

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM LEVEDURAS DE
SPOROTHRIX SCHENCKII.**

Camila Maria de Sousa Lacerda

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Comissão Nacional de Energia Nuclear
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e
Materiais**

**“EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM LEVEDURAS DE *SPOROTHRIX
SCHENCKII*”.**

Camila Maria de Sousa Lacerda

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais, como requisito
parcial à obtenção do Grau de Mestre

Área de concentração: Ciência e Tecnologia das Radiações

Orientador: Dr. Antero Silva Ribeiro Andrade

Belo Horizonte
2010

*Aos meus pais, pelo amor incondicional.
Aos meus irmãos pelo apoio e carinho.
Aos meus sobrinhos por alegrarem minha vida.
Ao meu orientador pela parceria, paciência e ensinamentos*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pela família, amigos e oportunidade.

Aos meus pais pelo amor, exemplo e respeito por todas as minhas decisões.

Ao meu Orientador, “Chefinho” querido, pelo aprendizado diário, paciência, dedicação e amizade.

Ao Fofinho pela força e conselhos preciosos.

À minha irmã, Ana Paula pelo amor, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.

À Vaninha e Polyana pelo carinho e amizade.

Aos meus cunhados Sheila e Alex, pela amizade e torcida.

Aos meus familiares pela força e carinho.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro e bolsa.

À Estefânia pela enorme colaboração e amizade.

Aos Professores Maria Aparecida Resende e Alfredo Miranda Góes pela importante colaboração.

Ao Prof. Márcio Tadeu Pereira por ter me aberto as portas do CDTN e também pela amizade.

Ao Prof. Teógenes Silva pelo apoio e incentivo.

Aos professores da pós-graduação do CDTN pelos ensinamentos e motivação.

À Roseli, Cerisa e Fulgêncio pela atenção e ajuda sempre que necessária.

Ao Centro de Microscopia da UFMG pela disponibilidade e atenção com que sempre me receberam.

Ao Prof. Ari, do ICB pelo microscópio e disponibilidade.

Ao Jamil, do ICB, pelas leituras e disponibilidade.

Aos amigos que chegaram pra ficar: Pri, Pepê, Lu Ana Luiza e Jiji pelo amor, carinho e por estarem presentes em todos os momentos dessa caminhada.

Aos amados amigos do LIG, Fausto, Lili, Pablito e Timotinho pelo apoio e por me acolherem com tanto carinho.

À Soninha pelo carinho e ajuda nas Referências Bibliográficas.

Aos amigos Marina, Tati, Paulo Márcio, Adriana, Gaby, Ana Rosa, Olívia, Nelson, Marcos, Juscelino, Paulinho, Vlamir, Fred Alvarenga, Peterson, Lucas, Marcos, Lino, Nino, Virgínia, Kerley, Ellen, Paulo Baiano, Bernadeth, Rodrigo, Virgínia pelos momentos, alegrias, carinho e amizade.

À Cris, pela ajuda nos gráficos e dicas importantes.

Aos amigos do Laboratório de Radiobiologia do CDTN pela generosidade e convivência.

Aos amigos de Divinópolis, Aline, Karyne, Glenda, Fuskinha, Vinícius, Fabiana, Adelino, Divina, Perpétua, Roberto, Marcelo, Sandrinha, Wilson e meu afilhadinho querido, João Victor que mesmo com tantos desencontros...sei que torcem por mim.

À Lenira, Virgínia, Nívea e Romário pela disponibilidade e gentileza.

Aos “Deuses”... pelos momentos de alegria e amizade.

Ao Rubens pelo carinho e apoio logo no início dessa caminhada.

Ao Daniel Fireman pelas longas conversas “desestressantes” e pela torcida.

Aos colegas do CDTN ... pela convivência, almoços, festas e bate papo nos corredores ... sempre regados de boas risadas.

Ao CDTN/CNEN pela oportunidade.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para essa conquista,

OBRIGADA!!!

“A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor”

Chico Xavier

Efeitos da Radiação Gama em Leveduras de *Sporothrix Schenckii*

Camila Maria de Sousa Lacerda

RESUMO

A Esporotricose é uma infecção subaguda ou crônica causada pelo fungo *Sporothrix schenckii*. A transmissão zoonótica pode ocorrer depois de arranhões ou mordidas de animais, principalmente gatos, roedores e tatus. Até o momento, nenhuma vacina esta em uso para esporotricose ou para qualquer infecção fúngica de importância médica, indicando a necessidade de ampliar a investigação neste campo e explorar novas alternativas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da radiação gama em leveduras de *S. schenckii*, visando a sua atenuação, para aplicação posterior de leveduras radioatenuadas no desenvolvimento de uma vacina destinada a imunização de gatos e cães. As leveduras *S. schenckii* foram cultivadas em meio sólido BHI (Infuso Cérebro e Coração) suplementados com tiamina e na temperatura de 36°C. As culturas foram irradiadas com doses variando de 1,0 a 9,0 kGy. Após cada dose foram avaliados a capacidade reprodutiva, a viabilidade, e o metabolismo de síntese de proteínas. A avaliação da virulência foi realizada pela inoculação das leveduras irradiadas em camundongos Balb/c imunossuprimidos e posterior recuperação de unidades formadoras de colônias (UFCs). A integridade do DNA, a ocorrência de apoptose e de alterações ultra-estruturais também foram analisada nas leveduras radioatenuadas. Os resultados mostraram uma redução de 6 ciclos \log_{10} no número de UFCs recuperadas na dose de 6,0 kGy e a partir de 8,0 kGy não foram recuperadas UFCs. A análise de viabilidade indicou que as leveduras permaneceram viáveis até a dose de 9,0 kGy, a maior dose testada. As leveduras irradiadas mantiveram a capacidade de síntese de proteínas, porém esta foi reduzida significativamente na dose de 9,0 kGy, quando avaliada 24 horas após a irradiação. Os ensaios de virulência utilizando leveduras irradiadas com as doses de 7,0 e 9,0 kGy mostraram que não houve recuperação de UFCs dos órgãos dos camundongos imunossuprimidos, indicando que as células estavam atenuadas. O ensaio de integridade do DNA mostrou que com 7,0 kGy o DNA das leveduras estava fragmentado. Nesta mesma dose foi verificada uma diferença discreta, mas significativa, na ocorrência de apoptose entre as células irradiadas e controles 24 horas após a irradiação. Através da microscopia eletrônica de transmissão foram verificadas alterações ultra-estruturais nas leveduras irradiadas com 7,0 kGy. Duas horas após a irradiação as principais alterações verificadas foram a vacuolização e a perda de homogeneidade do citoplasma. Após 24 horas, além destas alterações o citoplasma se mostrou retraído e freqüentemente se descolando da parede celular. Nossos resultados indicaram que

para as leveduras do *S. schenckii*, foi possível encontrar uma dose absorvida em que o agente tem comprometida sua capacidade reprodutiva e perde a virulência, mantendo a sua viabilidade, uma condição desejável para o desenvolvimento de uma vacina radioatenuada.

