Endemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2001;14(2):145-9.
 31. Cain RB, Bilton RF, Darrah JA. The Metabolism of Aromatic Acids by

- Micro-organisms. Metabolic pathways in the fungi. *Biochem. J.* 1968;108:797-828.
32. Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Placeres MC. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Scand J Immunol.* 2003;57(3):214-20.
 33. Carlos IZ, Sassá MF, da Graça Sgarbi DB, Placeres MC, Maia DC. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2009;168:1-10.
 34. Carmichael JW. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic Hyphomycetes. *Can. J. Bot.* 1962; 40:1137–1173
 35. Carrada-Bravo T. Update on sporotrichosis. *Aust Fam Physician.* 1995;24(6):1070-1, 4.
 36. Carrada-Bravo T, Olivera-Macías MI. New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Rev Latinoamer Patol Clin.* 2013; 60(1):5-24.
 37. Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* (1999) 67: 3703-3713.
 38. Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. ‘Ready made’ virulence and ‘dual use’ virulence factors in pathogenic environmental fungi — the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6: 332–337.
 39. Casadevall A, Fang FC, Pirofski LA. Microbial Virulence as an Emergent Property: Consequences and Opportunities. *PLoS Pathog.* 2011;7(7): e1002136
 40. Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg* 1967;70:181–184.
 41. Castelo-Teixeira PA, Rafaela Alves RDC, Rodrigues FLF, Lyra MMC, Pérez AT, Loureiro VC, Rozental YP, Lopes-Bezerra LM. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Medical Mycology.* 2010;48(5):687–695
 42. Castro RA, Kubitschek-Barreira PH, Teixeira PA, Sanches GF, Teixeira MM, Quintella LP, et al. Differences in cell morphometry, cell wall topography and gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. *PLoS One.* 2013;8(10):e75656.
 43. Castro VSP, Da Silva AS, Thomé GR, Wolkmer P, Castro JLC, Costa MM, Graça DL, Oliveira DC, Alves SH, Schetinger MRC5, Lopes STA, Stefani LM, Azevedo MI, Baldissera MD, Andrade CM. Oxidative stress in rats experimentally infected by *Sporothrix schenckii*. *Microb Pathog.* 2017;107:1-5.
 44. Cerniglia CE. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 1992; 3(2-3): 351–368.
 45. Cerniglia CE. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1997;19(5-6):324-33.
 46. Cerutti PA. Prooxidant states and cancer. *Science* 1985;227:375-381.
 47. Črešnar B, Petrič Š. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom *Biochimica et Biophysica Acta* 1814. 2011;29-35.
 48. Costa R, Olivi P. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de Avaliação Quim. *Nova* 2008;31(7): 1820-1830
 49. Cox HHJ, Houtman JHM, Doddema HJ, Harder W. Enrichment of fungi and degradation of styrene in biofilters. *Biotechnol. Lett.* 1993;15: 737–742.
 50. Cox HHJ, Moerman RE, van Baalen S, van Heiningen WNM, Doddema HJ, Harder W. Performance of a styrene-degrading biofilter containing the yeast

- Exophiala jeanselmei. *Biotechnol. Bioeng.* 1997;53:259–266.
51. Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda CP, Heinrich G, Casadevall A, Perfect JR. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect. Immun.* 2003;71:173–180.
 52. Cuéllar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Cañas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castaño I, De Las Peñas A. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell.* 2008;7(5):814-25.
 53. Cunha MM, Franzen AJ, Seabra SH, Herbst MH, Vugman NV, Borba LP, de Souza W, Rozental S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.* 2010;10-80.
 54. Cruden DL, Wolfram JH, Rogers RD, Gibson DT. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992;58:2723–2729.
 55. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol.* 2015;53(1):3-14.
 56. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62: 130–180.
 57. Davis JW, Madsen S. Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere* 1996;33(1):107-130.
 58. Chao HJ, Chan CC, Rao CY, Lee CT, Chuang YC, Chiu YH, Hsu HH, Wu YH. The effects of transported Asian dust on the composition and concentration of ambient fungi in Taiwan. *Int J Biometeorol.* 2012; 56(2), 211-9.
 59. Chary P, Natvig DO. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J Bacteriol.* 1989;171(5):2646-52.
 60. da Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52(3 Pt 1):451-9.
 61. da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effect on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* 2006;8: 197-205.
 62. de Almeida JR, Kaihami GH, Jannuzzi GP, de Almeida SR. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol.* 2015;53(1):42-50.
 63. de Araujo ML, Rodrigues AM, Fernandes GF, de Camargo ZP, de Hoog GS. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. *Mycoses.* 2015;58(8):485-90.
 64. de Beurmann L, Gougerot H, Vaucher V. Sporotichoses cutanées du chat. *C R Soc Biol* 1909; 66: 370-2.
 65. de Capriles CC, Mata Essayag S, Lander A, Camacho R. Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). *Mycopathologia.* 1993;122(3):129-33.
 66. de Hoog GS, Vicente V, Caligiorne RB, Kantarcioglu S, Tintelnot K, Gerrits van den Ende AHG, Haase G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *J Clin*

- Microbiol. 2003;1:4767–4778.
67. de Hoog GS, Zeng JS, Harrak MJ, Sutton DA. Anton Van Leeuwen. 2006;90:257–268.
 68. de Hoog GS, Vicente VA, Najafzadeh MJ, Harrak MJ, Badali H. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Persoonia*. 2011;27:46–72.
 69. Jamieson, D. J. Oxidative stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998;14:1511–1527.
 70. de Lima Barros MB, Schubach AO, de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira R, Martins EB, Teixeira JL, Wanke B. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole--study of 645 patients. *Clin Infect Dis*. 2011;52(12):e200-6.
 71. de Lima Barros MB, Schubach TM, Galhardo MC, de Oliveira Schubach A, Monteiro PC, Reis RS, et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(6):777-9.
 72. de Souza CML, Nascimento EMM, Aparecida MR, Silva ARA. Gamma radiation effects on *Sporothrix schenckii* yeast cells *Mycopathologia*. 2011; 171(6):395-401.
 73. Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML. Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells. *Mediators of Inflammation*. 2016;Article ID 6309219, 8 pages.
 74. Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29(6):1106-13.
 75. Edwards C, Reuther WL, Greer DL. Disseminated osteoarticular sporotrichosis: treatment in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *South Med J*. 2000;93(8):803-6.
 76. Eisenman HC, Frases S, Nicola AM, Rodrigues ML, Casadevall A. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 2009;155(Pt 12), 3860–3867.
 77. Eisenmann HC, Casadevall.A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):931-940.
 78. Ene IV, Walker LA, Schiavone M, Lee KK, Martin-Yken H, Dague E, Gow NAR, Munro CA, Brown AJP. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. *mBio*. 2015;6(4):e00986-15.
 79. Estévez E, Veiga MC, Kennes C. Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma*. *Ind Microbiol Biotechnol* 2005; 32:33-37
 80. Farias WM, Resende GB, de Souza EM, da Fonseca FBC, Camapum LC, Mendes EG. Environmental Risk Assessment of Soil Contamination. Chemical and hydraulic behavior of a tropical soil compacted submitted to the flow of gasoline hydrocarbons. In: *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. InTech, 2014, p. 637-655.
 81. Fernandes KS, Mathews HL, Lopes Bezerra LM. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *J Med Microbiol*. 1999;48(2):195-203.
 82. Fernandes KS, Coelho AL, Lopes Bezerra LM, Barja-Fidalgo C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology*. 2000;101(4):563-9.
 83. Fernandes KS, Neto EH, Brito MM, Silva JS, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix*

- schneckii. *Immunology*. 2008;123(4):469-79.
84. Ferreira GF; Oliveira PS; Candida CA; Sasaki AA; Godoy-Martinez P; de Camargo PZ. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* Isolates from 5 Different geographic regions of Brazil: A forgotten and re-emergent pathogen. *The Open Mycology Journal*, 2009; 3, 48-58.
 85. Ferreira LS, Gonçalves AC, Portuondo DL, Maia DC, Placeres MC, Batista-Duarte A, et al. Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. *Immunobiology*. 2015;220(8):985-92.
 86. Findlay GH, Vismer HF, van der Liebenberg NW. Spore ultrastructure in *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 1979;69(3):167-70.
 87. Frantz B, Chakrabarty AM. Degradative plasmid in *Pseudomonas*. In: *The Bacteria, Vol. X, The Biology of Pseudomonas* (J. K. Sokatch ed.) Academic Press, New York, 1986;295-323.
 88. Franzen AJ, de Souza W, Farina M, Celuta SA, Rozental S. Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. *FEMS Microbiology Letters* 173. 1999;395-402.
 89. Freitas DC, de Migliano MF, Zani Neto L. Esporotricose: Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). *Rev Fac Med Vet S Paulo* 1956; 5:601-4.
 90. Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol*. 2009;71(1):240-52.
 91. García-Peña EI. Biodegradación de tolueno con *Scedosporium apiospermum*. Metabolismo y su relación en el funcionamiento de un biofiltro. Tesis de doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2002.
 92. Garrison RG, Boyd KS, Kier AB, Wagner JE. Spontaneous feline sporotrichosis: a fine structural study. *Mycopathologia*. 1979;69(1-2):57-62.
 93. Garrison RG, Mariat F, Boyd KS, Fromentin H. Ultrastructural observations of an unusual osmiophilic body in the hyphae of *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis stenoceras*. *Ann Microbiol (Paris)*. 1977;128(3):319-37.
 94. Gibson, DT, Hensley M, Yoshioka H, Mabry TJ. Formation of (1)-cis-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 1970;9:1626-1630.
 95. Giles SS, Batinic-Haberle I, Perfect JR, Cox GM. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryot. Cell*. 2005;4:46-54.
 96. Goodridge SH, Underhill MD. Host recognition of fungal pathogens. *Drug Discovery Today: Disease Mechanism*. 2007;4
 97. Ghosh A, Chakrabarti A, Hemashettar BM, Maiti PK. In vitro susceptibility pattern of *Sporothrix schenckii* strains isolated from three centers in India. *Indian J Med Res*. 2001;113:214-20.
 98. Gonçalves AC, Ferreira LS, Manente FA, de Faria CMQG, Polesi MC, de Andrade CR, et al. The NLRP3 inflammasome contributes to host protection during *Sporothrix schenckii* infection. *Immunology*. 2017;151(2):154-66.
 99. Gremião ID, Miranda LH, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog*. 2017;13(1):e1006077.
 100. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126:31-138.

101. Gross TL, Ihrke P. Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis. 2003;298-300
102. Hamilton AJ, Gomez BL. Melanins in fungal pathogens. *J. Med. Microbiol.* 2002;51:189-191.
103. Hao B, Cheng S, Clancy CJ, Hong MN. Caspofungin Kills *Candida albicans* by Causing both Cellular Apoptosis and Necrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013;57(1):326–332.
104. Hektoen L, Perkins CF. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *J Exp Med.* 1900; 5(1):77-89.
105. Hirano M, Watanabe K, Murakami M, Kano R, Yanai T, Yamazoe K, et al. A case of feline sporotrichosis. *J Vet Med Sci.* 2006;68(3):283-4.
106. Huertas MJ, Duque E, Marqués S, Ramos JL. Survival in Soil of Different Toluene-Degrading *Pseudomonas* Strains after Solvent Shock Applied and environmental microbiology 1998; 64(1):38–42.
107. Hodgson E. In *A Textbook of Modern Toxicology*; Hodgson E, ed.; 3rd ed., John Wiley & Sons: New Jersey 2004; cap. 1.
108. Holdbrook ED, Smolnycky KA, Youseff BH, Rappleye CA. Redundant catalases detoxify phagocyte reactive oxygen and facilitate *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. *Infect Immun.* 2013;81(7):2334-46.
109. Holdom MD, Hay RJ, Hamilton AJ. Purification, N-terminal amino acid sequence and partial characterization of a Cu, Zn superoxide dismutase from the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Free Radic Res.* 1995;22:519–531.
110. Holt MS. *Food Chem. Toxicol.* 2000;38(S21)
111. Holland HL, Brown FM, Munoz B, Ninniss RW. Side chain hydroxylation of aromatic hydrocarbons by fungi, part 2. Isotope effects and mechanism. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1988;II 1988:1557–1563
112. Howard PH. *Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals.* Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, Vol 1:468-476.
113. Hwang, CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology.* 2002;148,3705-3713.
114. Inoue A, Horikoshi K. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 1989;338:264–266.
115. Isken S, de Bont JAM. Active efflux of toluene in a solvent resistant bacterium. *J. Bacteriol* 1996;178:6056–6058
116. Jarosławiecka A, Piotrowska-Seget Z. Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology* 2014;160:12–25.
117. Jellmayer JA, Ferreira LS, Manente FA, Gonçalves AC, Polesi MC, Batista-Duharte A, et al. Dectin-1 expression by macrophages and related antifungal mechanisms in a murine model of *Sporothrix schenckii* sensu stricto systemic infection. *Microb Pathog.* 2017;110:78-84.
118. Jin Y, O'Connor GA. Behaviour of toluene added to sludge-amended soil. *J. Environ. Qual.* 1990;19:573-579.
119. Kacprzak M, Malina G. The tolerance and Zn²⁺, Ba²⁺ and Fe³⁺ accumulation by *Trichoderma atroviride* and *Mortierella exigua* isolated from contaminated soil. *Can J Soil Sci* 2005;85:283–290.
120. Klis FM, Pieternella M, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews.* 2002;26:239-256.

121. Kuo W, Huang C, Shih C, Jinn T. Cellular Extract Preparation for Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay. *Bio-protocol* 2013;3(13).
122. Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res* 14. 2014;1068–1079
123. KostECKI PT, Calabrese EJ. *Hydrocarbon Contaminated Soils*, Vol 3. CRC Press,1993.
124. Lacaz CS. *Sporothrix schenckii*. In: Lacaz CS et al. (Eds), *Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier 1998; p. 326– 331.
125. Lacaz, CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica*. Sarvier 2002.
126. Lahiri A, Das P, Chakravorty D. Engagement of TLR signaling as adjuvant: Towards smarter vaccine and beyond. *Vaccine* 2008; 26: 6777–6783
127. Larone DH. *Medically important fungi: a guide to identification*, 4th edition, ASM Press. Washington, DC. 2002.
128. Larsson CE. Sporotrichosis Braz. *J. Vet. Res.* 2011;48(3):250-259.
129. Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cellular microbiology*. 2010;12(7):863-872.
130. Liu X, Lian C, Jin L, An L, Yang G, Lin X. Characterization of *Sporothrix schenckii* by random amplification of polymorphic DNA assay. *Chinese Medical Journal*. 2003;116(2):239–242
131. Liu TT, Zhang K, Zhou X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. *J Zhejiang Univ Sci B* 2014;15:100–108.
132. Lima OC, Figueiredo CC, Pereira BAS, Coelho MGP, Morandi V, Lopes-Bezerra LM. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (1999) 32: 651-657.
133. Lima OC, Figueiredo CC, Previato JO, Mendonça-Previato L, Morandi V, Lopes-Bezerra LM. Involvement of Fungal Cell Wall Components in Adhesion of *Sporothrix schenckii* to Human Fibronectin. *Infect Immun*. 2001 Nov; 69(11): 6874–6880.
134. Lopes M, Mota M, Belo I. Comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* cellular response to different agents of oxidative stress. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013 ;170(2):448-58.
135. Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc*. 2006;78(2):293-308.
136. Lutz A, Splendore A. On a mycosis observed in man and mice: Contribution to knowledge of the so-called sporotrichosis. *Revista Médica de São Paulo* 1907; 21: 443-450.
137. Lynch M, Kuramitsu H. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microb Infect*. 2000;2:1245-1255.
138. McGuinness SL, Boyd R, Kidd S, McLeod Ch, Krause VL, Ralph AP. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, Northern Territory, Australia. *BMC Infect Dis*. 2016;16: 16.
139. Madeo F, Frohlich E, Frohlich KU. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139:729-734.
140. Madeo F, Frohlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Frohlich KU. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeasts. *J Cell Biol*. 1999;145:757-767.
141. Madeo F, Herker E, Wissing S, Jungwirth H, Eisenberg T, Frohlich KU. Apoptosis in yeasts. *Curr. Opin. Microbiol*. 2004;7: 655-660.

