

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/05/2020.



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).

Dedicatória

A mi hijito amado Alexander Damian, quien es mi alegría, 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 máspreciado, mi gran amor. Te amo hijo con todo mi corazón. 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 corazón me enseñó a amar y a soñar, a encontrar fuerzas para superar los obstáculos, a no cejar. Por ti aprendí que en las cosas más simples está la belleza de la vida. Mucho de ti hay en mí y me enorgullece. Tu ternura e inmenso amor son mi inspiración. Te amo mama. Tu apoyo en cada momento de mi vida fue y es fundamental, sin ti hubiera sido más difícil la escarpada.

A Bruno, mi papi adorado. Fui afortunada de tenerte y siempre estarás en mis pensamientos y mi alma. Contigo aprendí a soñar, a no olvidar quien soy ni de dónde vengo. Contigo aprendí a ir lejos y hallar siempre el camino de volver. Y aunque hoy las lágrimas y la tristeza me abrumen me queda el consuelo de ser tu hija, de ser mucho de ti, de ser como tú, no sólo en lo físico sino también en lo abstracto, en la idea, en el pensamiento. Eso me reconforta, me enorgullece y me alivia. Te amo papi y te amaré siempre. Gracias por todo tu amor, por tu ejemplo de vida. Descansa en paz. Sé que estás junto a Dios.

La dedico también a Brunito mi hermano amado, con quien he compartido juegos y travesuras de niños, ilusiones y responsabilidades de adultos. Su amor, sus historias de la naturaleza que sabe amar, su alegría, su compañía en todos los momentos, y principalmente en aquellos más 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, alegrías, la vida compartida. Tu apoyo incondicional fue invaluable para lograr este empeño, sin tu fuerza, conocimiento y voluntad habría sido imposible hacerlo.

Y la dedico también a mi abuelita Iberia, mi abuela amada. Que me enseñó y nos enseñó a todos junto a mi abuelo Chencho, que es ser una familia, y que eso somos: una familia. Tu cariño que me envolvió desde niña 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. Jamás olvidaré que estuvieron ahí con mi madre en el duro momento que mi padre partió.

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 <i>Mininnert</i>	32
Figura 5. Sobrevivência de <i>S. schenckii</i> 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 <i>S. schenckii</i> 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 <i>Mininnert</i> 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 <i>S. schenckii</i> 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 <i>Mininnert</i> 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 a 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 < 0,05); ***(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 patógenos 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 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* *senso 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 patógenos, 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.

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 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, Armstrong 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-Duharte A; Téllez-Martínez D; Clevertón 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-Duharte 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. Beauregard 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, Kaihama 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 *sporo*thrix 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*

- schenckii. 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-Duharte 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 exiguua* isolated from contaminated soil. Can J Soil Sci 2005;85:283–290.
120. Klis FM, Pieterella 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 comportment 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, Zancoppe-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-Duharte 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, Elguezal N, Alvarez M, Moragues MD. Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med Mycol*. 2001;39 Suppl 1:101-10.
195. Portuondo DL, Batista-Duharte 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 resinae* (C. *resinae*): cell wall and melanin studies. *Curr Microbiol*. 1996;32(1):11-6.
214. Sassá MF, Satri 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, Piehler 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, Blokzijl 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 storaged 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.