Effects of Gamma Radiation in *Sporothrix Schenckii* Yeast Cells

Camila Maria de Sousa Lacerda

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subacute or chronic infection caused by the fungus *Sporothrix schenckii*. Zoonotic transmission can occur after scratches or bites of animals, mainly cats, rodents, and armadillos. Up to the moment, no approved vaccine was reported for *S. schenckii* or to any important pathogenic fungi infection in humans, indicating the need to expand the research in this field and to explore new alternatives. The aim of this study was to evaluate the effects of gamma radiation on the viability, metabolic activity and reproductive ability of *S. schenckii* yeast cells for further studies on the development of a vaccine for immunization of cats and dogs. The culture of *S. schenckii*, in solid medium, was irradiated at doses ranging from 1.0 to 9.0 kGy. After each dose the reproductive capacity, viability and protein synthesis were estimated. The results showed that a reduction of 6 log₁₀ cycles in the number of colonies was achieved at 6.0 kGy and after 8.0 kGy no colonies could be recovered. The viability analysis indicated that yeast cells remained viable up to 9.0 kGy. The results of protein synthesis analysis showed that the yeast cells, irradiated up to 9.0 kGy, were able to synthesize proteins. But this ability was significantly reduced with 9.0 kGy, 24 h after irradiation. The virulence assays using yeast irradiated with doses of 7.0 and 9.0 kGy showed no CFUs recovery from tissues of immunosuppressed mice, indicating that the cells were attenuated. The DNA integrity test showed that the DNA of 7.0 kGy irradiated yeast cells was fragmented. At the same dose was verified a discrete but significant increase in the apoptose occurrence in relation to controls 24 hours after the irradiation. By transmission electron microscopy were observed ultrastructural changes in yeast irradiated with 7.0 kGy. Two hours after irradiation the major changes were the vacuolization and the loss of homogeneity of the cytoplasm. After 24 hours, apart from these changes, the cytoplasm was often retracted and sometimes taking off from the cell wall. Our results indicated that for the yeast cells of *S. schenckii*, it was possible to find an absorbed dose in which the fungus loses the virulence, while maintaining the viability, a desirable condition for the development of a radioattenuated yeast vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACPs** – células apresentadoras de antígeno.
- BHI** – “Brain heart infusion” – Infuso cérebro coração
- CDTN** – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear.
- CETEA** – Comitê de Ética em Pesquisa Animal
- CNEN** – Comissão Nacional de Energia Nuclear
- Co** – Cobalto
- CFDA,AM** – substrato de esterase 5-diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), éster acetoximetil (AM)
- cpm** – contagem por minuto
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- DNH** – fator de crescimento epidérmico.
- EDTA** – “Ethylenediaminetetraacetic Acid” – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- Fiocruz** – Fundação Oswaldo Cruz.
- kGy** – Kilo Gray
- LIG** – Laboratório de Irradiação Gama
- min** – minuto
- PBS** – “Phosphate buffer solution” – Tampão fosfato
- PMSF** – fosfolipase A₂
- pH** – potencial de hidrogênio.
- UFPEl** – Universidade Federal de Pelotas
- UFCs** – Unidades formadoras de colônias
- UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais.
- UV** – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Forma cutâneo linfática da esporotricose em humano.	28
FIGURA 2 – Felino com esporotricose.	29
FIGURA 3 – Forma cutâneo localizada da esporotricose em humano.	30
FIGURA 4 – Forma cutâneo localizada da esporotricose em felino.	30
FIGURA 5 – Forma cutâneo disseminada da esporotricose em humano.	31
FIGURA 6 – Forma cutâneo disseminada da esporotricose em felino.	32
FIGURA 7 – Forma mucosa da esporotricose em humano.	33
FIGURA 8 – Cultura de <i>S. schenckii</i> na forma leveduriforme crescendo em meio BHI na temperatura de 37°C.	44
FIGURA 9 – Cultura de <i>S. schenckii</i> na forma micelial crescendo em meio Mycosel, na temperatura de 20°C.	44
FIGURA 10 – Curva de sobrevivência das leveduras do <i>S. schenckii</i> em função da dose de radiação gama.	50
FIGURA 11 – Visualização no microscópio de fluorescência da viabilidade das leveduras de <i>Sporothrix schenckii</i> através do kit FungaLight CFDA,AM/Propidium Iodide.	51
FIGURA 12 – Viabilidade das leveduras de <i>S. schenckii</i> em função da dose de radiação gama.	52
FIGURA 13 – Incorporação da 35S-Metionina em leveduras de <i>S. schenckii</i> em função da dose de radiação gama.	53
Figura 14 – Avaliação da integridade do DNA das leveduras em função da dose de radiação gama. Foi utilizado gel de agarose 1%. 1- Levedura não irradiada; 2 – Levedura irradiada com 7 kGy.	55
FIGURA 15 – Detecção de apoptose em leveduras de <i>S. Schenckii</i> irradiadas.	55
FIGURA 16 – Aspecto geral das leveduras controle de <i>S. schenckii</i>	56
FIGURA 17 – Visão detalhada da parede celular, membrana plasmática e grânulo de estocagem das leveduras controle de <i>S. schenckii</i>	57
Figura 18 – Levedura controle de <i>S. schenckii</i> com o núcleo em evidência.	57
FIGURA 19 – Leveduras controle de <i>S. schenckii</i> com mitocôndrias e núcleo visíveis.	58
FIGURA 20 – Corpúsculo lipídico em levedura controle de <i>S. schenckii</i>	59
FIGURA 21 – Vacúolo em citoplasma de levedura controle de <i>S. schenckii</i>	59
FIGURA 22 – Vesículas secretoras em leveduras controle de <i>S. schenckii</i>	60
FIGURA 23 – Visão geral de leveduras de <i>S. schenckii</i> 2 horas após irradiação de 7 kGy.	61
FIGURA 24 – Vesículas secretoras e corpúsculo lipídico de levedura de <i>S. schenckii</i> 2 horas após irradiação, de 7 kGy.	62

FIGURA 25 – Vesículas secretoras em levedura de <i>S. schenckii</i> 2 horas após irradiação de 7 kGy.....	62
FIGURA 26 – Mitocôndria e corpúsculo lipídico de levedura de <i>S. schenckii</i> 2 horas após irradiação de 7 kGy.	63
FIGURA 27 – Levedura de <i>S. schenckii</i> 2 horas após irradiação de 7 kGy, apresentado citoplasma menos homogêneo.....	63
FIGURA 28 – Vesículas secretoras em levedura de <i>S. schenckii</i> 2 horas após irradiação de 7 kGy.....	64
FIGURA 29 – Vesículas secretoras e citoplasma menos homogêneo em leveduras de <i>S. schenckii</i> 2 horas após irradiação de 7 kGy.	64
FIGURA 30 – Vacuolização no citoplasma de leveduras de <i>S. schenckii</i> 2 horas após irradiação de 7 kGy.	65
FIGURA 31 – Aspecto geral das leveduras de <i>S. schenckii</i> 24 horas após irradiação de 7 kGy	66
FIGURA 32 – Corpúsculos lipídicos e citoplasma retraído em levedura de <i>S. schenckii</i> 24 horas após irradiação de 7 kGy.....	67
FIGURA 33 – Visão detalhada de vacúolo no citoplasma de levedura de <i>S. schenckii</i> 24 horas após irradiação de 7 kGy.....	67
FIGURA 34 – Vesículas secretoras de leveduras de <i>S. schenckii</i> 24 horas após irradiação de 7 kGy.....	68
FIGURA 35 – Levedura de <i>S. schenckii</i> 24 horas após irradiação de 7 kGy com núcleo em evidência..	69
FIGURA 36 – Citoplasma retraído em leveduras de <i>S. schenckii</i> 24 horas após irradiação de 7 kGy.	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Recuperação de UFCs em camundongos BALB/c imunossuprimidos	54
TABELA 2 – Resistência relativa de espécies fúngicas à irradiação gama.....	71