142. Madrid IM, Mattei AS, Soares MP, de Oliveira Nobre M, Meireles MC. Ultrastructural study of the mycelial phase of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from feline, canine and human cases of sporotrichosis. *Braz J Microbiol.* 2011;42(3):1147-50.
143. Magand F, Perrot JL, Cambazard F, Raberin MH, Labeille B. Autochthonous cutaneous sporotrichosis in France. *Ann Dermatol Venereol.* 2009 Mar;136(3):273-5.
144. Maia DC, Gonçalves AC, Ferreira LS, Manente FA, Portuondo DL, Velloso JC, et al. Response of Cytokines and Hydrogen Peroxide to *Sporothrix schenckii* Exoantigen in Systemic Experimental Infection. *Mycopathologia.* 2016;181(3-4):207-15.
145. Maia DC, Sassá MF, Placeres MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 2006;161(1):11-9.
146. Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3198-206.
147. Mario DN, Schaffer LF, Peroza LR, Jesus FPK, Denardi LB, Fachineto R, Alves SH. *Sporothrix brasiliensis* produces the highest levels of oxidative stress in a murine model among the species of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(4):554-557.
148. Marques EC. Estado e redes sociais: permeabilidade e coesão nas políticas urbanas no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Revan. 2000.
149. Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell.* 2004;15:456–467.
150. McGinnis MR, Nordoff N, Li RK, Pasarell L, Warnock DW. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med Mycol.* 2001;39(4):369-71.
151. Mehlman MA. Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industry:VIII Health effects of motor fuels: carcinogenicity of gasoline: Scientific update. *Environ. Res* 1992;59:238-249.
152. Mednick AJ, Nosanchuk JD, Casadevall A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect Immun.* 2005;73:2012–2019.
153. Mendonça L, Gorin PA, Lloyd KO, Travassos LR. Polymorphism of *Sporothrix schenckii* surface polysaccharides as a function of morphological differentiation. *Biochemistry.* 1976;15(11):2423-31.
154. Mendoza M, Alvarado P, Díaz de Torres E, Lucena L, de Albornoz MC. [Physiological compartment and in vivo sensitivity of *Sporothrix schenckii* isolates maintained for 18 years by two preservation methods]. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22(3):151-6.
155. Metchock BG, Nolte FS, Wallace Jr RJ. *Mycobacterium. Manual of Clinical Microbiology* Murray PR, Baron EJ, Pfaller A, Tenover FC, Tenover RH, Eds., 399-437, ASM Press, Washington, DC, USA 7th edition, (1999).
156. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 012/2014. Ministério da Saúde, Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses. 2014.
157. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007;13: 108–116.

158. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(6):463-88.
159. Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(24):15675-80.
160. Miranda LH, Conceição-Silva F, Quintella LP, Kuraiem BP, Pereira SA, Schubach TM. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36(4):425-32.
161. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MA, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res.* 2014;10:269.
162. Mora-Montes HM, Dantas AaS, Trujillo-Esquivel E, de Souza Baptista AR, Lopes-Bezerra LM. Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(6).
163. Morehart AL, Larsh HW. Laboratory examination of organic fungicides against zoopathogenic fungi in soil. *Appl Microbiol* 1967;15:1248–1251.
164. Moreira JA, Freitas DF, Lamas CC. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. *Infection.* 2015;43(3):267-76.
165. Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatol.* 2002;27(6):427-31.
166. Morris-Jones R, Youngchim S, Gomez BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuk JD, et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* 2003;71(7):4026-33.
167. Negrini TeC, Ferreira LS, Alegranci P, Arthur RA, Sundfeld PP, Maia DC, et al. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest.* 2013;42(1):36-48.
168. Nakayamada S; Takahashi H; Kanno Y; O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(3):297-302.
169. Nascimento RC, Espindola NM, et al. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol.* 2008;38(11):3080-3089.
170. Netea MG et al. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Curr Pharm Des.* 2006;12(32):4195-201.
171. Niyomploy, P, Chantragan S, Daranee Ch, Nawaporn V, Aphichart K, Polkit S. Superoxide dismutase isozyme detection using two-dimensional gel electrophoresis zymograms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2014;(90)72–77.
172. Nosanchuk JD, Stark RE, Casadevall A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure?. *Front Microbiol.* 2015;6:1463.
173. Noverr MC, Williamson PR, Fajardo RS, Huffnagle GB. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. *Infect Immun.* 2004 ;72(3):1693-9.
174. Oda LM, Kubelka CF, Alviano CS, Travassos LR. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun.* 1983;39(2):497-504.
175. Oliveira MM, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia.* 2011;172(4):257-67.

176. Oliveira MM, Maifrede SB, Ribeiro MA, Zancope-Oliveira RM. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(7):936-8.
177. Orofino-Costa R, Macedo PM, Rodrigues AM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017;92(5):606-20.
178. Pandiyan P, Zheng L, Lenardo MJ. The molecular mechanisms of regulatory T cell immunosuppression. *Front Immunol*. 2011;2:60.
179. Pappas PG, Tellez I, Deep AE, Nolasco D, Holgado W, Bustamante B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis*. 2000;30(1):65-70.
180. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latgé JP. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 2003;71:3551–3562.
181. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latgé JP. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 2003;71:3551–3562.
182. Pasarell L, McGinnis MR. Viability of fungal cultures maintained at -70°C. *J Clin Microbiol* 1992;30:1000–1004.
183. Pečiulytė D. Effect of long-term industrial pollution on microorganisms in soil of deciduous forests situated along a pollution gradient next to a fertilizer factory. Species diversity and community structure of soil fungi. *Ekologija*. 2010;56:(3– 4),132–143.
184. Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *PNAS*. 2003;100(24):14327-14332
185. Pereira SA, Menezes RC, Gremião ID, Silva JN, Honse CeO, Figueiredo FB, et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg*. 2011;13(4):220-3.
186. Pereira SA, Gremião ID, Kitada AA, Boechat JS, Viana PG, Schubach TM. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(3):392-3.
187. Pirofski LA, Casadevall A. Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC Biology* 2012, 10:6.
188. Plato A, Hardison SE, Brown GD. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol* 2015;37(2):97-106.
189. Prenafeta-Boldú FX, Kuhn A, Luykx D, Anke H, van Groenestijn JW, de Bont JAM. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycol. Res*. 2001;105:477–484.
190. Prenafeta-Boldú FX, Vervoort J, Grotenhuis JTC, van Groenestijn JW. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;2660–2665
191. Prenafeta-Boldú FX, Summerbell R, de Hoog GS. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard?. *FEMS Microbiol Rev*. 2006; 30:109–130.
192. Prenafeta-Boldú FX, Guivernau M, Gallastegui G, Vinñas, de Hoog SG, Sybren, Elías A. Fungal/bacterial interactions during the biodegradation of TEX hydrocarbons (toluene, ethylbenzene and p-xylene) in gas biofilters operated under xerophilic conditions. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;(80)722–734.

193. Portuondo DL, Batista-Duarte A, Ferreira LS, de Andrade CR, Quinello C, Téllez-Martínez D, et al. Comparative efficacy and toxicity of two vaccine candidates against *Sporothrix schenckii* using either Montanide™ Pet Gel A or aluminum hydroxide adjuvants in mice. *Vaccine*. 2017;35(34):4430-6.
194. Pontón J, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Alvarez M, Moragues MD. Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med Mycol*. 2001;39 Suppl 1:101-10.
195. Portuondo DL, Batista-Duarte A, Ferreira LS, Martínez DT, Polesi MC, Duarte RA, et al. A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. *Immunobiology*. 2016;221(2):300-9.
196. Quintella LP, Passos SR, do Vale AC, Galhardo MC, Barros MB, Cuzzi T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol*. 2011;38(1):25-32.
197. Ramírez-Quijas MD, Zazueta-Sandoval R, Obregón-Herrera A, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Effect of oxidative stress on cell wall morphology in four pathogenic *Candida* species. *Mycological Progress*. 2015;14:8
198. Ramos-e-Silva M, Lima C.M, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol*. 2012; 30(6):616-27.
199. Raposo G, Marks MS. The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic*. 2002;3:237-248.
200. Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1993;16(3):384-7.
201. Read SI, Sperling LC. Feline sporotrichosis. Transmission to man. *Arch. Dermatol*. 1982;118:429-431.
202. Renzoni A, Andrey DO, Jousselin A, Barras C, Monod A, et al. Whole Genome Sequencing and Complete Genetic Analysis Reveals Novel Pathways to Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2011;6(6):e21577.
203. Richards DM, Delacher M, Goldfarb Y, Kägebein D, Hofer AC, Abramson J, et al. Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;136:175-205.
204. Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol*. 2013;51(4):405-12.
205. Rodrigues AM, de Hoog GS, Pires de Camargo Z. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 78 (2014) 383-387
206. Roldán-Marín R, Contreras-Ruiz J, Arenas R, Vazquez-del-Mercado E, Toussaint-Caire S, Vega-Memije ME. Fixed sporotrichosis as a cause of a chronic ulcer on the knee. *Int Wound J*. 2009;6(1):63-6.
207. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11: 275-288.
208. Romero-Martínez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*. 2000;3696-3703 vol.68 No.6.
209. Rosa LH, Vieira LMA, Santiago IF, Rosa CA. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010;73:178-189.
210. Roussey JA, Olszewski MA, Osterholzer JJ. Immunoregulation in Fungal Diseases. *Microorganisms*. 2016;4:47

211. Ruiz-Baca E, Toriello C, Perez-Torres A, Sabanero-Lopez M, Villagomez-Castro JC, Lopez-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.* 2009;47(2):185-96.
212. Ruiz-Baca E, Mora-Montes HM, López-Romero E, Toriello C, Mojica-Martín V, Urtiz-Estrada N. 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106: 248-250.
213. San-Blas G, Guanipa O, Moreno B, Pekerar S, San-Blas F. *Cladosporium carrionii* and *Hormoconis resiniae* (*C. resiniae*): cell wall and melanin studies. *Curr Microbiol.* 1996;32(1):11-6.
214. Sassá MF, Saturi AE, Souza LF, Ribeiro LC, Sgarbi DB, Carlos IZ. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology.* 2009;128(2):301-9.
215. Sassá MF, Ferreira LS, Ribeiro LC, Carlos IZ. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia.* 2012;174(1):21-30.
216. Schell WA, Salkin IF, Pasarell L, McGinnis MR. *Bipolaris*, *Exophiala*, *Scedosporium*, *Sporothrix* and other dematiaceous fungi. p. 1295–1317 In Murray P. R, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. (ed.), *Manual of clinical microbiology.* 1999; 7th ed. ASM Press.
217. Schenck BR. Refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotricha. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1898; 9:286-290.
218. Schulze B, Pehler D, Eschke M, von Buttlar H, Köhler G, Sparwasser T, et al. CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells suppress fatal T helper 2 cell immunity during pulmonary fungal infection. *Eur J Immunol.* 2014;44(12):3596-604.
219. Schubach TM, Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Monteiro PC, Reis RS, Zancopé -Oliveira R M, Marzochi K B, Schubach A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol* 2001;39:147–149.
220. Schubach AO, Schubach TM, Barros MB. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. *N Engl J Med.* 2005;353(11):1185-6.
221. Schubach TM, de Oliveira Schubach A, dos Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TC, Monteiro DF, et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia.* 2002;153(2):83-6.
222. Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T, Fialho-Monteiro PC, Reis RS, Perez MA, Wanke B. 2004. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224:1623–1629.
223. Sehrawat S, Rouse BT. Interplay of Regulatory T Cell and Th17 Cells during Infectious Diseases in Humans and Animals. *Frontiers in Immunology.* 2017;8(1723–42):341
224. Shao J, Shi GX, Wang TM, Wu DQ, Wang CZ. Antiproliferation of Berberine in Combination with Fluconazole from the Perspectives of Reactive Oxygen Species, Ergosterol and Drug Efflux in a Fluconazole-Resistant *Candida tropicalis* Isolate. *Frontiers in Microbiology.* 2016;7 Article 1516.
225. Sgarbi DB, da Silva AJ, Carlos IZ, Silva CL, Angluster J, Alviano CS. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 1997;139(1):9-14.

226. Sheisa Cyléia Sargi et al. Effect of n-3 PUFA on macrophage function in PCM.
227. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2012: Vol. 107(3).
228. Shin JY, Yoon IH, Lim JH, Shin JS, Nam HY, Kim YH, Cho HS, Hong SH, Kim JS, Lee WW, Park CG. CD4+VEGFR1(HIGH) T cell as a novel Treg subset regulates inflammatory bowel disease in lymphopenic mice. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(5):592-603.
229. Slooff W, Blokziji PJ. Integrated criteria document: Toluene. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Netherlands. 1988; Report No. 758473010.
230. Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun*. 2004; 72(6):3478-88.
231. Stuart, L.M., and Ezekowitz, R.A. Phagocytosis:elegant complexity. *Immunity*. 2005;22:539–550.
232. Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev*. 1995;59:201-222.
233. Silva MB, Costa MM, Torres CC, Galhardo MC, Valle AC, Magalhães MeA, et al. [Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2012;28(10):1867-80.
234. Singer JI, Muncie JE. Sporotrichosis. Etiologic considerations and report of additional cases from New York. *New York State J Med* 1952; 52: 2147-53.
235. Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun*. 2004;72(6):3478-88.
236. Taboada J. Systemic mycoses 2000, p. 453–476 In Ettinger S, Feldman E, editors. (ed.), *Textbook of veterinary internal medicine—diseases of the dog and cat*, 5th ed., vol. 1 W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA
237. Teixeira PA, de Castro RA, Nascimento RC, Tronchin G, Torres AP, Lazéra M, de Almeida SR, Bouchara JP, Loureiro-Penha CV, Lopes-Bezerra LM. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology* 2009;155:3730–3738.
238. Téllez MD, Batista-Duharte A, Portuondo D, Quinello C, Bonne-Hernández R, Carlos IZ. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. *Microbiology*. 2014;160(Pt 11):2352-65.
239. Torres-Guerrero H, Arenas-López G. UV irradiation induced high frequency of colonial variants with altered morphology in *Sporothrix schenckii*. *Med Mycol*. 1998;36(2):81-7.
240. Tolleson WH. Human melanocyte biology, toxicology and pathology. *J Environ Sci Heal C Environ Carcinog Ecotoxicol Ver*. 2005;23:105-161.
241. Travassos LR, Lloyd KO. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol Rev*. 1980;44(4):683-721.
242. Ulfig K. The occurrence of keratinolytic fungi in the polluted environment of the Labedy District in Gliwice. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 1994; 45(4):337-46.
243. Ulfig, K, Terakowski, M, Lukasik, W. A preliminary study on the occurrence of keratinolytic fungi in the street sweepings from Chorzo´ w. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1996;47:143–149.
244. Upadhyay S, Xinping X, Lowry D, Jackson JC, Roberson RW, Xiaorong L. Subcellular Compartmentalization and Trafficking of the Biosynthetic Machinery for Fungal Melanin. *Cell Reports* 14. 2016;2511-2518.