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO 3. JUSTIFICATIVA	19
CAPÍTULO 4. REFERENCIAL TEÓRICO	20
4.1. História	20
4.2. Esporotricose.....	20
4.3. <i>Sporothrix schenckii</i>	23
4.4. Virulência.....	25
4.5. Formas Clínicas.....	27
4.5.1. Cutâneo Linfática.....	27
4.5.2. Localizada.....	28
4.5.3. Disseminada ou Múltipla.....	28
4.5.4. Mucosa (ocular, nasal, outros).....	31
4.5.5. Extracutânea (Pulmonar , ostearticular e sistêmica).....	31
4.5.6. Residual (regressão espontânea, hipersensibilidade, eritema nodoso e multiforme).....	33
4.6. Diagnóstico.....	34
4.6.1. Microscopia direta.....	34
4.6.2. 4.6.2 Testes sorológicos.....	35
4.6.3. Isolamento e identificação do fungo	35
4.6.4. Inoculação experimental.....	35
4.7. Tratamento.....	36
4.8. Vacinas com microorganismos atenuados.....	38
4.8.1. Radiação Ionizante – Ferramenta na elaboração de vacinas	39
CAPÍTULO 5. MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1. Camundongos	43
5.2. Cultura.....	43
5.3. Imunossupressão com radiação gama.....	45
5.4. Irradiação gama.....	45
5.5. Avaliação da capacidade de reprodução (crescimento) das leveduras irradiadas	45

5.6.	Avaliação da viabilidade celular das leveduras irradiadas	46
5.7.	Avaliação do metabolismo de síntese de proteínas das leveduras irradiadas..	46
5.8.	Avaliação da capacidade de infecção das leveduras irradiadas.....	47
5.9.	Avaliação da integridade do DNA das leveduras irradiadas.....	48
5.10.	Detecção de apoptose nas leveduras irradiadas	48
5.11.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	49
5.12.	Análise estatística	49
CAPÍTULO 6. RESULTADOS.....		50
6.1.	Avaliação da capacidade de reprodução (crescimento) das leveduras irradiadas	50
6.2.	Avaliação da viabilidade celular das leveduras irradiadas	51
6.3.	Avaliação do metabolismo de síntese de proteína	52
6.4.	Avaliação da capacidade de infecção das leveduras irradiadas	53
6.5.	Avaliação da integridade do DNA das leveduras irradiadas.....	54
6.6.	Detecção de apoptose nas leveduras irradiadas	54
6.7.	Microscopia Eletrônica de Transmissão	56
CAPÍTULO 7. DISCUSSÃO.....		71
CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES.....		77
CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS.....		78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		79

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

As vacinas têm sido empregadas com sucesso na prevenção de doenças infecciosas, auxiliando no combate de numerosas enfermidades. No entanto, a elaboração de vacinas eficazes no combate à organismos eucariotos, como fungos, impõe um desafio adicional. A resolução de doenças causadas por fungos patogênicos é dependente de uma interação coordenada de múltiplos componentes do sistema imune do hospedeiro (CUTLER et al, 2007). Vacinas vivas atenuadas são ferramentas para se atingir este objetivo visto que este tipo de vacina induz respostas que mobilizam vários braços do sistema de defesa, restabelecendo a imunidade natural à doença, ao contrário da imunização com proteínas isoladas ou patógenos mortos (REINA-SAN-MARTIN et al, 2000).

A esporotricose é uma infecção subaguda ou crônica causada pelo fungo *Sporothrix schenckii*, considerado saprófita de solo rico em matéria orgânica. As principais áreas endêmicas atuais estão no Japão, na América do Norte e América do Sul, especialmente Brasil e México (BECHELLI, CURBAN, 1988). Ela é a micose subcutânea de maior incidência na América Latina.

A esporotricose se desenvolve principalmente através da penetração do fungo na derme, seja através de ferimentos ou abrasão da pele produzidos por materiais infectados, ou pela inalação de esporos através do trato respiratório (BELKNAP, 1989). A transmissão zoonótica pode ocorrer depois de arranhões ou mordidas de animais, principalmente gatos.

Até o momento não existe vacina para a esporotricose, nem vacinas em uso para micoses de importância médica. Apenas uma vacina profilática constituída de esférulas de *Coccidioides immitis* inativadas por formalina foi testada em humanos, mas esta não conferiu proteção em uma triagem randomizada (COLE et al, 2004; PAPPAGIANIS, 1993). No campo da medicina veterinária uma vacina para o *Trichophyton. verrucosum*, baseada no patógeno atenuado, tem sido utilizada com sucesso (GUDDING et al, 1986). Sendo assim, torna-se importante e necessário pesquisar alternativas que possam ser aplicadas na pesquisa de vacinas contra enfermidades provocadas por fungos.

O potencial de irradiação como uma ferramenta altamente eficaz para a criação de vacinas vivas atenuadas é reconhecida desde a década de 1950 (TAYLOR et al, 1986). Patógenos irradiados com doses específicas, freqüentemente perdem sua virulência, mas

mantêm a atividade metabólica e a morfologia e, conseqüentemente, são capazes de induzir um alto nível de imunidade (WALLES, KUSEL, 1992).

A proposta deste trabalho é estudar os efeitos da radiação gama sobre a forma leveduriforme do *Sporothrix schenckii*, visando a atenuação da mesma. As leveduras radioatenuadas seram posteriormente utilizadas no desenvolvimento de uma vacina destinada a cães e gatos, com o propósito de evitar o desenvolvimento da enfermidade em animias e a transmissão para humanos.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da radiação gama em leveduras de *Sporothrix schenckii* visando a atenuação destas para utilização como vacina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a dose absorvida, em kGy, necessária para eliminar a capacidade de reprodução das leveduras.
- Avaliar a viabilidade das leveduras irradiadas.
- Avaliar o metabolismo de síntese de proteínas das leveduras irradiadas.
- Verificar a integridade do DNA das leveduras irradiadas.
- Avaliar a ocorrência de apoptose em leveduras irradiadas.
- Verificar a ocorrência de alterações ultra-estruturais nas leveduras irradiadas.
- Avaliar a perda de virulência das leveduras irradiadas.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICATIVA

Até o momento não existe vacina para a esporotricose, nem vacinas em uso para micoses de importância médica. Dessa forma, torna-se necessário pesquisar alternativas que possam ser aplicadas na pesquisa de vacinas contra enfermidades provocadas por fungos.

A esporotricose em animais deve ser considerada como uma doença potencialmente zoonótica (BARROS et al, 2001; DUNSTAN et al, 1986a; FLEURY et al., 2001; NAKAMURA et al, 1996; NAKAMURA et al, 1999; NUSBAUM et al, 1983) e a população felina como uma categoria de alto risco (FLEURY et al, 2001; SCHIAPPACASSE et al, 1985).

Os gatos eliminam leveduras continuamente através de exsudatos das lesões cutâneas e fezes, por esse motivo apresentam risco potencial para inalação e subsequente desenvolvimento da esporotricose disseminada em humanos imunocomprometidos, que compartilham o meio ambiente com felinos infectados (DUNSTAN et al, 1986a).

Tendo em vista o aumento na ocorrência da doença no Brasil, em especial no Rio de Janeiro (tendo o gato como principal agente transmissor), a falta de vacina eficaz e as dificuldades no tratamento, a pesquisa de uma vacina de uso veterinário para a esporotricose é de grande relevância. Neste projeto estudamos os efeitos da radiação ionizante sobre as leveduras de *S. schenkii* visando o desenvolvimento de uma vacina baseada em leveduras radioatenuadas.

A aplicação da vacina com levedura radioatenuada contra a esporotricose seria na vacinação de gatos e cães com o objetivo de evitar a transmissão para o homem e também preservar a saúde do animal, uma vez que a eutanásia nos animais é uma opção aceita quando o período de tratamento se estende. Muitos autores sugerem que a transmissão da infecção para humanos pode ocorrer por simples contato com felino, recomendando, assim, após o diagnóstico definitivo, a eutanásia dos animais infectados (ZANRI-SAAD et al, 1990; WIGNEY, OXENFORD, 1993). Portanto, a eutanásia vem sendo recomendada mesmo antes da tentativa de tratamento.

Esse trabalho visa contribuir para o controle da enfermidade evitando a transmissão para os seres humanos e também para a proteção da saúde de animais de estimação.

CAPÍTULO 4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. HISTÓRIA

A esporotricose foi descrita pela primeira vez em 1898, nos Estados Unidos, por um estudante de medicina da Universidade Johns Hopkins Hospital em Baltimore. O fungo isolado, nesse caso, foi classificado como do gênero *Sporotrichum*. O segundo caso foi relatado em 1900 por Hektoen e Perkins, que isolaram o patógeno de uma amostra aspirada de lesões cutâneas de um paciente, classificando o agente etiológico de *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN, PERKINS, 1900). Em 1903, na Europa, foi descrito o primeiro caso e mais de duzentos outros nos dez anos seguintes. Lutz e Splendore, em 1907, reportaram o primeiro caso no Brasil, descobrindo também que era possível a cultura do fungo *in vitro*. Howard, em 1961, descreveu a transição dimórfica do *S. schenckii* (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006). Em 1952, Singer e Muncie sugeriram pela primeira vez a possível transmissão da esporotricose felina ao homem.

4.2. ESPOROTRICOSE

A esporotricose é a mais freqüente das micoses subcutâneas e ocorre em quase todas as regiões do mundo, no campo ou na cidade, sendo a micose profunda de maior prevalência global (LIMA, PEREIRA, 1988). Ocorre com maior freqüência em zonas temperadas e tropicais. Atualmente parece estar circunscrita ao Continente Americano (zona centro-sul) e Japão. O maior número de casos vem do México e Brasil. Na América do Sul é muito freqüente também no Uruguai, Colômbia e Venezuela. No Brasil, ocupa o segundo lugar em prevalência entre as micoses profundas, sendo superada apenas pela paracoccidioidomicose (BEHELLI, CURBAN, 1988), mas há variações conforme região. Em São Paulo, ocupa o segundo lugar, no Rio Grande do Sul é a micose subcutânea mais freqüente e na Amazônia ocupa o quarto lugar (RESENDEL, FRANCO, 2003).

É uma doença subaguda ou crônica do homem e de animais inferiores. Na maioria das vezes, é uma infecção benigna, com lesões polimórficas que se limitam à pele e ao tecido celular subcutâneo, embora nos gatos seja muito comum o comprometimento de órgãos vitais em determinado estágio da doença, quando o tratamento é tardio. Em humanos, raramente

pode disseminar-se para ossos e órgãos internos e mais raramente ainda pode ser doença primariamente sistêmica, tendo início pulmonar (RESENDEL, FRANCO, 2003).

Usualmente, o *S. schenkii* penetra no organismo humano por trauma envolvendo o rompimento da integridade da epiderme, mas inalação, aspiração ou ingestão do fungo também podem produzir a doença (BELKNAP, 1989). O agente não parece ser capaz de penetrar a pele intacta, salientando-se o papel do traumatismo que se dá por pequenos cortes, abrasões e puntura com material contaminado, permitindo ao fungo atingir camadas mais profundas, onde poderá assumir a forma parasitária (DUSTAN et al, 1986).

A esporotricose, em muitas ocasiões, deve ser considerada como moléstia profissional, havendo relatos de epidemias entre certas profissões (FURTADO, ARMOND, 1981). A maior incidência é observada entre trabalhadores que lidam com o solo e vegetais, como jardineiros, floristas, mineiros, agricultores, carpinteiros, etc (BARROS et al, 2004). Estudos anteriores referem-se à esporotricose como “doença roseira” após pessoas terem se ferido em espinhos infectados pelo fungo.

Surtos epidêmicos de esporotricose têm sido descritos, tendo o mais conhecido ocorrido na década de 40, na África do Sul, com aproximadamente 3.000 garimpeiros infectados por suportes de madeira nas minas de ouro (VISMER, EICKER, 1994). Um surto em 1988, nos Estados Unidos, afetando 84 trabalhadores que participavam de um programa de reflorestamento em 15 estados, foi associado com a manipulação do musgo *Sphagnum magellanicum* (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006). Outro surto, dessa vez na Austrália, foi descrito, envolvendo indivíduos em contato com feno antes da infecção (O'RELLY, ALTMAN, 2006). Na América do Sul, a maioria dos casos relatados é em pacientes do Brasil, onde a esporotricose chegou a ser responsável por 0,5% de todas as doenças de pele no estado de São Paulo. No Uruguai, mais de 80% dos casos de esporotricose foram diagnosticados em caçadores de tatu (LOPES et al, 1999).

Apesar de ser geralmente diagnosticada no homem como uma importante infecção micótica, a esporotricose tem sido identificada em uma variedade de espécies animais, sendo assim, uma outra via de transmissão da enfermidade para o homem (HENNEMANN et al, 2003). Os animais portadores da doença podem transmiti-la a partir da mordedura, arranhadura e picada.

A transmissibilidade da esporotricose de animais para humanos não era muito clara na literatura, várias referências relatam que a esporotricose não é transmitida de animais para

humanos. Porém, outras relatam que a esporotricose é potencialmente transmitida para o homem. Foram relatados casos da doença seguindo bicada de galinha e papagaio, picada de insetos, dentada e manuseio de peixe, mordida de cão, mordida de preá e rato, mordida e arranhadura de gato, sendo este último, o animal atualmente mais implicado na transmissão para o homem (DUSTAN et al, 1986). Desde 1980 os gatos domésticos têm adquirido importância na transmissão da esporotricose para o homem (SCHUBACH, SCHUBACH, 2000). Estes animais podem contrair a doença também graças ao hábito de arranhar pedaços de madeira, ou em brigas por alimento ou disputa por território com outros gatos (MEDLEAU, HNILICA, 2003).

As referências que relatam essa transmissão potencial da esporotricose de animais para seres humanos podem ser confirmadas com o que foi descrito como a maior epidemia de esporotricose devido à transmissão zoonótica, entre 1998 e 2004, no Rio de Janeiro, que afetou principalmente áreas com condições sócio-econômicas menos favorecidas. Nesse período, somente no Instituto Evandro Chagas, 1503 gatos, 64 cães e 759 casos humanos foram diagnosticados isolando-se o fungo (BARROS et al, 2004). Como regra, os casos felinos precedem os caninos e humanos e os indivíduos mais afetados foram donas de casa em contato com gatos contaminados. O contato domiciliar ou profissional com gatos infectados foi identificado em 84,1% dos casos caninos e 84,7% dos casos humanos. Sendo que destes últimos, 57,1% revelaram ter sofrido arranhões ou mordidas (BARROS et al, 2004).

Diferentemente de outras espécies, os gatos infectados possuem um grande número de leveduras em suas lesões cutâneas, apresentam um crescimento profuso do fungo no tecido infectado (WERNER, WERNER, 1993) e ainda presença de muitas estruturas leveduriformes nos macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos e células epitelióides vacuoladas dispersas (KIER et al. 1979; GONZALES CABO et al, 1989). Estes animais continuamente eliminam o fungo por exsudatos e fezes, o que pode caracterizar o potencial zoonótico da esporotricose felina (DUSTAN et al, 1986). Ainda no caso dos felinos, não foram relatadas predisposições quanto à raça, sexo ou faixa etária (CARVALHO et al, 1991; ETTINGER et al, 1992).

Em 18 casos relatados na literatura veterinária, apenas um felino infectado era fêmea, todos os outros eram machos. (ETTINGER et al, 1992). Examinando 571 casos de felinos com esporotricose, Davies e Troy (1996) destacaram a predisposição em jovens, machos e imunocomprometidos. Para Read e Sperling (1982); Dunstan et al (1986a); Carvalho et al (1991); Werner e Werner (1993), os felinos que vivem ao ar livre, ou machos, pelo seu hábito

à atividade externa e agressividade, têm uma tendência à infecção (HENNEMANN et al, 2003).

A baixa capacidade patogênica do *S. schenckii* foi descrita por Gonzalez Cabo et al. (1989) e talvez por esse motivo não possa ocorrer transmissão de humano para humano.