245. US EPA. Environmental Protection Agency (EPA-510-R-96-01). How to effectively recovery free product at leaking underground stored tanks sites- a guide for states regulators. Washington, 1996; p.165
246. Valix M, Loon LO. Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals. *Minerals Engng* 2003;16:193–198.
247. van den Brink HM, et al. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol.* 1998;23(1):1-17
248. van der Meer, JR, Zehnder AJB, de Vos WM. Identification of a novel composite transposable element, TnS280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J. Bacteriol.* 1991;173:7077-7083.
249. Vásquez-del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. *Clin Dermatol.* 2012;30(4):437-43.
250. Verdan FF, Faleiros JC, Ferreira LS, Monnazzi LG, Maia DC, Tansine A, et al. Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology.* 2012;217(8):788-94.
251. Viana PG, Pereira AS, Mutis MCS, Figueiredo FB, Miranda LHM, Antonio IMC. Clinical and epidemiological aspects of the largest epidemic of sporotrichosis in dogs: 203 cases [2004±2014]. *Mycoses.* 2015;58 (Suppl.4):145.
252. Vismar HF, Hull PR. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. *Mycopathologia.* 1997;137(3):137–143.
253. Wang Y, Casadevall A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun.* 1994; 64:3004–3007
254. Weber FJ, Hage KOC, de Bont JAM. Growth of the fungus *Cladosporium sphaerospermum* with toluene as the sole carbon and energy source. *Applied and Environmental Microbiology.* 1995;3562-3566.
255. Weydert JCh., Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and Glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010; 5(1): 51–66.
256. Whibley N, Maccallum DM, Vickers MA, Zafreen S, Waldmann H, Hori S, et al. Expansion of Foxp3(+)Tcell populations by *Candida albicans* enhances both Th17cell responses and fungal dissemination after intravenous challenge. *Eur J Immunol* 2014;44(4):1069-83.
257. Wilson JT, Enfield CG, Dunlap WJ, Cosby RL, Foster DA, Baskin LB. Transport and fate of selected organic pollutants in a sandy soil. *J Environ Quality* 1981;10(4):501-506.
258. Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun.* 1998;66:1953–1961.
259. Yadav JS, Reddy CA. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 756-76
260. Yegneswaran PP, Sripathi H, Bairy I, Lonikar V, Rao R, Prabhu S. Zoonotic sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. *Int J Dermatol.* 2009;48(11):1198-200.
261. Youseff BH, Holbrook ED, Smolnycki KA, Rappleye CA. Extracellular Superoxide Dismutase Protects *Histoplasma* Yeasts Cells from Host-Derived Oxidative Stress. *PLoS Pathog* 2012;8(5).

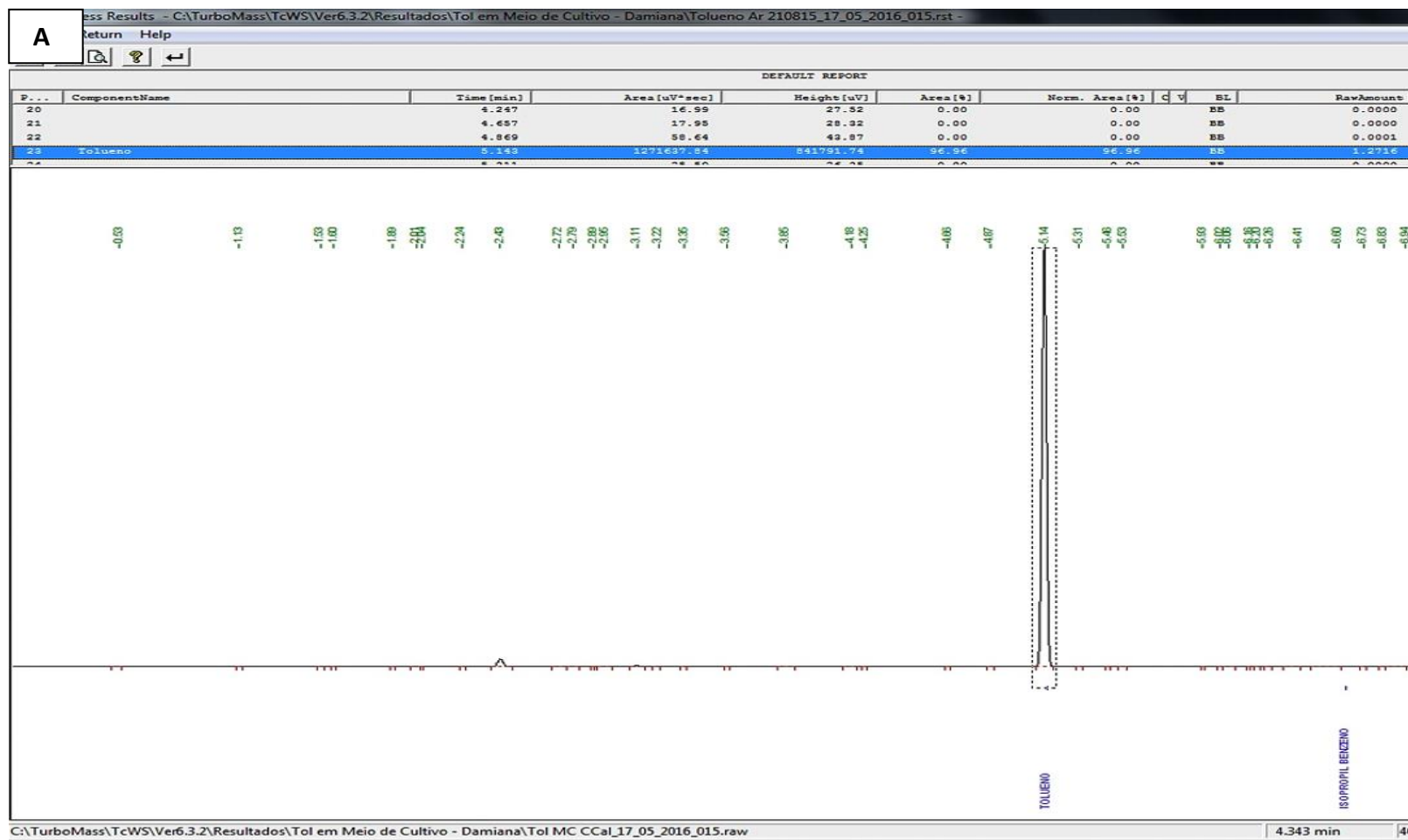
262. Zhdanova NN, Zakharchenko VA, Vember VA, Nakonechnaya LT. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycology Research*. 2000;104:1421-1426.
263. Zeyer J, Bodmer J, Hotter R. Rapid Degradation of Cyanuric Acid by *Sporothrix schenckii*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 2*, 1981; 99-110.
264. Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Dishwashers--a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol*. 2011;115(10):997-1007
265. Zhang Y, Hagen F, Stielow B, Rodrigues AM, Samerpitak K, Zhou X, et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia*. 2015;35:1-20.
266. Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, de Hood GS. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Divers* 2014;66:153–165.
267. Zhu J; Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res*. 2010;20(1):4-12.

9 APÉNDICE

Anexos

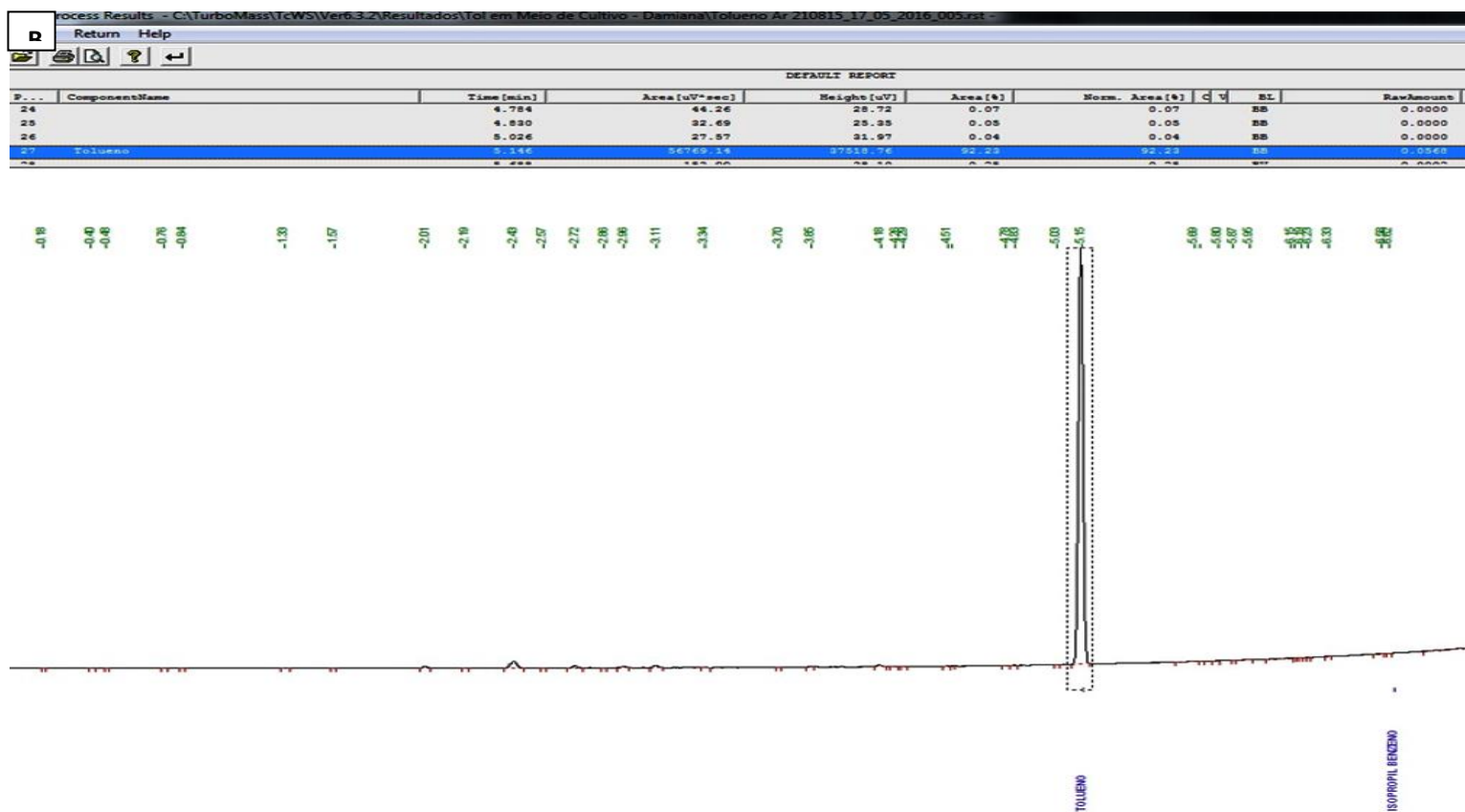
ANEXO 1

Cromatograma de tolueno obtido para a curva padrão. (A) maior concentração (172,4 µg/ml).



ANEXO 2

Cromatograma de tolueno obtido para a curva padrão. B) menor concentração (5.39 µg/ml)

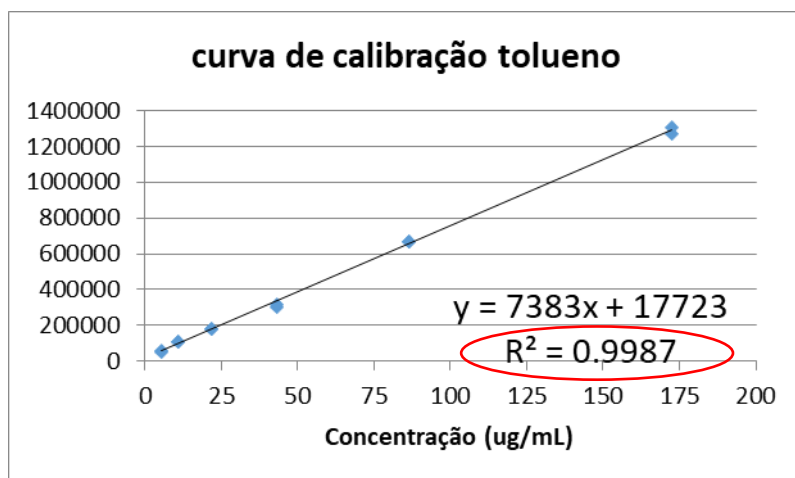


ANEXO 3

Parâmetros da curva de calibração usada para quantificar tolueno na cromatografia a gás.

Parâmetros da curva de calibração

Tempo de retenção (min)	5.14
R ²	0.9987
LD (µg/mL)	8.24
LQ (µg/mL)	24.71



10 **CAPÍTULO 2.-Artigo publicado**

Review

Sporothrix schenckii complex biology: environment and fungal pathogenicity

M. D. Téllez,^{1,2} A. Batista-Duarte,^{2,3} D. Portuondo,² C. Quinello,²
R. Bonne-Hernández⁴ and I. Z. Carlos²

Correspondence

A. Batista-Duarte
batistaduharte@gmail.com
I. Z. Carlos
carlosiz@fctfar.unesp.br

¹Faculty of Chemical Engineering, Oriente University, Ave Las Americas, Santiago de Cuba, Cuba

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, UNESP Rua Expedicionarios do Brasil 1621-CEP: 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

³Immunotoxicology Laboratory, Toxicology and Biomedicine Center (TOXIMED), Medical Science University, Autopista Nacional Km. 1 1/2 CP 90400, Santiago de Cuba, Cuba

⁴Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

Sporothrix schenckii is a complex of various species of fungus found in soils, plants, decaying vegetables and other outdoor environments. It is the aetiological agent of sporotrichosis in humans and several animals. Humans and animals can acquire the disease through traumatic inoculation of the fungus into subcutaneous tissue. Despite the importance of sporotrichosis, it being currently regarded as an emergent disease in several countries, the factors driving its increasing medical importance are still largely unknown. There have only been a few studies addressing the influence of the environment on the virulence of these pathogens. However, recent studies have demonstrated that adverse conditions in its natural habitats can trigger the expression of different virulence factors that confer survival advantages both in animal hosts and in the environment. In this review, we provide updates on the important advances in the understanding of the biology of *Spor. schenckii* and the modification of its virulence linked to demonstrated or putative environmental factors.