Os sintomas, tanto em humanos quanto em animais, incluem feridas pelo corpo, dores nas articulações, perda de apetite, febre e ínguas. Geralmente os sintomas começam com uma lesão na pele que começa a inflamar se transformando em uma espécie de úlcera purulenta. Quando não tratada, as feridas se alastram por todo o corpo. Nos felinos, as lesões ocorrem mais comumente nas extremidades e cabeça (DUSTAN et al, 1986a; WERNER, WERNER, 1993), base da cauda e escroto (DUSTAN et al, 1986a) e pode ser fatal. Já nos seres humanos, as lesões, na maioria das vezes, localizam-se nos membros superiores e rosto e com menor frequência nos membros inferiores e raramente no tronco (WERNER, WERNER, 1993). Caracteriza-se pela dermatite piogranulomatosa difusa ou nodular com poucas ou sem a presença de levedura de *S. schenckii* (DUNSTAN et al, 1986a) e dificilmente leva ao óbito. Raramente são relatados casos de esporotricose felina de ocorrência natural, porém, literatura recente, ressalta que gatos infectados representam o maior risco zoonótico (HENNEMANN et al, 2003).

A esporotricose é considerada um risco para as pessoas expostas ao fungo, como as que trabalham com jardins, em florestas e minas e manipulam amostras laboratoriais, assim como médicos veterinários, auxiliares e estudantes de veterinária, (KOBAYASHI, YAMAMOTO, 2002; NUSBAUM et al, 1983; READ, SPERLING, 1982; WERNER, WERNER, 1993).

Espinosa-Texis *et al* (2001), estudaram 50 pacientes com esporotricose, destes 62% eram mulheres, 34% crianças e adolescentes abaixo de 20 anos de idade e 28% adultos com mais de 50 anos de idade. A doença foi predominante em agricultores (44%) seguida por donas de casa (30%).

4.3. SPOROTHRIX SCHENCKII

O *S. schenckii* é um fungo geofílico, de reprodução assexuada, termodimórfico, encontrado na natureza na forma micelial, entre 25° e 30°C passando a forma leveduriforme quando em parasitismo, à 36°C (FINDLAY, VISMER, 1986; NOBRE et al, 2003). Considerado saprófito de cascas de árvores e de solos ricos em matéria orgânica e vegetação apodrecida, crescendo principalmente em locais quentes e úmidos. Na forma micelial, há

formação de uma película enrugada, que adere ao meio de cultura, muito resistente, apresentando às vezes micélio aéreo (CARVALHO et al., 1991; CRUZ, 1985; DUNSTAN et al, 1986a; GARRISON et al, 1979; GONZALEZ CABO et al, 1989; ZAMRI-SAAD et al, 1990; WERNER, WERNER, 1993; WIGNEY, OXENFORD, 1993).

Na forma parasitária, crescendo em lesões dermo-epidérmicas, viscerais e ósseas ou quando cultivado em meios ricos, como ágar infusão de cérebro e coração à 37°C, passa à forma levedura (XAVIER et al, 2004). Nestas condições, as células são em forma de cigarro, arredondadas ou ovóides.

Microscopicamente os micélios apresentam delgadas hifas finas, hialinas, septadas, delicadamente ramificadas, com aglomerados de conídios pigmentados (2 a 6 micrômetros de diâmetro), com paredes celulares grossas, surgindo de conidióforos (MADRID et al, 2006) e (ETTINGER et al, 1992). Macrósporos são produzidos por algumas linhagens de *Sporothrix spp.*, sendo considerados característicos do microrganismo.

As formas leveduriformes são pleomórficas: podem ser observadas microscopicamente células de tamanhos variados, redondas, ovóides ou em forma de charuto. A estrutura das leveduras de *S. schenckii* tanto *in vitro* como *in vivo*, são semelhantes. Em ambos os casos as células caracterizam-se pela presença de inclusões opacas no citoplasma e de material microfibrilar na superfície externa da parede celular (GARRISON et al, 1979).

A identificação de *S. schenckii* deve basear-se na transformação da forma micelial para a forma leveduriforme, ou vice-versa, ou pela inoculação em animais de laboratório, para a demonstração de patogenicidade. Existem linhagens apatogênicas de *Sporothrix spp* (ETTINGER et al, 1992).

A transformação de uma fase para outra é reversível. O fungo é capaz de viver em saprofitismo em vegetais, detritos de plantas com material orgânico, solo ou água contaminados, bem como na boca e pêlos de animais e na cavidade orofaríngea humana.

Pertence ao reino Fungi, Divisão Ascomycete, à subdivisão Deuteromycotina, à classe Hyphomycetes, gênero *Sporothrix* e espécie *S. schenckii*, (KWON-CHUNG, BENNET, 1992).

A parede celular do *S. schenckii* desempenha um papel central na interação patógeno-hospedeiro, mediando vários processos associados com a patogênese desses microrganismos. A presença de melanina na parede celular pode ter um papel protetor, atuando na neutralização de radicais livres (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006).

Estudos moleculares recentes têm avaliado a diversidade genética de *S. schenckii*, demonstrando que diferentes grupos de cepas de *S. schenckii* estão relacionados com diferentes origens geográficas (GUTIERREZ-GUALHARDO et al, 2008; MARIMON et al, 2006; O'REILLY, ALTMAN, 2006). Além disso, Marimon et al (2007) propuseram, através de estudos fisiológicos e moleculares, a existência de três espécies novas de *Sporothrix* (REIS et al, 2006).

O período de incubação da enfermidade pode variar de 1 a 12 semanas. (HACHISUKA, SASAI, 1981; SCHIAPPACASSE et al, 1985).

4.4. VIRULÊNCIA

Uma grande variedade de fungos apresenta fatores que os auxiliam na sua sobrevivência, tanto no ambiente quanto no hospedeiro, que são os fatores de patogenicidade. Muito pouco é conhecido sobre os fatores que contribuem para a virulência do *S. schenckii*, no entanto, alguns são estudados por diversos pesquisadores, como a termotolerância, dimorfismo, enzimas extracelulares e a melanina (NOBRE et al, 2005).

Melaninas são pigmentos marrons escuros ou pretos, produzidas por microrganismos, plantas e animais, compostos de vários tipos de monômeros fenólicos ou indólicos, geralmente combinadas com proteínas ou com carboidratos. Embora não sejam essenciais para o crescimento e desenvolvimento, aumentam a chance de sobrevivência e competitividade no meio ambiente (JACOBSON, 2000; NOBRE et al, 2004).

A DHN (1,8 dihidroxinaftaleno) é a mais bem caracterizada melanina fúngica, também conhecida como melanina pentacetídeo, que ocorre em muitos ascomicetos e deuteromicetos. O mecanismo pelo qual os pigmentos aumentam a virulência nos fungos não é conhecido, mas estudos desenvolvidos demonstram que a melanina é um importante fator de virulência, conferindo proteção celular contra estresses ambientais como irradiação ultravioleta e dissecação, e proteção contra a ação do sistema de defesa do hospedeiro (DOERING et al, 1999; JACOBSON, 2000; TSAI et al, 1998).

Romero-Martinez et al (2000) documentaram a presença dos grânulos de melanina DHN na parede dos conídios de *S. schenckii*. Estes observaram que células melanizadas foram mais resistentes à ação de fagócitos do que as células que não apresentavam melanina. Através da microscopia eletrônica de transmissão, Morris-Jones et al (2003) demonstraram a presença de uma fina camada de melanina na célula leveduriforme de *S. schenckii*, embora as

colônias tivessem mantido coloração creme. O trabalho demonstrou que o *S. schenckii* possui a capacidade de sintetizar melanina tanto na forma leveduriforme como na micelial (MATTEI et al, 2006) .