Received 17 June 2014

Accepted 14 August 2014

Introduction

Sporotrichosis is an acute or chronic granulomatous mycosis of humans and mammals that has a worldwide distribution. Initially the causal agent of this disease was thought to be a unique thermally dimorphic fungus, *Sporothrix schenckii*; however, it has been recently proposed, based on physiological and molecular aspects, that *Spor. schenckii* is a complex of various species (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006; Marimon *et al.*, 2007, 2008a, b; Oliveira *et al.*, 2014). Sporotrichosis was originally described in 1898 by Schenck at the Johns Hopkins Hospital in Baltimore, who recognized that the infection was most likely due to a previously undescribed fungal pathogen (Schenck, 1898). Two years later, Hektoen & Perkins (1900) confirmed these observations in a report of a second case and a detailed morphological description of the pathogen, which included studies involving laboratory animals. Other cases in the United States and Western Europe were recognized, especially in France, where large numbers of cases were reported in the early 20th century (de Beurmann & Gougerot, 1912).

Recently, *Spor. schenckii* has received particular attention due to the increased number of infections caused worldwide. The presence of the *Spor. schenckii* complex and cases of sporotrichosis have been reported from all of the continents (Madrid *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2010) and in different geographical regions, such as tropical and subtropical regions. Some areas have declared sporotrichosis an emerging health problem, with a growing interest for sanitary authorities (Feeney *et al.*, 2007; Hay & Morris-Jones, 2008; López-Romero *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013a). Sporotrichosis is now the most common subcutaneous mycosis in the Americas (especially Brazil, Mexico, Peru, Colombia and Uruguay) and also in Japan, India and South Africa (Carrada-Bravo & Olvera-Macías, 2013). A particular geographical area called Abancay, in the south central Peruvian Highlands, is considered a hyperendemic area, with an estimated incidence of approximately 50–60 cases per 100 000 inhabitants per year (Bustamante & Campos, 2001). Meanwhile in Brazil there are increasing reports of sporotrichosis in areas where the disease was rare decades ago, with an intriguing zoonotic transmission by cats (Borges *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013a, b). In Europe, sporotrichosis is less frequent, although it was a common disease in France in 1900 but declined after two decades. Currently, sporotrichosis is intermittently reported

Abbreviations: MAPK, mitogen-activated protein kinase; ROS, reactive oxygen species.

in several other countries, such as Italy, Spain, Portugal, the UK and Turkey (Gürcan *et al.*, 2007; Criseo *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2011; Ojeda *et al.*, 2011). Another interesting observation is that from the beginning of the AIDS era, new clinical forms of disseminated sporotrichosis have been reported, including cerebral, endocardial and ocular involvement (Galhardo *et al.*, 2010; Ramos-e-Silva *et al.*, 2012; Silva-Vergara *et al.*, 2012).

The presence or even an abundance of the fungus in nature is not enough to explain the development of the disease. Although the fungus is frequently isolated in environmental and commercial samples, it is unclear why sporotrichosis has a low incidence. However, the different locally emerging outbreaks reaching sometimes epidemic proportions lead to questions regarding the relevance of the host in the development of the disease (López-Romero *et al.*, 2011), the virulence associated with genetic polymorphisms in the *Spor. schenckii* complex (Sasaki *et al.*, 2014), and other environmentally associated factors not yet sufficiently studied.

The aim of this work is to provide an update on the recent advances in the understanding of the biology of the *Spor. schenckii* complex, addressing different ways through which environmental factors may modify the virulence of the fungus, as a possible contribution to the sporotrichosis outbreaks.

The *Spor. schenckii* complex and sporotrichosis

The genus *Sporothrix* is a species-rich taxon of *Ascomycetes*, which varies according to the ecological niche, frequency, distribution and virulence. Some of these fungi have the potential to survive in mammalian hosts and are able to cause damage in multiple species of animals, including humans (de Hoog, 1974; Fernandes *et al.*, 2013). *Spor. schenckii* is recognized as a cryptic species complex including *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix pallida* (formerly *Sporothrix albicans*) and *Spor. schenckii sensu stricto* (Oliveira *et al.*, 2014). *Sporothrix* species, with the exception of *Spor. pallida*, have been reported to cause sporotrichosis in humans and animals (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006; Marimon *et al.*, 2007, 2008a, b, Romeo & Criseo, 2013; Oliveira *et al.*, 2014).

The fungi belonging to the *Spor. schenckii* complex are ascomycetous dimorphic organisms (division Ascomycota, class Pyrenomycetes, order Ophiostomatales, family Ophiostomataceae), naturally found in substrates such as living and decayed vegetation, animal excreta, and soils plentiful in cellulose, with a pH range of 3.5 to 9.4, a mean temperature of 31 °C, and a relative humidity above 92%. This fungus is phenotypically characterized by the ability to produce conidia in its filamentous form, and cigar-shaped yeast-like cells when cultured at 35–37 °C or as the infectious form in animals and humans (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

Sporotrichosis affects humans and other mammals, such as cats, dogs, rats, armadillos and horses. As the fungus is

abundant in soil, wood and moss, most infections occur following minor skin trauma in people with outdoor occupations or hobbies, such as gardening, farming, hunting or other activities involving close contact with vegetation and soil. The zoonotic transition from sick or carrier animals (mainly cats) to man is gaining a growing importance. Similarly, inoculation may also occur after motor vehicle accidents and in laboratory personnel handling *Sporothrix*-infected specimens (Hay & Morris-Jones, 2008; Romeo & Criseo, 2013).

In humans, the disease has different clinical manifestations and can be classified into fixed cutaneous, lymphocutaneous, disseminated cutaneous, and extracutaneous or systemic sporotrichosis. Fixed cutaneous sporotrichosis is located in the skin and is restricted to the injury site without lymphatic involvement. Lymphocutaneous sporotrichosis is the most common manifestation and is characterized by papular and nodular superficial ulcers and/or vegetative plaque lesions in the skin and along the trajectory of the draining lymph vessels. The disseminated cutaneous form of sporotrichosis consists of multiple and distant lesions in the skin due to haematogenous dissemination or multiple inoculations of the fungus. In extracutaneous or systemic sporotrichosis, multiple cutaneous and visceral lesions involving the liver, joints, spleen, bones, bone marrow, lungs, eyes, testis and central nervous system, associated with cellular immunodeficiency have been described (Edwards *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2001; Ramos-e-Silva *et al.*, 2012). Primary pulmonary sporotrichosis is another clinical type of this infection, caused by the inhalation of infectious conidia in contaminated environments (Aung *et al.*, 2013).

The response of the *Spor. schenckii* complex to changing environmental conditions

The origin and maintenance of virulence in dimorphic fungi is enigmatic because an interaction with a mammalian host is not a requisite for fungal survival and virulence (Steenbergen *et al.*, 2004). Casadevall *et al.* (2003) called this phenomenon 'ready-made' virulence. The influence of different environmental contaminants on pathogenic or non-pathogenic fungi has been studied (Gadd, 1993; Valix *et al.*, 2001; Valix & Loon, 2003; Zafar *et al.*, 2007; Anahid *et al.*, 2011). *Spor. schenckii* complexes are present in nature in environments with diverse conditions, including polluted environments (Cooke & Foter, 1958; Dixon *et al.*, 1991; Ulfig, 1994; Ulfig *et al.*, 1996; Kacprzak & Malina, 2005; Pečiulytė, 2010; Chao *et al.*, 2012; Yazdanparast *et al.*, 2013), environments with a wide pH range from 2.2 to 12.5 (Noriega *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 2009), the floor of swimming pools (Staib & Grosse, 1983), desiccated mushroom rooms (Kazanas, 1987), fleas, ants and horse hair (Carrada-Bravo & Olvera Macías, 2013). Moreover, specific indoor environments also select for certain stress-tolerant fungi and can drive their evolution towards acquiring medically important traits (Gostinčar *et al.*, 2011).

Physical factors

Spor. schenckii is able to resist extreme conditions, such as very low temperatures for several years (Pasarell & McGinnis, 1992; Mendoza *et al.*, 2005) and extreme osmotic pressure (Castellani, 1967; de Moraes Borba *et al.*, 1992; de Capriles *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2009). Some studies have revealed that different levels of UV light exposure by *Spor. schenckii* strains resulted in a conserved viability, although with a high frequency of morphological variants, depending on the strain and UV dose. The main morphological variants had smaller colonies or altered shape. Stable and non-stable morphological variants were found in the population, and the reversion of the mutant phenotype was always to the WT phenotype (Torres-Guerrero & Arenas-López, 1998). In another study, the gamma radiation effects on the yeast cells of *Spor. schenckii* were analysed, showing that yeast cells remained viable up to 9.0 kGy, though synthetic protein metabolism was strongly affected, while at a dose of 7.0 kGy they retained viability, metabolic activity, and morphology but their capacity to produce infection was abolished (de Souza Lacerda *et al.*, 2011).

Metals

Micro-organisms, including fungi, have been shown to possess an ability to survive by adapting or mutating at high concentrations of toxic heavy metals. In general, two mechanisms have been proposed for heavy metal tolerance in fungi: (1) extracellular sequestration with chelation and cell-wall binding, mainly employed to avoid metals entering cells, and (2) intracellular physical sequestration of metals by binding to metallothioneins, sequestration as insoluble phosphates or removal from the cell via transporters such as CadA, ZntA or PbrA, preventing the damage caused by metals to sensitive cellular targets and reducing the metal burden in the cytosol (Anahid *et al.*, 2011; Jarosławiecka & Piotrowska-Seget, 2014). Most fungi synthesize siderophores, which chelate iron, which is ultimately taken up as a siderophore-iron complex (Kosman, 2003). The capacity to accumulate iron is critical for the survival of fungal pathogens in different conditions (Schaible & Kaufmann, 2004). Unlike other fungi, such as *Saccharomyces cerevisiae* (Kaplan *et al.*, 2006), *Spor. schenckii* is capable of producing its own siderophores in response to low iron availability (Pérez-Sánchez *et al.*, 2010). This mechanism can be involved in the pathogenicity and survival under conditions of environmental stress or inside the host.

Chemical contaminants

Environmental fungi can biodegrade aromatic hydrocarbons in their habitat (Cerniglia, 1997). An interesting report revealed that several fungi, including *Spor. schenckii*, were isolated from air biofilters exposed to hydrocarbon-polluted gas streams and assimilated volatile aromatic hydrocarbons as the sole source of carbon and energy. The data in this report show that many volatile-hydrocarbon-degrading

strains are closely related to, or in some cases clearly conspecific with, the very restricted number of human-pathogenic fungal species causing severe mycoses, especially neurological infections, in immunocompetent individuals (Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006). In addition, the effect of fungicides against several environmental pathogenic fungi was evaluated, and *Spor. schenckii* had greater resistance to these products than the other fungi (Morehart & Larsh, 1967).

Other micro-organisms

A phenomenon insufficiently studied is the interaction of pathogenic fungi with other micro-organisms in the neighbourhood. Chaturvedi *et al.* (1988) evaluated the *in vitro* interactions between colonies of *Blastomyces dermatitidis* and six other zoopathogenic fungi. The interactions were found to range from neutral with *Histoplasma capsulatum* and *Candida albicans* to strongly antagonistic with *Microsporium gypseum*, *Pseudallescheria boydii* and *Spor. schenckii*, and included lysis by *Cryptococcus neoformans*. In another study, *Cryp. neoformans* was shown to interact with macrophages, slime moulds and amoebae in a similar manner, suggesting that fungal pathogenic strategies may arise from environmental interactions with phagocytic micro-organisms (Steenbergen *et al.*, 2003). In another interesting report, Steenbergen *et al.* (2004) examined the interactions of three dimorphic fungi, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* and *Spor. schenckii*, with the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii*. The ingestion of the yeast by this amoeba resulted in amoeba death and fungal growth. For each fungal species, the exposure of yeast cells to amoebae resulted in an increase in hyphal cells. The biochemical events during phagocytosis by either *A. castellanii* or immune phagocytes appear similar, suggesting that the 'respiratory burst' enzyme(s) responsible for oxy-radical generation in these two cell types is structurally related (Davies *et al.*, 1991). Thus, soil amoebae may contribute to the selection and maintenance of pathogenic dimorphic fungi in the environment, conferring these microbes with the capacity for virulence in mammals.

Despite the necessity for more studies evaluating the influence of different environmental factors on the physiology and pathogenicity of the *Spor. schenckii* complex, all the available data suggest that the strategies that pathogenic fungi acquire to survive this environmental competition may, in turn, provide the ability to infect animals and may further allow the emergence of opportunistic pathogens from these microenvironments (Baumgardner, 2012) (Fig. 1).

Fungal elements involved in environmental resistance and pathogenicity

Although it is known that many external influences can affect the pathogenicity of the *Spor. schenckii* complex as environmental pathogenic fungi, these influences and mechanisms have not been sufficiently studied for this

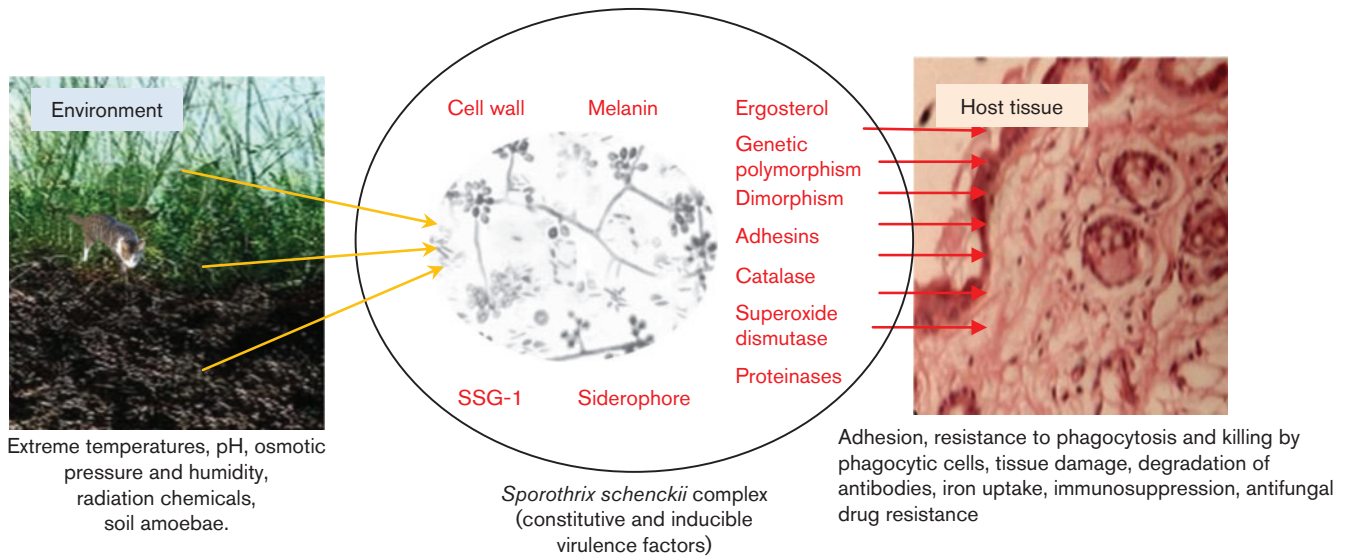


Fig. 1. Environmental stressors promote *Spor. schenckii* virulence. The origin of virulence in *Spor. schenckii* should be related to interactions of the pathogen with different environmental challenges present in their natural habitat. These adaptive changes permit survival capacity to be acquired, tending to higher virulence.

complex. However, the presence of the same molecules interacting with environmental toxins as described in other fungi (Casadevall *et al.*, 2003) is a good reason to hypothesize that similar mechanisms may be acting in order to face these extreme conditions. As Casadevall *et al.* (2003) reported for *Cryp. neoformans*, several virulence factors in *Spor. schenckii* also appear to have ‘dual use’ capabilities for the survival in both animal hosts and the environment (Table 1).

Dimorphism

The dimorphic fungi comprise a group of important human pathogens and represent a family of seven phylogenetically related ascomycetes that include *B. dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *H. capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* and *Spor. schenckii*. These fungi possess the unique ability to switch between mould and yeast in response to thermal stimuli and other environmental conditions. In the environment, they grow as mould that produces conidia or infectious spores, which, when transmitted to humans or other susceptible mammalian hosts, are capable of converting to pathogenic yeasts that cause serious infection (Klein & Tebbets, 2007).

The dimorphism in the *Spor. schenckii* complex has also been associated with the ability to adapt to environmental changes and to yield an increased virulence (Nemecek *et al.*, 2006; Gauthier & Klein, 2008). This fungus exhibits mycelium morphology in its saprophytic phase at 25 °C in laboratory conditions and yeast morphology in host tissues at 35–37 °C. On the other hand, in an environment with varying temperature they are able to keep the mycelial form. The formation of yeast cells was thought to be a requisite for the

pathogenicity of *Spor. schenckii*; however, the mechanisms that regulate the dimorphic switch remain unclear. Some recent findings have begun to clarify these mechanisms.

The principal intracellular receptors of environmental signals are the heterotrimeric G proteins, and they are involved in fungal dimorphism and pathogenicity. Valentín-Berríos *et al.* (2009) described a new G protein α -subunit gene in *Spor. schenckii*: *ssg-2*, and demonstrated that the SSG-2 G α -subunit of 40.90 kDa interacts with the cytosolic phospholipase A₂, participating in the control of the dimorphism in this fungus.

The yeast-to-mycelium transition is dependent on calcium uptake (Serrano & Rodríguez-del Valle, 1990; Rivera-Rodríguez & Rodríguez-del Valle, 1992). In *Spor. schenckii*, a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) encoded by the calcium/calmodulin kinase I (*sscmk1*) gene (GenBank accession no. AY823266) was described (Valle-Aviles *et al.*, 2007). Experiments using different inhibitors of the CaMK pathway showed that they inhibited the transition from yeast cells to hyphae, which suggests a calcium/calmodulin pathway is involved in the regulation of the dimorphism in *Spor. schenckii* (Valle-Aviles *et al.*, 2007). Similarly, RNAi technology was used to silence the expression of the *sscmk1* gene. The RNAi transformants were unable to grow as yeast cells at 35 °C and showed a decreased tolerance to this temperature (Rodríguez-Caban *et al.*, 2011).

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade and cAMP signalling pathways are known to be involved in fungal morphogenesis and pathogenic development. The MAPK and cAMP pathways are both activated by an upstream branch, two-component histidine protein kinase

Table 1. Some attributes of *Spor. schenckii* complex with demonstrated or putative effects in the protection against environmental stressors and as virulence factor in the host (dual use)

Attribute	Function		Selected references
	In the environment	In the host	
Cell wall	Protects cell from drastic changes in external environment	Protects cell from aggressive conditions in host tissue	Oda <i>et al.</i> (1983), Carlos <i>et al.</i> (2003), Madrid <i>et al.</i> (2010), López-Esparza <i>et al.</i> (2013)
Melanin	UV shielding, extreme temperature protection, reduced susceptibility to enzymic degradation	Resistance to phagocytosis and oxidative killing by phagocytic cells; antifungal drug resistance	Almeida-Paes <i>et al.</i> (2009), Romero-Martinez <i>et al.</i> (2000), Morris-Jones <i>et al.</i> (2003)
Ergosterol	Protection against oxidative killing by soil amoebae?	Protection against oxidative killing by phagocytic cells	Sgarbi <i>et al.</i> (1997)
Dimorphism	Mycelium morphology in its saprophytic phase	Yeast morphology in host tissues at 35–37 °C	Nemecek <i>et al.</i> (2006), Gauthier & Klein (2008)
Genetic polymorphism	Generation of strain diversity to survive environmental stress?	Antifungal drug resistance; different virulence profile	Romeo & Criseo (2013)
Adhesins	In other fungi, adhesion genes are activated by diverse environmental triggers like carbon and/or nitrogen starvation, changes in pH or ethanol levels	Adhesion to the dermal and subendothelial matrix; migration across the endothelial barrier; immunomodulators	Verstrepen <i>et al.</i> (2003), Sampermans <i>et al.</i> (2005), Figueiredo <i>et al.</i> (2007), Lima <i>et al.</i> , (1999, 2001, 2004), Ruiz-Baca <i>et al.</i> (2009), Nascimento <i>et al.</i> (2008), Teixeira <i>et al.</i> , 2009
Proteinase	Nutritional function	Tissue damage; degradation of antibodies	Da Rosa <i>et al.</i> (2009), Monod <i>et al.</i> (2002)
Catalase	Protection against ROS of soil amoebae?	Protection against ROS of host phagocytes	Davies <i>et al.</i> (1991), Wang <i>et al.</i> (2008)
Superoxide dismutase	Protection against oxygen-derived oxidants?	Intracellular growth	Pérez-Sánchez <i>et al.</i> (2010)
Nitroreductase	Tolerance of environmental contaminants?	Resistance to NO in phagocytes?	Stopiglia <i>et al.</i> (2013), Aviv <i>et al.</i> (2014)
Siderophores	Iron uptake in the environment	Iron uptake inside host	Pérez-Sánchez <i>et al.</i> (2010)
SSG-1	Survival under conditions of stress and nutrient limitation		Pérez-Sánchez <i>et al.</i> (2010)

(HPK) phospho-relay system (Hou *et al.*, 2013). Nemecek *et al.* (2006) reported that a long-sought regulator controls the switch from a non-pathogenic mould form to a pathogenic yeast form in dimorphic fungi. They found that DRK1, a hybrid dimorphism-regulating histidine kinase, functions as a global regulator of the dimorphism and virulence in *B. dermatitidis* and *H. capsulatum* and is required for the phase transition from mould to yeast, expression of virulence genes, and pathogenicity *in vivo*. More recently, Hou *et al.* (2013) developed molecular cloning, characterization and differential expression of DRK1 in *Spor. schenckii*. In this report, quantitative real-time reverse transcriptase PCR revealed that SsDRK1 was more highly expressed in the yeast stage than in the mycelial stage, which indicated that SsDRK1 may be involved in the dimorphic switch in *Spor. schenckii*.

Zhang *et al.* (2013) reported other proteins involved in the dimorphism process. The Ste20-related kinases are involved in signalling through the MAPK pathways and in morphogenesis through the regulation of cytokinesis and actin-dependent polarized growth. The expression of other proteins that may affect biosynthetic and metabolic

processes, such as Cullin-3, CdcH and 4-coumarate-CoA ligase, was found by Zhang's group. The expression of the genes for these proteins was detected predominantly in the yeast form because this is the form of *Spor. schenckii* found in the host; the expression of these genes could reflect the ability of the yeast phase to adapt to growth-limiting environments. This group also demonstrated an upregulation of the Hsp70 chaperone Hsp88 in the development of the yeast phase of *Spor. schenckii* at 37 °C; however, the precise role the *hsp88* gene remains unclear (Zhang *et al.*, 2012).

Lipids are thought to play important roles in the regulation of the dimorphism and virulence in pathogenic fungi. Generally, the ratio of phospholipid/ergosterol is less than 1 in the yeast form and 2–20 in the mycelial form cells in *Cand. albicans* and *Spor. schenckii*. During the transition from the yeast to mycelial form, phosphatidylinositol and phosphatidylserine are reduced in amount, whereas phosphatidylcholine increases. Phospholipase D is activated during this transition (Kitajima, 2000).

Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), a tumour-promoting agent and protein kinase C (PKC) activator, was

found to stimulate, in a concentration-dependent manner, germ tube formation and germ tube growth by yeast cells induced to undergo a transition to the mycelium form. PMA also had a stimulatory effect on DNA and RNA synthesis in cells induced to undergo the yeast-to-mycelium transition and was found to inhibit cell duplication and bud formation in yeast cells induced to re-enter the budding cycle. In contrast, polymyxin B, an inhibitor of PKC, inhibited germ tube formation by yeast cells. This inhibition could be overcome if PMA or calcium was added to the medium, suggesting that the inhibition obtained in the presence of this antibiotic was due to the inhibition of PKC. These results support the involvement of PKC in the control of the dimorphic expression in *Spor. schenckii* (Colon-Colon & Rodriguez-del Valle, 1993).

Genetic polymorphism

Recently, there has been an increasing interest in studying the biology of the *Spor. schenckii* complex, and particular attention has been focused on its molecular phylogeny, which has improved our knowledge of the taxonomy, pathogenic characteristics and the epidemiology of this pathogenic fungus. Recent studies have shown important differences in the virulence and drug resistance profiles among different species in the *Spor. schenckii* complex. *Spor. brasiliensis* is the most virulent species in comparison with *Spor. globosa* and *Spor. mexicana*, which show little or no virulence in murine models (Fernández-Silva *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2013). In addition, the test for susceptibility to antifungal drugs showed that *Spor. schenckii sensu stricto* and *Spor. brasiliensis* were highly susceptible to most of the antifungals tested *in vitro* in comparison with the more resistant *Spor. globosa* and *Spor. mexicana* species (Marimon *et al.*, 2008a, b). These and other observations suggest that possible genetic differences may be involved.

The genomic organization and chromosome number in different species in the *Spor. schenckii* complex remain unknown. However, sequencing studies in the calmodulin-encoding gene in the different members of the *Spor. schenckii* complex have offered valuable information for elucidating the relationships and differences among these species and their role in pathogenic manifestations (Romeo *et al.*, 2011). A recent study revealed a high diversity in the calmodulin gene (regulated by Ca^{2+}) of *Spor. schenckii*. In contrast, *Spor. brasiliensis* and *Spor. globosa* appeared to be more homogeneous, with a low genetic diversity. The electrophoretic karyotype profiles of *Spor. brasiliensis* isolates showed less variability than those observed in *Spor. schenckii sensu strictu* isolates (Sasaki *et al.*, 2014). These results were consistent with the phylogenetic data, which showed the variability among isolates within the species was less frequent in *Spor. brasiliensis* than in *Spor. schenckii sensu strictu* (Marimon *et al.*, 2006, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013a, b).

Future studies are necessary to determine the role of different genes from the species of the *Spor. schenckii*

complex in virulence, drug resistance and environmental resistance. Changes in the expression of such genes might be beneficial to *Spor. schenckii* survival in the natural environment and also within a host during infection. Comparative genomics and transcriptomics analysis between highly pathogenic *Sporothrix* species and species with reduced or absent pathogenicity certainly will accelerate the discovery of new proteins for diagnostics, drug targets and vaccines (Romeo & Criseo, 2013).

Cell wall

The fungal wall protects the cell from drastic changes in the external environment; it is the first point of contact with the host (Mora-Montes *et al.*, 2009). The *Spor. schenckii* cell wall is composed of glucans, galactomannans, rhamnomannans, chitin, glycoproteins, glycolipids and melanin (Travassos *et al.*, 1977; Travassos & Lloyd, 1980; Lopes-Bezerra *et al.*, 2006; López-Romero *et al.*, 2011). Despite the need for more studies in order to know the detailed structure, it seems that a proper cell wall composition is required for supporting external stress and for virulence (Madrid *et al.*, 2010; López-Esparza *et al.*, 2013).

Melanin

An interesting mechanism to resist adverse environmental conditions is the production of melanin, also implicated in the pathogenesis of several important human fungal pathogens. Several types of melanin have been described in the fungal kingdom but the majority are derived from 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN) and known as DHN-melanin (Eisenman & Casadevall, 2012). Melanin has been referred to as 'fungal armour' owing to the ability of the polymer to protect micro-organisms against a broad range of toxic insults, warranting the survival of fungi in the environment and during infection (Gómez & Nosanchuk, 2003). Melanization reduces the susceptibility to enzymic degradation, the toxicity of heavy metals, UV and nuclear radiation, extremes of temperature, and oxygen and nitrogen free radicals, which may afford the fungus protection against similar insults in the environment (Wang & Casadevall, 1994a, b; Rosas & Casadevall, 1997, 2001; Taborda *et al.*, 2008; Gessler *et al.*, 2014). Melanin also reduces the susceptibilities of pathogenic fungi to different antifungal drugs (van Duin *et al.*, 2002; Nosanchuk & Casadevall, 2006) and to different immune mechanisms in the host, especially phagocytosis (Steenbergen *et al.*, 2004).

Spor. schenckii produces melanin or melanin-like compounds *in vitro*. While melanin is an important virulence factor in other pathogenic fungi, this pigment also has a similar role in the pathogenesis of sporotrichosis (Morris-Jones *et al.*, 2003). Melanized cells of WT *Spor. schenckii* and the albino grown on scytalone-amended medium were less susceptible to killing by chemically generated oxygen- and nitrogen-derived radicals and by UV light than were the conidia of mutant strains. WT melanized conidia and the scytalone-treated albino were also more resistant to

phagocytosis and killing by human monocytes and murine macrophages than were the unmelanized conidia of two mutants (Romero-Martinez *et al.*, 2000). Similar to *Cryp. neoformans* and *Para. brasiliensis*, *Spor. schenckii* can utilize phenolic compounds to augment melanin production, which may be associated with a concomitant increase in the protection against unfavourable conditions both in the environment and during infection (Almeida-Paes *et al.*, 2009).

The expression of adhesins

The adhesion ability of a fungus is important in the colonization of different environmental extracts, and in the host it is essential for colonization and the establishment of infection. Specific microbial adhesins mediate adherence to host tissues by participating in sophisticated interactions with some of the host proteins that compose the extracellular matrix (Teixeira *et al.*, 2009). The adhesin-encoding genes are not constitutively expressed. Instead, adhesin is under tight transcriptional control by several interacting regulatory pathways. The switch from non-adherence to adherence may allow yeasts to adapt to stress (Verstrepen & Klis, 2006). The adhesin genes are activated by diverse environmental triggers such as carbon and/or nitrogen starvation, changes in pH or ethanol levels (Verstrepen *et al.*, 2003; Sampermans *et al.*, 2005). Fungi need to adhere to the appropriate host tissues to establish an infection site. Apart from being a stress-defence mechanism, adhesion is also crucial for fungal pathogenesis (Verstrepen & Klis, 2006).

The outermost layer of the cell wall of *Spor. schenckii* has molecules involved in the adhesion of the fungus to host tissues and has a central role in host-pathogen interactions, mediating several interactions associated with the pathogenic processes of this micro-organism. It has been reported that *Spor. schenckii* adheres to fibronectin and laminin in soluble and immobilized forms (Lima *et al.*, 1999, 2001, 2004) and that this is a key step for migration across the endothelial barrier (Figueiredo *et al.*, 2007). Independently, Ruiz-Baca *et al.* (2009) and Nascimento *et al.* (2008) characterized a 70 kDa glycoprotein (gp70) on the cell wall of *Spor. schenckii* that mediates the adhesion of the fungus to the dermal and subendothelial matrix. This gp70 and another protein with a slightly lower molecular mass (67 kDa) were detected from different isolates. This variation might be related to differences in glycosylation (Teixeira *et al.*, 2009). Interestingly, sera obtained from patients with sporotrichosis reacted mainly with the 40 and 70 kDa antigens (Scott & Muchmore, 1989; Alves *et al.*, 1994). In addition, hyperimmune sera of mice infected with *Spor. schenckii* reacted with gp 70 (Nascimento & Almeida, 2005), and monoclonal antibodies specific for gp70 were protective against experimental infection (Nascimento *et al.*, 2008). Moreover, recently Lopes-Bezerra's group reported that a reduced level of gp70 expression was found in virulent *Spor. brasiliensis* and *Spor. schenckii* strains, while high expression of this molecule is associated with a

lower virulence profile of the strains. This is further evidence that this antigen induces a protective host response (Castro *et al.*, 2013).