As proteínas secretadas pelas leveduras de *S. schenckii*, principalmente a proteína de 70 kDa (proteína tirosino kinase de 70kDa) que é essencial na transdução da sinalização nos linfócitos T e células natural killer (NK), são capazes de ativar uma resposta humoral e conseqüente produção de altos níveis de anticorpos e inibir a fagocitose do fungo pelos macrófagos. Sendo assim, estes antígenos modulam a resposta imune na esporotricose e contribuem para a patogenicidade do fungo (NASCIMENTO, 2004).

O dimorfismo do *S. schenckii* é comprovadamente um dos fatores relacionados à virulência, atribuindo ao agente maior capacidade de proteção diante ao sistema imune do hospedeiro suscetível.

Outros fatores relacionados à virulência têm sido estudados, como a possível correlação entre a termotolerância e as formas clínicas da micose, considerando que isolados incapazes de crescer em temperaturas superiores a 37°C, estariam associados com a forma cutânea fixa da micose, enquanto isolados termotolerantes estariam aptos a se desenvolver nos órgãos internos.

Em relação ao tempo de cultivo de conídios, foi observado que os cultivados por um período de 7 dias são mais virulentos, quando comparados com aqueles cultivados a 10 dias, sendo ainda detectadas diferenças entre a composição da parede celular dessas estruturas (KAJIWARA et al, 2004).

Silva et al (2007), considerando o crescente número de casos de esporotricose nos animais domésticos, especialmente em felinos, assim como a importância de se definir os aspectos relacionados à patogenicidade do agente, comparou a evolução clínica de ratos Wistar inoculados com isolado felino e canino de *S. schenckii* provenientes de casos clínicos da doença e de acordo com os resultados obtidos neste estudo, propôs que a quantidade de pigmentos no isolado felino pode estar envolvido com a maior patogenicidade do agente quando em forma parasitária, porém são necessários novos estudos que confirmem esta possibilidade, assim como a avaliação de outros fatores envolvidos na virulência do *S. schenckii*.

4.5. FORMAS CLÍNICAS

A esporotricose é uma doença subaguda ou crônica caracterizada por lesões polimórficas da pele e do tecido subcutâneo, com freqüente comprometimento dos vasos linfáticos adjacentes, que se inicia por inoculação do *S. schenckii* na pele. A disseminação secundária para articulações, músculos e ossos é rara, assim como manifestações viscerais da doença, de origem respiratória.

A enfermidade afeta qualquer idade, raça ou sexo. Antigamente era mais comum em homem branco, adulto devido à exposição ocupacional e recreacional. Várias formas clínicas de esporotricose podem ser observadas dependendo da virulência do fungo, da profundidade, do tamanho do inóculo e do estado imunológico do hospedeiro. A enfermidade apresenta as seguintes manifestações clínicas (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006):

4.5.1. CUTÂNEO LINFÁTICA

É a forma mais comum de manifestação da esporotricose (cerca de 80%). Tem como lesão inicial um nódulo desenvolvido no sítio de inoculação, que pode ulcerar e a partir dele, forma-se um cordão endurecido que segue pelo vaso linfático em direção aos linfonodos e, ao longo dele, forma-se outros nódulos, que também podem ulcerar, dando um aspecto de “rosário” (FIG. 1). Pode ocorrer o surgimento de ínguas, que na maioria das vezes, são discretas. Esta descrição clínica levou a nomear a doença como Linfangite ascendente nodular.

Nos humanos essa doença raramente afeta o estado geral do paciente. Porém, nos felinos é relatada apatia e declínio geral do animal (READ, SPERLING, 1982).

Nos felinos, autoinoculação pelo ato de lambar-se pode resultar em lesões distantes do local inicial da infecção (WERNER, WERNER, 1993) (FIG. 2A e B).



FIGURA 1 – Forma cutâneo linfática da esporotricose em humano. Fonte: ZAITZ et al, 1998). Disponível em: <http://www.micologia.com.br/esporotricose.shtml>

4.5.2. LOCALIZADA

Caracterizada por lesões nodulares localizadas em áreas expostas onde a inoculação ocorreu (FIG. 3), ou seja, o fungo permanece confinado ao local de inoculação. É o próprio cancro inicial ou esporotricoma sem comprometimento linfático que, usualmente, reflete alto grau de imunidade do hospedeiro.

A esporotricose localizada pode representar um alto grau de imunidade para a infecção. 25% dos gatos inoculados com *S. schenckii*, em um estudo, tiveram cura espontânea da doença, indicando que a esporotricose pode ser mais comum do que é diagnosticada (WERNER, WERNER, 1993) (FIG. 4).

4.5.3. DISSEMINADA OU MÚLTIPLA

As lesões nodulares, ulceradas ou verrucosas se disseminam pela pele (FIG. 5, 6A e B). É observada principalmente entre pacientes imunossuprimidos, em especial, indivíduos HIV positivos (DONABEDIAN et al, 1994; SHAW et al, 1989). A infecção desenvolve-se, via propagação tecidual, do local inicial da inoculação para os ossos, pulmões, fígado, baço, rim, trato gastrointestinal, SNC, olhos, articulações, epidídimo, glândula mamária e linfonodos, ou pela via hematogena. (GOAD, PECQUET GOAD, 1986; KIER et al, 1979; WERNER,

WERNER, 1993). Embora o imunocomprometimento possa ser um fator importante nestes casos, a causa específica de imunossupressão não tem sido estabelecida em todos os casos (WERNER, WERNER, 1993).



FIGURA 2 – Felino com esporotricose. Lesões falacróticas, ulceradas, encimadas por crostas hemáticas, formato geográfico, disseminadas com acometimento principalmente de regiões cefálica, pavilhões auriculares (A) e membros (B). Evolução de cerca de 4 meses. Fonte: Sociedade Brasileira de Dermatologia Veterinária. Disponível em: <http://www.sbdv.com.br>



FIGURA 3 – Forma cutânea localizada da esporotricose em humano. Fonte: ZAITZ et al, 1998). Disponível em: <http://www.micologia.com.br/esporotricose.shtml>

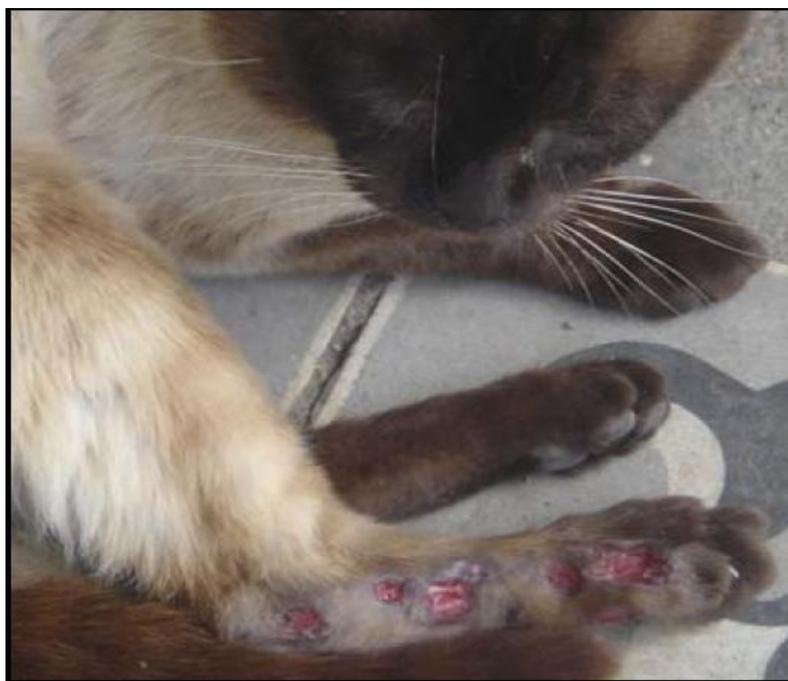


FIGURA 4 – Forma cutânea localizada da esporotricose em felino. Múltiplas lesões ulceradas no membro pélvico esquerdo do F9. Fonte: Setor de Micologia, FV- UFPel, 2007 (MADRID, 2007).