In another pathogenic micro-organism, *Staphylococcus aureus*, many molecules involved in adhesion are also involved in different immune evasion mechanisms, not related to the specific process of adhesion (Zecconi & Scali, 2013). However, in the case of the *Spor. schenckii* complex, the role of adhesins as immune evasion factors is unknown.

Enzyme production

The Pires de Camargo group studied the different enzymic activities related to fungal virulence of 151 Brazilian *Spor. schenckii* isolates from five different geographical regions of Brazil. All (100%) of the *Spor. schenckii* isolates presented urease and DNase activities. Only three (15.78%) isolates (one from the north and two from the south-east region) showed gelatinase activity, and five (26.31%) isolates (one from the north, three from the north-east, and one from the south-east region) showed proteinase activities, of 0.68, 0.88, 0.85, 0.55 and 0.78, respectively. Additionally, only four (21.05%) isolates (one from the north, one from the central west, and two from the south-east region) showed caseinase activities, of 0.75, 0.87, 0.89 and 0.87, respectively (Ferreira *et al.*, 2009). Another report of isolates from Venezuela confirmed the urease activity (Mendoza *et al.*, 2005), while another study in India reported that all of the mycelial forms of *Spor. schenckii* could split urea (Ghosh *et al.*, 2002).

However, Fernandes *et al.*, from the same Pires de Camargo group, also found that while the 'highly virulent' *Spor. schenckii* isolates show a profile of secreted enzymes (proteinase, caseinase, gelatinase, DNase and urease), most of these enzymes were not observed in the hypervirulent species *Spor. brasiliensis* (Fernandes *et al.*, 2009). This observation indicates that the mechanisms promoting pathogenesis are much more complex, and perhaps not conserved among closely related *Sporothrix* species, and they most likely involve different virulence factors to evade the host immune system (Romeo & Criseo, 2013).

An interesting enzyme present in the *Spor. schenckii* complex is the nitroreductase, a member of a group of enzymes that reduces the wide range of nitroaromatic compounds, which has potential industrial applications (Stopiglia *et al.*, 2013). Nitroreductase activity has been detected in a diverse range of bacteria and in yeast (Xu *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Aviv *et al.*, 2014). A recent study in an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain demonstrated that the fixation of adaptive mutations in the DNA gyrase (*gyrA*) and nitroreductase (*nfsA*) genes confers resistance to quinolones and nitrofurans, and contributes to stress tolerance and pathogenicity of this bacterium (Aviv *et al.*, 2014). The possible role of the nitroreductase in *Spor. schenckii* tolerance of adverse conditions in the environment and in the host, in the resistance to oxidative

stress and to antifungal drugs, and in other aspects involved in the pathogenesis needs to be studied.

Additionally, the recent finding in *Spor. schenckii* of intracellular molecules and signals associated with the heterotrimeric G protein α -subunit SSG-1, involved in the response to different external adverse conditions, helps to explain how this fungus is able to survive under external stress (environmental and inside the host) (Valentín-Berrios *et al.*, 2009; Pérez-Sánchez *et al.*, 2010).

Infections of an alternative host

Sporotrichosis is a human mycosis; however, there is an alarming increase in the frequency of infections in domestic animals, principally in cats, which has led to an increase in the relevant importance from an epidemiological perspective (Reed *et al.*, 1993; Smilack, 1993; De Lima *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2008; Lloret *et al.*, 2013). Its ease of transmission to cohabitant humans and other animals, especially by bites and scratches, makes it a significant zoonosis (Read & Sperling, 1982; Nusbaum *et al.*, 1983; Dunstan *et al.*, 1986). Cats develop disseminated skin ulcers, with often fatal infection (Lloret *et al.*, 2013). The fungus is spread from an ulcer or from bites and scratches. The propensity of cats to transmit the infection to humans may be attributable to the large number of organisms associated with the lesions in most infected cats (Yegneswaran *et al.*, 2009).

However, there are reports of the presence of *Spor. schenckii* in samples from the nails of apparently healthy domestic cats (Schubach *et al.*, 2001, 2002). The cat's habits of digging holes and covering its excrement with soil and sand, and sharpening its nails on wood including tree trunks, are most likely responsible for the carriage of the fungus on its nails and claws, even as healthy carrier (Carrada-Bravo & Olvera Macías, 2013). Healthy carriers can be important in the dissemination of the fungus and the occurrence of sporotrichosis cases when the conditions are favourable. Human infections have also been associated with insect stings, fish handling, and bites or scratches from birds, dogs, squirrels, horses, reptiles, parrots and rodents, even though clinical symptoms may not be present in these animals (Werner & Werner, 1994; Kauffman, 1999; Liu & Lin, 2001; Ranjana *et al.*, 2001; Haddad *et al.*, 2002a b; Barros *et al.*, 2011; Carrada-Bravo & Olvera-Macías, 2013).

The ability to escape from host immune mechanisms

Members of the *Spor. schenckii* complex are able to produce localized infections in immunocompetent hosts. They have developed different mechanisms permitting the evasion of host immunological mechanisms.

Phagocytosis inhibition

It has long been reported that phagocytosis is an important defence mechanism against *Spor. schenckii* (Cunningham

et al., 1979; Oda *et al.*, 1983). The recognition of the fungus is mediated by molecules such as Toll-like receptors (TLRs): TLR2 (Negrini *et al.*, 2013, 2014), TLR4 (Sassá *et al.*, 2012) and carbohydrate receptors (Guzman-Beltran *et al.*, 2012). Sialic acid residues are expressed at the cell surface of *Spor. schenckii* (Alviano *et al.*, 1982). These residues protect unopsonized fungal cells from phagocytosis by resident mouse peritoneal macrophages. The enzymic removal of sialic acids from the external layers of *Spor. schenckii* envelopes renders the yeast cells more susceptible to phagocytosis (Oda *et al.*, 1983; Alviano *et al.*, 1999). Other *in vitro* studies have shown that galactomannan, rhamnmannan and a lipid extract purified from the fungal cell wall are able to inhibit the phagocytosis of *Spor. schenckii* yeast by peritoneal macrophages (Carlos *et al.*, 2003).

Several processes associated with phagocytosis, such as the cytotoxicity mediated by reactive oxygen and nitrogen species (ROS and NO), are involved in the destruction of invading organisms, and their virulence may be related to a differential susceptibility to these mediators (Carlos *et al.*, 2009; Sassá *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008). A study demonstrated that the *Spor. schenckii* catalase is involved in the defence against the ROS induced by environmental changes *in vitro*, and the authors proposed that catalase, as a main component of antioxidant defence, may contribute to the survival of *Spor. schenckii* during infection (Wang *et al.*, 2008). Moreover, it is known that ergosterol is the major sterol observed in fungal membranes (Weete, 1989), while ergosterol peroxide, the putative product of the H₂O₂-dependent enzymic oxidation of ergosterol (Bates *et al.*, 1976), is a constituent of the membrane of *Spor. schenckii*, where it could inactivate or scavenge toxic oxygen products that are formed in phagocytic cells (Basaga, 1990; da Graça Sgarbi *et al.*, 1997). It is conceivable that in *Spor. schenckii* ergosterol peroxide is formed as a protective mechanism to evade ROS during phagocytosis (Sgarbi *et al.*, 1997).

Carlos *et al.* (2003) studied the effect of three different components of the *Spor. schenckii* wall cell (a lipid extract, exo-antigens and the alkali-insoluble fraction) and observed a drastic inhibition of the phagocytosis of yeast in murine peritoneal macrophages previously treated with a lipid extract. This inhibitory effect was associated with a high production of TNF- α and nitric oxide (NO). Studies performed in our laboratory demonstrated a high fungal burden in a murine model of *Spor. schenckii* infection during the second and fourth week after a previous high production of NO (unpublished data). Similarly, Niedbala *et al.* (2007, 2011) reported that NO induces a population of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ regulatory T-cells (NO-Tregs) that suppress the functions of CD4⁺CD25⁻ effector T-cells *in vitro* and *in vivo*. The helper 17 (Th17) cells are important in antifungal mechanisms (Hernández-Santos & Gaffen, 2012). Interestingly, recently it was discovered that NO-Tregs suppressed Th17 but not Th1 cell differentiation and function, suggesting a differential suppressive function between NO-Tregs and natural Tregs (nTregs) (Niedbala

et al., 2013). In addition, severe infection promotes the release of pro-inflammatory mediators, including TNF- α and NO, with the subsequent induction of molecules, such as IL-10, FasL and CTLA-4, which lead to the suppression of the T-cell response (Fernandes *et al.*, 2008).

Production of proteases

Many species of human pathogenic fungi secrete proteases. Fungal proteases have been intensively investigated as potential virulence factors. It is evident that secreted proteases are important for the virulence of dermatophytes because these fungi grow exclusively in the stratum corneum, nails and hair, which constitute their sole nitrogen and carbon sources (Monod *et al.*, 2002). The proteases secreted by *Cand. albicans* are involved in the adherence process and penetration of tissues and in interactions with the immune system, thereby stimulating inflammatory process in the infected host (Pietrella *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). *Spor. schenckii* produces proteases that are able to cleave different subclasses of human IgG, suggesting a sequential production of antigens and molecules that could interact and interfere with the immune response of the host (Da Rosa *et al.*, 2009). Other effects of proteases secreted by *Spor. schenckii* are being investigated.

Transitory early immunosuppression

Different reports derived from mouse models of infections with *Spor. schenckii* reveal a transitory early immunosuppression, favouring a fungal burden. Studies performed by Carlos *et al.* demonstrated the production of interleukin-1 (IL-1) and TNF by adherent peritoneal cells from BALB/c mice, which was measured at weeks 2, 4, 6, 8 and 10 after intravenous inoculation with *Spor. schenckii* yeast. Compared with age-matched controls, IL-1 and TNF production by adherent peritoneal cells from *Spor. schenckii*-infected mice was reduced severely at weeks 4 and 6 of infection and was greater than normal at weeks 8 and 10. Moreover, between weeks 4 and 6 of infection, there was a depression of the delayed-type hypersensitivity response to a specific whole soluble antigen and an increase in fungal multiplication in the livers and spleens of the infected mice. Thus, the deficits of cell-mediated immunity in mice with systemic *Spor. schenckii* infection may derive, in part, from an impaired amplification of the immune response due to the abnormal generation of IL-1 and TNF (Carlos *et al.*, 1994). Other reports have demonstrated that, although NO is an essential mediator in the *in vitro* killing of *Spor. schenckii* by macrophages, the activation of the NO system *in vivo* contributes to the immunosuppression and cytokine balance during the early phases of infection with *Spor. schenckii* (Fernandes *et al.*, 2008).

The liberation of exo-antigen

A peptide-polysaccharide released from the fungal cell wall, called exo-antigen (ExoAg), has been identified as an

important virulence factor for sporotrichosis (Nascimento *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009). The main immunogenic proteins of the cell wall (gp70 and gp40) are present in the ExoAg, and it is thought that the secretion of this outer component can distract several immune mechanisms and serve as a fungal evasion mechanism (Carlos *et al.*, 2009). This hypothesis needs to be confirmed.

Opportunistic infections in immunodeficient hosts

Infection with *Spor. schenckii* causes a localized lymphocutaneous disease in the immunocompetent host, while it frequently results in disseminated disease in the immunocompromised patient. Disseminated sporotrichosis occurs in individuals with impaired cellular immunity, such as in cases of neoplasia, transplantation, diabetes, and especially AIDS (Wroblewska *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2012; Silva-Vergara *et al.*, 2012). The extracutaneous forms of sporotrichosis without skin manifestations and with no previous history of traumatic injuries have been described in renal transplant recipients not treated with antifungal prophylaxis (Gewehr *et al.*, 2013). Additionally, this disease has been described in a patient with X-linked chronic granulomatous disease (Trotter *et al.*, 2014). Interestingly, more than 20 cases of sporotrichosis meningitis have been reported, several of which were associated with immunosuppression (Silva-Vergara *et al.*, 2005; Vilela *et al.*, 2007; Galhardo *et al.*, 2010).

Concluding remarks and future perspectives

The vast majority of human pathogenic fungi are environmental fungi, which normally live outside the human body and can cause infections in certain susceptible hosts. These fungi have most likely gained their pathogenic potential in environmental niches, which in certain aspects resemble the host body. In these environmental niches, fungi acquire the capacity to adhere to surfaces, form biofilms, compete with bacteria, acquire all necessary nutrients and deal with changes in temperature, UV radiation, pH, osmolarity, environmental chemical contaminants, meteorological factors and other physical, chemical and biological stress factors. In addition, these fungi may be challenged by amoebae, which share many characteristics with human phagocytes (Davies *et al.*, 1991). Thus, in nature or in animal hosts, fungal cells must respond efficiently to changing environmental conditions in order to survive (Pérez-Sánchez *et al.*, 2010).

The *Spor. schenckii* complex uses signal transduction pathways to sense the environment and to adapt quickly to changing conditions (Rodríguez-Caban *et al.*, 2011). Despite these findings, little is known about the genetic mechanisms of virulence and drug resistance in the *Spor. schenckii* complex. The ecological niches occupied by the *Spor. schenckii* complex are extraordinarily complex and variable and most likely include biological elements, such as other fungi, viruses, bacteria, animals, protists, algae and

plants, together with physical (e.g. temperature, humidity, radiation) and chemical (pH, metals, hydrocarbons, pesticides, etc.) components.

The chronic effect of some of these components, including heavy metals, UV radiation and pesticides, with immunotoxic effects in potential hosts such as cats and other animals and outdoor workers such as farmers and gardeners, can contribute to the occurrence of fungal infection. The understanding of the interactions between fungi and their potential hosts in the environment is in its infancy; however, initial observations suggest that this will be an extremely rich area of investigation for exploring the fundamental questions of fungal pathogenesis (Casadevall *et al.*, 2003; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2006). This knowledge will contribute to the design of new strategies for the control of sporotrichosis.