FIGURA 5 – Forma cutâneo disseminada da esporotricose em humano. Fonte: SIDRIM, ROCHA, 2004). Disponível em: <http://www.micologia.com.br/esporotricose.shtml>

4.5.4. MUCOSA (OCULAR, NASAL, OUTROS)

Envolvimento da mucosa não é comum, mas pode ocorrer, e preferencialmente afeta a mucosa ocular (VIEIRA DIAS et al, 1997) (FIG. 7).

4.5.5. EXTRACUTÂNEA (PULMONAR , OSTEOARTICULAR E SISTÊMICA)

De ocorrência mais rara, na qual a infecção atinge outros órgãos (pulmão, testículos, ossos, articulações e sistema nervoso). Nessa forma, a via de contaminação costuma ser a ingestão ou inalação do agente etiológico e também pode haver imunodepressão associada ao surgimento. Entre as formas extracutâneas, a pulmonar e osteoarticulares são as mais comuns, mas há relatos de casos graves de disseminação hematogênica com acometimento de múltiplos órgãos.

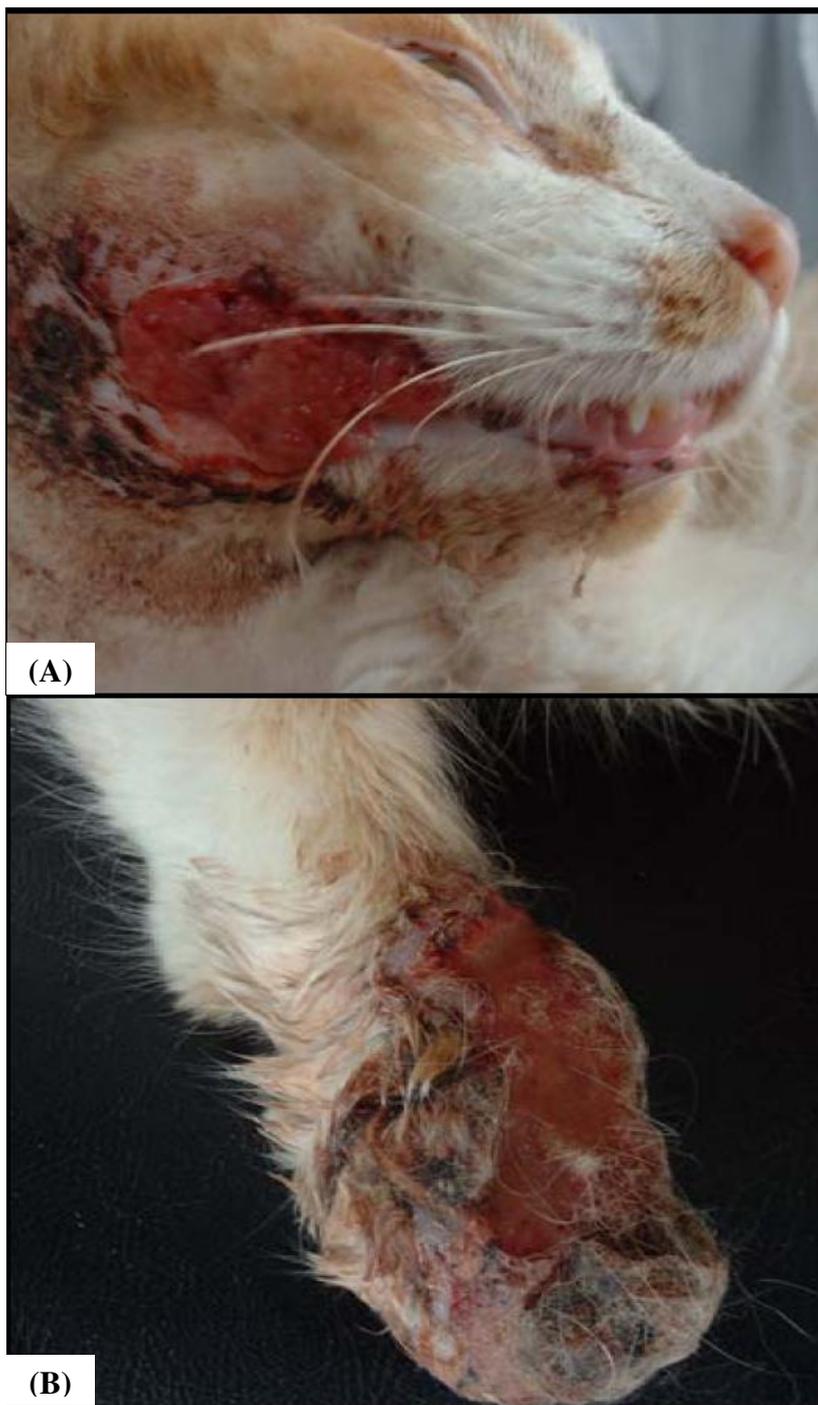


FIGURA 6 – Forma cutâneo disseminada da esporotricose em felino. Lesão ulcerada e destruição tecidual em face (A) e membro torácico direito no F3 (B). Fonte: (MADRID, 2007)



FIGURA 7 – Forma mucosa da esporotricose em humano. Comprometimento ocular e nasal. Fonte: SIDRIM, ROCHA, 2004). Disponível em: <http://www.micologia.com.br/esporotricose.shtml>

4.5.6. RESIDUAL (REGRESSÃO ESPONTÂNEA, HIPERSENSIBILIDADE, ERITEMA NODOSO E MULTIFORME)

Em locais com um grande número de casos da doença, relatos de ocorrência de regressão espontânea e reações de hipersensibilidade, como eritema nodoso e multiforme não são raros (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006).

A doença aparece nos animais com o mesmo aspecto que nos seres humanos, ou seja, feridas e lesões de mucosa, mas tem um curso diferente entre os dois (DONADEL et al, 1993). Nos gatos pode haver disseminação a partir do foco cutâneo inicial o que sugere uma imunossupressão ao fungo (DUSTAN et al, 1986).

Clinicamente os animais apresentam lesões no dorso do tronco e na cabeça. As extremidades também podem estar concomitantemente afetadas. As lesões caracterizam-se por formações circulares, elevadas, com alopecia e crostas, em grande número e com ulceração central. No caso de disseminação da doença, podem estar presentes anormalidades oculares neurológicas e linfáticas (BARCELOS et al, 2005). A forma que a doença assume provavelmente é determinada pela resposta imunológica do hospedeiro (DUSTAN et al, 1986).

4.6. DIAGNÓSTICO

Infelizmente a doença só é detectada quando sinais evidentes, como feridas pelo corpo, ou apenas uma ferida, geralmente no nariz fica perceptível.

O diagnóstico de esporotricose pode ser afirmado pela demonstração do microorganismo em exsudados ou em amostras de tecidos, pelo isolamento do microorganismo por meio de técnica de cultura, ou pela inoculação em animais de laboratórios com material infectado. Não é comum a visualização direta do microorganismo nos exsudatos, por se encontrarem em baixas quantidades nestes materiais (WOLF, TROY, 1995).

Segundo Dunstan et al (1986a) o diagnóstico de esporotricose é estabelecido com maior facilidade através da obtenção de 6mm de amostra biopsiada da lesão cutânea, utilizando-se a metade para análise histopatológica e a outra metade para análise micológica (cultura). A cultura do fungo é o meio definitivo para o diagnóstico, mas são necessários 10 a 14 dias para identificação. O diagnóstico histopatológico é mais rápido, mas ainda existe uma certa confusão. O exame citológico serve como um diagnóstico preliminar. Amostras de tecidos e exsudatos são considerados suspeitos até o diagnóstico definitivo ser firmado

Em virtude das muitas formas clínicas que apresenta, a esporotricose simula numerosas dermatoses, afecções neoplásicas e infecções parasitárias (*Demodex* ou *Pelodera*) e reação a corpo estranho devem ser excluídas ao diagnosticar a esporotricose (MEDLEAU, HNILICA; 2003; TILLY, SMITH, 2003).