Acknowledgement

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil): Foreigner Visiting Professor Program (Grant 07610130) and PhD Grant, and the Bioscience and Biotechnology Applied to Pharmacy Pos-graduate Program from Pharmaceutical Sciences Faculty, UNESP, Araraquara, SP, Brazil. The authors declare that they have no competing interests. The authors are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Almeida-Paes, R., Frases, S., Fialho Monteiro, P. C., Gutierrez-Galhardo, M. C., Zancopé-Oliveira, R. M. & Nosanchuk, J. D. (2009). Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect* **11**, 554–562.
- Alves, L. L., Travassos, L. R., Previato, J. O. & Mendonça-Previato, L. (1994). Novel antigenic determinants from peptidoglycan components of *Sporothrix schenckii*. *Glycobiology* **4**, 281–288.
- Alviano, C. S., Pereira, M. E. A., Souza, W., Oda, L. M. & Travassos, L. R. (1982). Sialic acids are surface components of *Sporothrix schenckii* yeast forms. *FEMS Microbiol Lett* **15**, 223–228.
- Alviano, C. S., Travassos, L. R. & Schauer, R. (1999). Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconj J* **16**, 545–554.
- Anahid, S., Yaghmaei, S. & Ghobadinejad, Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica* **18**, 502–508.
- Aung, A. K., Teh, B. M., McGrath, C. & Thompson, P. J. (2013). Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. *Med Mycol* **51**, 534–544.
- Aviv, G., Tsyba, K., Steck, N., Salmon-Divon, M., Cornelius, A., Rahav, G., Grassl, G. A. & Gal-Mor, O. (2014). A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environ Microbiol* **16**, 977–994.
- Basaga, H. S. (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* **68**, 989–998.
- Bates, M. L., Reid, W. W. & White, J. D. (1976). Duality of pathways in the oxidation of ergosterol to its peroxide *in vivo*. *J Chem Soc Chem Commun* **44**–45.
- Baumgardner, D. J. (2012). Soil-related bacterial and fungal infections. *J Am Board Family Med* **25**, 734–744.
- Borges, T. S., Rossi, C. N., Fedullo, J. D., Taborda, C. P. & Larsson, C. E. (2013). Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of domestic cats (indoor and outdoor) and in captivity in São Paulo (Brazil). *Mycopathologia* **176**, 129–137.
- Bustamante, B. & Campos, P. E. (2001). Endemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* **14**, 145–149.
- Carlos, I. Z., Zini, M. M., Sgarbi, D. B., Angluster, J., Alviano, C. S. & Silva, C. L. (1994). Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia* **127**, 189–194.
- Carlos, I. Z., Sgarbi, D. B., Santos, G. C. & Placeres, M. C. (2003). *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Scand J Immunol* **57**, 214–220.
- Carlos, I. Z., Sassá, M. F., da Graça Sgarbi, D. B., Placeres, M. C. & Maia, D. C. (2009). Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia* **168**, 1–10.
- Carrada-Bravo, T. & Olvera-Macias, M. I. (2013). New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Rev Latinoamer Patol Clin* **60**, 5–24.
- Casadevall, A., Steenbergen, J. N. & Nosanchuk, J. D. (2003). ‘Ready made’ virulence and ‘dual use’ virulence factors in pathogenic environmental fungi – the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* **6**, 332–337.
- Castellani, A. (1967). Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg* **70**, 181–184.
- Castro, R. A., Kubitschek-Barreira, P. H., Teixeira, P. A., Sanches, G. F., Teixeira, M. M., Quintella, L. P., Almeida, S. R., Costa, R. O., Camargo, Z. P. & other authors (2013). Differences in cell morphology, cell wall topography and gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. *PLoS ONE* **8**, e75656.
- Cerniglia, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**, 324–333.
- Chao, H. J., Chan, C. C., Rao, C. Y., Lee, C. T., Chuang, Y. C., Chiu, Y. H., Hsu, H. H. & Wu, Y. H. (2012). The effects of transported Asian dust on the composition and concentration of ambient fungi in Taiwan. *Int J Biometeorol* **56**, 211–219.
- Chaturvedi, V. P., Randhawa, H. S., Chaturvedi, S. & Khan, Z. U. (1988). *In vitro* interactions between *Blastomyces dermatitidis* and other zoopathogenic fungi. *Can J Microbiol* **34**, 897–900.
- Colon-Colon, W. & Rodriguez-del Valle, N. (1993). Studies on phase transitions in *Sporothrix schenckii*: possible involvement of protein kinase C. *Dimorphic Fungi Biol. Med.* 225–239.
- Cooke, W. B. & Foter, M. J. (1958). Fungi in used bedding materials. *Appl Microbiol* **6**, 169–173.
- Criseo, G., Malara, G., Romeo, O. & Puglisi Guerra, A. (2008). Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. *Mycopathologia* **166**, 159–162.
- Cunningham, K. M., Bulmer, G. S. & Rhoades, E. R. (1979). Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. *J Infect Dis* **140**, 815–817.
- da Graça Sgarbi, D. B., da Silva, A. J. R., Carlos, I. Z., Silva, C. L., Angluster, J. & Alviano, C. S. (1997). Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* **139**, 9–14.
- Da Rosa, D., Gezeule, E., Calegari, L. & Goñi, F. (2009). Excretion-secretion products and proteases from live *Sporothrix schenckii* yeast phase: immunological detection and cleavage of human IgG. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **51**, 1–7.
- Davies, B., Chattings, L. S. & Edwards, S. W. (1991). Superoxide generation during phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*: similarities to

- the respiratory burst of immune phagocytes. *J Gen Microbiol* 137, 705–710.
- de Beurmann, L. & Gougerot, H. (1912). *Les Sporotrichoses*. Paris: Felix Alcan.
- de Capriles, C. H., Essayag, S. M., Lander, A. & Camacho, R. (1993). Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). *Mycopathologia* 122, 129–133.
- de Hoog, G. S. (1974). The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* gen. nov. *Stud Mycol* 7, 1–84.
- de Lima Barros, M. B., Costa, D. L., Schubach, T. M., do Valle, A. C., Lorenzi, N. P., Teixeira, J. L. & Schubach, A. O. (2008). Endemic of zoonotic sporotrichosis: profile of cases in children. *Pediatr Infect Dis J* 27, 246–250.
- de Lima Barros, M. B., Schubach, T. P., Coll, J. O., Gremião, I. D., Wanke, B. & Schubach, A. (2010). [Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic]. *Rev Panam Salud Publica* 27, 455–460 (in Portuguese).
- de Lima Barros, M. B., de Almeida Paes, R. & Schubach, A. O. (2011). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev* 24, 633–654.
- de Moraes, Borba, C., da Silva, A. M. & de Oliveira, P. C. (1992). Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. *Mycoses* 35, 185–188.
- de Souza Lacerda, C. M., do Nascimento Martins, E. M., de Resende, M. A. & de Andrade, A. S. R. (2011). Gamma radiation effects on *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Mycopathologia* 171, 395–401.
- Dias, N. M., Oliveira, M. M. E., Portela, M. A., Santos, C., Zancoppe-Oliveira, R. M. & Lima, N. (2011). Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. *Emerg Infect Dis* 17, 1975–1976.
- Dixon, D. M., Salkin, I. F., Duncan, R. A., Hurd, N. J., Haines, J. H., Kemna, M. E. & Coles, F. B. (1991). Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol* 29, 1106–1113.
- Dunstan, R. W., Langham, R. F., Reimann, K. A. & Wakenell, P. S. (1986). Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. *J Am Acad Dermatol* 15, 37–45.
- Edwards, C., Reuther, W. L., III & Greer, D. L. (2000). Disseminated osteoarticular sporotrichosis: treatment in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *South Med J* 93, 803–806.
- Eisenman, H. C. & Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 931–940.
- Feeney, K. T., Arthur, I. H., Whittle, A. J., Altman, S. A. & Speers, D. J. (2007). Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. *Emerg Infect Dis* 13, 1228–1231.
- Fernandes, K. S., Neto, E. H., Brito, M. M., Silva, J. S., Cunha, F. Q. & Barja-Fidalgo, C. (2008). Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. *Immunology* 123, 469–479.
- Fernandes, G. F., Do Amaral, C. C., Sasaki, A., Godoy, P. M. & De Camargo, Z. P. (2009). Heterogeneity of proteins expressed by Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates. *Med Mycol* 47, 855–861.
- Fernandes, G. F., dos Santos, P. O., Rodrigues, A. M., Sasaki, A. A., Burger, E. & de Camargo, Z. P. (2013). Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence* 4, 241–249.
- Fernández-Silva, F., Capilla, J., Mayayo, E. & Guarro, J. (2012). Virulence of *Sporothrix luriei* in a murine model of disseminated infection. *Mycopathologia* 173, 245–249.
- Figueiredo, C. C., Deccache, P. M., Lopes-Bezerra, L. M. & Morandi, V. (2007). TGF- β 1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. *Microbiology* 153, 2910–2921.
- Freitas, D. F., de Siqueira Hoagland, B., do Valle, A. C., Fraga, B. B., de Barros, M. B., de Oliveira Schubach, A., de Almeida-Paes, R., Cuzzi, T., Rosalino, C. M. & other authors (2012). Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol* 50, 170–178.
- Gadd, G. M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124, 25–60.
- Galhardo, M. C. G., Silva, M. T. T., Lima, M. A., Nunes, E. P., Schettini, L. E. C., de Freitas, R. F., de Almeida Paes, R., de Sousa Neves, E. & do Valle, A. C. F. (2010). *Sporothrix schenckii* meningitis in AIDS during immune reconstitution syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 696–699.
- Gauthier, G. & Klein, B. S. (2008). Insights into fungal morphogenesis and immune evasion: fungal conidia, when situated in mammalian lungs, may switch from mold to pathogenic yeasts or spore-forming spherules. *Microbe Wash DC* 3, 416–423.
- Gessler, N. N., Egorova, A. S. & Belozerskaya, T. A. (2014). Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions. *Appl Biochem Microbiol* 50, 105–113.
- Gewehr, P., Jung, B., Aquino, V., Manfro, R. C., Spuldaro, F., Rosa, R. G. & Goldani, L. Z. (2013). Sporotrichosis in renal transplant patients. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 24, e47–e49.
- Ghosh, A., Maity, P. K., Hemashettar, B. M., Sharma, V. K. & Chakrabarti, A. (2002). Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 45, 449–454.
- Gómez, B. L. & Nosanchuk, J. D. (2003). Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis* 16, 91–96.
- Gostinčar, C., Grube, M. & Gunde-Cimerman, N. (2011). Evolution of fungal pathogens in domestic environments? *Fungal Biol* 115, 1008–1018.
- Gürçan, S., Konuk, E., Kiliç, H., Otkun, M. & Ener, B. (2007). Sporotrichosis, a disease rarely reported from Turkey, and an overview of Turkish literature. *Mycoses* 50, 426–429.
- Guzman-Beltran, S., Perez-Torres, A., Coronel-Cruz, C. & Torres-Guerrero, H. (2012). Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes. *Microbes Infect* 14, 1093–1101.
- Haddad, V., Jr, Miot, H. A., Bartoli, L. D., Cardoso, A. C. & Camargo, R. P. (2002a). Cutaneous sporotrichosis associated with a puncture in the dorsal fin of a fish (*Tilapia* sp.): report of a case. *Medical Mycol* 40, 425–427.
- Haddad, V., Miot, H. A., Bartoli, L. D., De Chiara, A. C. & Pires, R. M. C. (2002b). Localized lymphatic sporotrichosis after fish-induced injury (*Tilapia* sp.). *Med Mycol* 40, 425–427.
- Hay, R. J. & Morris-Jones, R. (2008). Outbreaks of sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 21, 119–121.
- Hektoen, L. & Perkins, C. F. (1900). Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. *J Exp Med* 5, 77–89.
- Hernández-Santos, N. & Gaffen, S. L. (2012). Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 11, 425–435.
- Hou, B., Zhang, Z., Zheng, F. & Liu, X. (2013). Molecular cloning, characterization and differential expression of DRK1 in *Sporothrix schenckii*. *Int J Mol Med* 31, 99–104.
- Jaroslwiecka, A. & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology* 160, 12–25.

- Kacprzak, M. & Malina, G. (2005). The tolerance and Zn²⁺, Ba²⁺ and Fe³⁺ accumulation by *Trichoderma atroviride* and *Mortierella exigua* isolated from contaminated soil. *Can J Soil Sci* **85**, 283–290.
- Kaplan, J., McVey Ward, D., Crisp, R. J. & Philpott, C. C. (2006). Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 646–651.
- Kauffman, C. A. (1999). Sporotrichosis. *Clin Infect Dis* **29**, 231–237.
- Kazanas, N. (1987). Pathogenic fungi isolated from desiccated mushrooms, seaweed, anchovies and rice sticks imported from the Orient. *J Food Protection* **50**, 933–939.
- Kitajima, Y. (2000). [Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus: cell walls, lipids and dimorphism, and action modes of antifungal agents]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **41**, 211–217 (in Japanese).
- Klein, B. S. & Tebbets, B. (2007). Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol* **10**, 314–319.
- Kosman, D. J. (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* **47**, 1185–1197.
- Lee, B. U., Park, S. C., Cho, Y. S., Kahng, H. Y. & Oh, K. H. (2008). Expression and characterization of the TNT nitroreductase of *Pseudomonas* sp. HK-6 in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **56**, 386–390.
- Lima, O. C., Figueiredo, C. C., Pereira, B. A., Coelho, M. G., Morandi, V. & Lopes-Bezerra, L. M. (1999). Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Braz J Med Biol Res* **32**, 651–657.
- Lima, O. C., Figueiredo, C. C., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Morandi, V. & Bezerra, L. M. L. (2001). Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun* **69**, 6874–6880.
- Lima, O. C., Bouchara, J. P., Renier, G., Marot-Leblond, A., Chabasse, D. & Lopes-Bezerra, L. M. (2004). Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. *Microb Pathog* **37**, 131–140.
- Liu, X. & Lin, X. (2001). A case of cutaneous disseminated sporotrichosis. *J Dermatol* **28**, 95–99.
- Lloret, A., Hartmann, K., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T. & other authors (2013). Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* **15**, 619–623.
- Lopes-Bezerra, L. M., Schubach, A. & Costa, R. O. (2006). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc* **78**, 293–308.
- López-Esparza, A., Álvarez-Vargas, A., Mora-Montes, H. M., Hernández-Cervantes, A., Del Carmen Cano-Canchola, M. & Flores-Carreón, A. (2013). Isolation of *Sporothrix schenckii* GDA1 and functional characterization of the encoded guanosine diphosphatase activity. *Arch Microbiol* **195**, 499–506.
- López-Romero, E., del Rocío Reyes-Montes, M., Pérez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J. C., Mora-Montes, H. M., Flores-Carreón, A. & Toriello, C. (2011). *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol* **6**, 85–102.
- Madrid, H., Cano, J., Gené, J., Bonifaz, A., Toriello, C. & Guarro, J. (2009). *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol* **26**, 218–222.
- Madrid, I. M., Xavier, M. O., Mattei, A. S., Fernandes, C. G., Guim, T. N., Santin, R., Schuch, L. F. D., Nobre, M. O. & Araújo Meireles, M. C. (2010). Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes Infect* **12**, 162–165.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazéra, M. & Guarro, J. (2006). Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* **44**, 3251–3256.
- Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D. A., Kawasaki, M. & Guarro, J. (2007). *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* **45**, 3198–3206.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J. & Guarro, J. (2008a). *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol* **46**, 621–625.
- Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J. & Guarro, J. (2008b). *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 732–734.
- Mendoza, M., Alvarado, P., Díaz de Torres, E., Lucena, L. & de Albornoz, M. C. (2005). [Physiological compartment and *in vitro* sensitivity of *Sporothrix schenckii* isolates maintained for 18 years by two preservation methods]. *Rev Iberoam Micol* **22**, 151–156 (in Spanish).
- Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M. & Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol* **292**, 405–419.
- Mora-Montes, H. M., Ponce-Noyola, P., Villagómez-Castro, J. C., Gow, N. A. R., Flores-Carreón, A. & López-Romero, E. (2009). Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiol* **4**, 1167–1183.
- Morehart, A. L. & Larsh, H. W. (1967). Laboratory examination of organic fungicides against zoopathogenic fungi in soil. *Appl Microbiol* **15**, 1248–1251.
- Morris-Jones, R., Youngchim, S., Gomez, B. L., Aisen, P., Hay, R. J., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A. & Hamilton, A. J. (2003). Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *in vitro* and during mammalian infection. *Infect Immun* **71**, 4026–4033.
- Nascimento, R. C. & Almeida, S. R. (2005). Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *Immun Med Microb* **43**, 241–247.
- Nascimento, R. C., Espíndola, N. M., Castro, R. A., Teixeira, P. A., Loureiro y Penha, C. V., Lopes-Bezerra, L. M. & Almeida, S. R. (2008). Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol* **38**, 3080–3089.
- Negrini, T. de C., Ferreira, L. S., Alegranci, P., Arthur, R. A., Sundfeld, P. P., Maia, D. C. G., Spolidorio, L. C. & Carlos, I. Z. (2013). Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest* **42**, 36–48.
- Negrini, T. de C., Ferreira, L. S., Arthur, R. A., Alegranci, P., Placeres, M. C. P., Spolidorio, L. C. & Carlos, I. Z. (2014). Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest* **43**, 370–390.
- Nemecek, J. C., Wüthrich, M. & Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* **312**, 583–588.
- Niedbala, W., Cai, B., Liu, H., Pitman, N., Chang, L. & Liew, F. Y. (2007). Nitric oxide induces CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells from CD4⁺CD25⁻ T cells via p53, IL-2, and OX40. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15478–15483.
- Niedbala, W., Alves-Filho, J. C., Fukada, S. Y., Vieira, S. M., Mitani, A., Sonogo, F., Mirchandani, A., Nascimento, D. C., Cunha, F. Q. & Liew, F. Y. (2011). Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9220–9225.
- Niedbala, W., Besnard, A. G., Jiang, H. R., Alves-Filho, J. C., Fukada, S. Y., Nascimento, D., Mitani, A., Pushparaj, P., Alqahtani, M. H. & Liew, F. Y. (2013). Nitric oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function. *J Immunol* **191**, 164–170.
- Noriega, C. T., Garay, R. R., Sabanero, G., Basurto, R. T. & López, M. S. (1993). [*Sporothrix schenckii*: cultures in different soils]. *Rev Latinoam Microbiol* **35**, 191–194 (in Spanish).

- Nosanchuk, J. D. & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3519–3528.
- Nusbaum, B. P., Gulbas, N. & Horwitz, S. N. (1983). Sporotrichosis acquired from a cat. *J Am Acad Dermatol* **8**, 386–391.
- Oda, L. M., Kubelka, C. F., Alviano, C. S. & Travassos, L. R. (1983). Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* **39**, 497–504.
- Ojeda, T., Rodríguez-Pichardo, A., Suárez, A. I. & Camacho, F. M. (2011). [Sporotrichosis in Seville (Spain)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **29**, 233–234 (in Spanish).
- Oliveira, M. M. E., Almeida-Paes, R., Gutierrez-Galhardo, M. C. & Zancopé-Oliveira, R. M. (2014). Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoam Micol* **31**, 2–6.
- Pasarell, L. & McGinnis, M. R. (1992). Viability of fungal cultures maintained at -70°C . *J Clin Microbiol* **30**, 1000–1004.
- Pečiulytė, D. (2010). Effect of long-term industrial pollution on microorganisms in soil of deciduous forests situated along a pollution gradient next to a fertilizer factory 3. Species diversity and community structure of soil fungi. *Ekologija* **56**, 132–143.
- Pérez-Sánchez, L., González, E., Colón-Lorenzo, E. E., González-Velázquez, W., González-Méndez, R. & Rodríguez-del Valle, N. (2010). Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. *BMC Microbiol* **10**, 317.
- Pietrella, D., Pandey, N., Gabrielli, E., Pericolini, E., Perito, S., Kasper, L., Bistoni, F., Cassone, A., Hube, B. & Vecchiarelli, A. (2013). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol* **43**, 679–692.
- Prenafeta-Boldú, F. X., Summerbell, R. & de Hoog, G. S. (2006). Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol Rev* **30**, 109–130.
- Ramos-e-Silva, M., Lima, C. M., Schechtman, R. C., Trope, B. M. & Carneiro, S. (2012). Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol* **30**, 616–627.
- Ranjana, K. H., Chakrabarti, A., Kulachandra, M., Lokendra, K. & Devendra, H. (2001). Sporotrichosis in Manipur: report of two cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **67**, 86–88.
- Read, S. I. & Sperling, L. C. (1982). Feline sporotrichosis. Transmission to man. *Arch Dermatol* **118**, 429–431.
- Reed, K. D., Moore, F. M., Geiger, G. E. & Stemper, M. E. (1993). Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis* **16**, 384–387.
- Rivera-Rodríguez, N. & Rodríguez-del Valle, N. (1992). Effects of calcium ions on the germination of *Sporothrix schenckii* conidia. *J Med Vet Mycol* **30**, 185–195.
- Rocha, M. M., Dassin, T., Lira, R., Lima, E. L., Severo, L. C. & Londero, A. T. (2001). Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol* **18**, 133–136.
- Rodrigues, A. M., de Hoog, S. & de Camargo, Z. P. (2013a). Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol* **51**, 405–412.
- Rodrigues, A. M., de Melo Teixeira, M., de Hoog, G. S., Schubach, T. M., Pereira, S. A., Fernandes, G. F., Bezerra, L. M., Felipe, M. S. & de Camargo, Z. P. (2013b). Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2281.
- Rodriguez-Caban, J., Gonzalez-Velazquez, W., Perez-Sanchez, L., Gonzalez-Mendez, R. & Rodriguez-del Valle, N. (2011). Calcium/calmodulin kinase1 and its relation to thermotolerance and HSP90 in *Sporothrix schenckii*: an RNAi and yeast two-hybrid study. *BMC Microbiol* **11**, 162.
- Romeo, O. & Criseo, G. (2013). What lies beyond genetic diversity in *Sporothrix schenckii* species complex? New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in *S. schenckii sensu stricto* isolates. *Virulence* **4**, 203–206.
- Romeo, O., Scordino, F. & Criseo, G. (2011). New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia* **172**, 179–186.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G. & Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* **68**, 3696–3703.
- Rosas, A. L. & Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 265–272.
- Rosas, A. L. & Casadevall, A. (2001). Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. *Mycopathologia* **151**, 53–56.
- Ruiz-Baca, E., Toriello, C., Pérez-Torres, A., Sabanero-Lopez, M., Villagómez-Castro, J. C. & López-Romero, E. (2009). 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* **47**, 185–196.
- Sampermans, S., Mortier, J. & Soares, E. V. (2005). Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J Appl Microbiol* **98**, 525–531.
- Sasaki, A. A., Fernandes, G. F., Rodrigues, A. M., Lima, F. M., Marini, M. M., Feitosa, L. dos S., de Melo Teixeira, M., Felipe, M. S. S., da Silveira, J. F. & de Camargo, Z. P. (2014). Chromosomal polymorphism in the *Sporothrix schenckii* complex. *PLoS ONE* **9**, e86819.
- Sassá, M. F., Ferreira, L. S., de Abreu Ribeiro, L. C. & Carlos, I. Z. (2012). Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia* **174**, 21–30.
- Schaible, U. E. & Kaufmann, S. H. (2004). Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* **2**, 946–953.
- Schenck, B. R. (1898). On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Bull Johns Hopkins Hosp* **9**, 286–290.
- Schubach, T. M., Valle, A. C., Gutierrez-Galhardo, M. C., Monteiro, P. C., Reis, R. S., Zancopé-Oliveira, R. M., Marzochi, K. B. & Schubach, A. (2001). Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol* **39**, 147–149.
- Schubach, T. M. P., de Oliveira Schubach, A., dos Reis, R. S., Cuzzi-Maya, T., Blanco, T. C. M., Monteiro, D. F., de Lima, Barros, M. B., Brustein, R., Zancopé-Oliveira, R. M. & other authors (2002). *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* **153**, 83–86.
- Scott, E. N. & Muchmore, H. G. (1989). Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* **27**, 300–304.
- Serrano, S. & Rodríguez-del Valle, N. (1990). Calcium uptake and efflux during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* **112**, 1–9.
- Silva-Vergara, M. L., Maneira, F. R., De Oliveira, R. M., Santos, C. T., Etchebehere, R. M. & Adad, S. J. (2005). Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. *Med Mycol* **43**, 187–190.
- Silva-Vergara, M. L., de Camargo, Z. P., Silva, P. F., Abdalla, M. R., Sgarbieri, R. N., Rodrigues, A. M., dos Santos, K. C., Barata, C. H. & Ferreira-Paim, K. (2012). Disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection

- with endocardial and ocular involvement in an HIV-infected patient. *Am J Trop Med Hyg* **86**, 477–480.
- Smilack, J. D. (1993).** Zoonotic transmission of sporotrichosis. *Clin Infect Dis* **17**, 1075–1076.
- Staib, F. & Grosse, G. (1983).** Isolation of *Sporothrix schenckii* from the floor of an indoor swimming pool. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* **177**, 499–506.
- Steenbergen, J. N., Nosanchuk, J. D., Malliaris, S. D. & Casadevall, A. (2003).** *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* **71**, 4862–4872.
- Steenbergen, J. N., Nosanchuk, J. D., Malliaris, S. D. & Casadevall, A. (2004).** Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* **72**, 3478–3488.
- Stopiglia, C. D., Carissimi, M., Daboit, T. C., Stefani, V., Corbellini, V. A. & Scroferneker, M. L. (2013).** Application of 6-nitrocoumarin as a substrate for the fluorescent detection of nitroreductase activity in *Sporothrix schenckii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **55**, 353–356.
- Taborda, C. P., da Silva, M. B., Nosanchuk, J. D. & Travassos, L. R. (2008).** Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* **165**, 331–339.
- Teixeira, P. A., de Castro, R. A., Nascimento, R. C., Tronchin, G., Torres, A. P., Lazéra, M., de Almeida, S. R., Bouchara, J. P., Loureiro y Penha, C. V. & Lopes-Bezerra, L. M. (2009).** Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology* **155**, 3730–3738.
- Torres-Guerrero, H. & Arenas-López, G. (1998).** UV irradiation induced high frequency of colonial variants with altered morphology in *Sporothrix schenckii*. *Med Mycol* **36**, 81–87.
- Travassos, L. R. & Lloyd, K. O. (1980).** *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol Rev* **44**, 683–721.
- Travassos, L. R., de Sousa, W., Mendonça-Previato, L. & Lloyd, K. O. (1977).** Location and biochemical nature of surface components reacting with concanavalin A in different cell types of *Sporothrix schenckii*. *Exp Mycol* **1**, 293–305.
- Trotter, J. R., Sriaroon, P., Berman, D., Petrovic, A. & Leiding, J. W. (2014).** *Sporothrix schenckii* lymphadenitis in a male with X-linked chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol* **34**, 49–52.
- Ulfing, K. (1994).** [The occurrence of keratinolytic fungi in the polluted environment of the Labedy district in Gliwice]. *Rocz Panstw Zakl Hig* **45**, 337–346 (in Polish).
- Ulfing, K., Terakowski, M. & Lukasik, W. (1996).** A preliminary study on the occurrence of keratinolytic fungi in the street sweepings from Chorzów. *Rocz Panstw Zakl Hig* **47**, 143–149.
- Valentín-Berrios, S., González-Velázquez, W., Pérez-Sánchez, L., González-Méndez, R. & Rodríguez-Del Valle, N. (2009).** Cytosolic phospholipase A2: a member of the signalling pathway of a new G protein α subunit in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiol* **9**, 100.
- Valix, M. & Loon, L. O. (2003).** Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals. *Minerals Engng* **16**, 193–198.
- Valix, M., Tang, J. Y. & Malik, R. (2001).** Heavy metal tolerance of fungi. *Minerals Engng* **14**, 499–505.
- Valle-Aviles, L., Valentín-Berrios, S., Gonzalez-Mendez, R. R. & Rodríguez-Del Valle, N. (2007).** Functional, genetic and bioinformatic characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiol* **7**, 107.
- van Duin, D., Casadevall, A. & Nosanchuk, J. D. (2002).** Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3394–3400.
- Verstrepen, K. J. & Klis, F. M. (2006).** Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**, 5–15.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. & Delvaux, F. R. (2003).** Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 197–205.
- Vilela, R., Souza, G. F., Fernandes Cota, G. & Mendoza, L. (2007).** [Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient]. *Rev Iberoam Micol* **24**, 161–163 (in Spanish).
- Wang, Y. & Casadevall, A. (1994a).** Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3864–3866.
- Wang, Y. & Casadevall, A. (1994b).** Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun* **62**, 3004–3007.
- Wang, X. H., Li, R. Y., Cao, C. W., Wang, Y. H., Liu, W., Qiao, J. J. & Li, Y. Z. (2008).** Differential mRNA expression of *Sporothrix schenckii* catalase gene in two growth phases and effect factors. *Chin Med J (Engl)* **121**, 2100–2102.
- Weete, J. D. (1989).** Structure and function of sterols in fungi. *Adv Lipid Res* **23**, 115–167.
- Werner, A. H. & Werner, B. E. (1994).** Sporotrichosis in man and animal. *Int J Dermatol* **33**, 692–700.
- Wheeler, M. H. & Bell, A. A. (1988).** Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Curr Top Med Mycol*, **2**, 338–387.
- Wroblewska, M., Swoboda-Kopec, E., Kawecki, D., Sawicka-Grzelak, A., Stelmach, E. & Luczak, M. (2005).** Infection by a dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* in an immunocompromised patient. *Infection* **33**, 289–291.
- Wu, H., Downs, D., Ghosh, K., Ghosh, A. K., Staib, P., Monod, M. & Tang, J. (2013).** *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4–6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism. *FASEB J* **27**, 2132–2144.
- Xu, J., Yang, Q., Qian, X., Samuelsson, J. & Janson, J. C. (2007).** Assessment of 4-nitro-1,8-naphthalic anhydride reductase activity in homogenates of bakers' yeast by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **847**, 82–87.
- Yazdanparast, S. A., Dargahi, H., Shahrokhi, S. & Farahani, R. H. (2013).** Isolation and investigation of keratinophilic fungi in the parks of municipality districts of Tehran. *Thrita J Med Sci* **2**, 2–5.
- Yegneswaran, P. P., Sripathi, H., Bairy, I., Lonikar, V., Rao, R. & Prabhu, S. (2009).** Zoonotic sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. *Int J Dermatol* **48**, 1198–1200.
- Zafar, S., Aqil, F. & Ahmad, I. (2007).** Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour Technol* **98**, 2557–2561.
- Zecconi, A. & Scali, F. (2013).** *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol Lett* **150**, 12–22.
- Zhang, Z., Hou, B., Xin, Y. & Liu, X. (2012).** Protein profiling of the dimorphic pathogenic fungus, *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* **173**, 1–11.
- Zhang, Z., Hou, B., Zheng, F., Yu, X. & Liu, X. (2013).** Molecular cloning, characterization and differential expression of a *Sporothrix schenckii* STE20-like protein kinase SsSte20. *Int J Mol Med* **31**, 1343–1348.