4.6.1. MICROSCOPIA DIRETA

A observação microscópica do fungo no material clínico é realizada por meio de colorações convencionais como Gram e Giensa. Nestes casos, a visualização do fungo é difícil, podendo confundir-se com células inflamatórias presentes abundantemente no material. Resultados melhores são conseguidos com imunofluorescência, que emprega anticorpos específicos marcados com uma substância fluorescente à radiação ultravioleta como a rodamina, fluoresceína, etc (CRUZ, 1985).

4.6.2. TESTES SOROLÓGICOS

É feito inoculando, de forma intradérmica, a esporotriquina no animal suspeito (CRUZ, 1985; HACHISUKA, SASAI, 1981). Quando houver uma reação inflamatória no local, com aumento da espessura da pele, o teste será positivo. É importante salientar que animais não infectados também podem reagir positivamente ao teste (CRUZ, 1985). Sendo assim, este é um meio auxiliar de diagnóstico (HENNEMANN et al, 2003).

4.6.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO

Para evitar contaminação, o material a ser coletado para o isolamento deve ser, preferencialmente, o gânglio fechado. O material deve ser triturado e a seguir é feita uma suspensão em salina. Esta suspensão é semeada no meio de Sabouraud com cloranfenicol e ciclohexamida, em tubo de ensaio e a incubação é feita em temperatura ambiente. Deverá ser feito um outro cultivo em ágar infusão de cérebro e coração, com incubação em estufa a 37°C. A pigmentação da colônia é um aspecto importante para a caracterização do *S. schenckii*. Inicialmente ela é creme, tornando-se depois marrom chocolate e finalmente marrom escuro, quase negro. À microscopia observa-se hifas finas septadas e pequenos conídeos colocados na extremidade de diminutos esterigmas em um conidióforo ou nascendo diretamente da hifa (CRUZ, 1985).

4.6.4. INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL

A reprodução da doença é feita pela inoculação em camundongos e ratos, pela via intraperitoneal (desenvolve peritonite em 5 dias) e em cobaia pela via intratesticular (produz orquite em 5 a 10 dias). O diagnóstico é confirmado através da evidenciação do *S. schenckii* nos animais inoculados (CRUZ, 1985).

4.7. TRATAMENTO

Embora casos de cura espontânea tenham sido reportados, principalmente para a forma cutânea localizada, a maioria dos pacientes requer longos tratamentos. O prognóstico é excelente quando se institui o tratamento adequado, exceto na forma disseminada fulminante, formas viscerais ou quando o paciente se encontra muito debilitado por doença associada.

Diferentes drogas são utilizadas no tratamento de esporotricose, dentre elas o iodeto de potássio, cetoconazol, itraconazol, terbinafina, fluconazol e anfotericina B. A escolha do medicamento baseia-se na extensão das lesões cutâneas, na avaliação de interações medicamentosas e efeitos adversos, no envolvimento sistêmico e nas condições clínicas do indivíduo (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006).

A primeira droga utilizada com sucesso no tratamento da esporotricose foi o Iodeto de Potássio, formulada como solução saturada com, aproximadamente 142 g de iodeto de potássio em 100ml de água. Não é recomendado durante a gravidez (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006). Em áreas endêmicas ou em epidemias a solução de iodeto de potássio permanece como uma alternativa efetiva e de baixo custo (KAUFFMAN et al, 2000). Os felinos, são particularmente sensíveis aos compostos iodados desenvolvendo iodismo. Anorexia, vômito, depressão, contração muscular, hipotermia, cardiomiopatia, colapso cardiovascular e morte são alguns dos sinais de intoxicação (WERNER, WERNER, 1993).

O Cetoconazol tem sido utilizado no tratamento da esporotricose, mas ainda apresenta resultado variável, principalmente nos casos de doença disseminada. Atua inibindo o crescimento fúngico através da inibição da síntese do ergosterol, um componente vital para a membrana celular fúngica. (ETTINGER et al, 1992; WERNER, WERNER, 1993). A associação de Cetoconazol e anfotericina B é utilizada por alguns autores, sendo que esta última, além de apresentar uma resposta moderada à esporotricose disseminada, é uma droga que tem seu uso limitado pela severa nefrotoxicidade (WERNER, WERNER, 1993).

O Itraconazol tem as mesmas indicações descritas para o iodeto de potássio porém essa droga também é utilizada em pacientes imunodeprimidos com formas clínicas mais extensas e comprometimento sistêmico. Também não é indicado durante a gravidez (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006). É o tratamento de escolha na maioria dos casos, apresentando eficácia próxima de 100% (KAUFFMAN et al, 2000). Seu mecanismo de ação é semelhante ao cetoconazol, agindo inibindo a biosíntese do ergosterol. Tem uma elevada afinidade pela membrana fúngica e o ergosterol é um componente essencial da membrana celular fúngica, se a sua

síntese é diminuída, a membrana torna-se defeituosa. Os precursores do ergosterol acumulam-se continuamente, aumentando o volume da célula fúngica, podendo causar a ruptura da mesma (MUNDELL, 1990).

Embora não sendo formalmente indicada no tratamento da esporotricose, estudos têm mostrado sucesso terapêutico da Terbinafina. Essa droga tem as mesmas indicações descritas para o itraconazol, porém são observadas menos interações medicamentosas do que as relatadas para o itraconazol (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006).

Existem relatos de tratamento bem sucedido com fluconazol, mas esse fármaco não é de primeira escolha.

A anfotericina B é indicada para o tratamento da esporotricose de formas clínicas moderadas a graves, em indivíduos imunossuprimidos e para indivíduos que não responderam ao tratamento com os fármacos citados acima (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006). É utilizada no início do tratamento da doença disseminada, sendo substituída pelo itraconazol na terapia de manutenção (KAUFFMAN et al, 2000).

A duração do tratamento até a cura clínica dura de 6 a 8 semanas, aproximadamente, em paciente imunocompetentes (LOPEZ-BEZERRA et al, 2006).

Hipertemia local, vacinação com antígeno esporotriquina e aplicação tópica de agentes anti-fúngicos são alternativas e suplementos para a terapia com fármacos. Compressas quentes que elevam a temperatura da pele acima de 42°C em menos de 30 minutos duas vezes ao dia associado com a terapia de iodeto de potássio, promovem uma melhora clínica mais rápida (WERNER, WERNER, 1993).

A vacinação com esporotriquina têm seu uso limitado e é utilizada em pacientes que não respondem ao tratamento com iodeto ou calor. Segundo Larsson et al (1989) a aplicação intradérmica de esporotriquina contribui nos casos de evolução benigna, obtendo-se grande êxito nesta forma de vacinoterapia.

O uso de suplementos como cetoconazol tópico pode auxiliar na melhora das lesões, porém o potencial de auto-inoculação ou transmissão zoonótica é preocupante (WERNER, WERNER, 1993). O tratamento da esporotricose deve ser continuado 3 a 4 semanas após o período de recuperação clínica, pois o fungo pode permanecer no sítio de cicatrização por um período de 6 meses (WERNER, WERNER, 1993).

O uso de corticóides está contra indicado nos casos de convalescença, uma vez que as lesões têm reaparecido após seu uso (HACHISUKA, SASAI, 1981; LARSSON et al, 1989).

4.8. VACINAS COM PATÓGENOS ATENUADOS

Vacinas constituídas de patógenos atenuados têm sido utilizadas com sucesso na prevenção de muitas doenças. A grande vantagem atribuída a esse tipo de imunização é relacionada à capacidade dos microrganismos atenuados de apresentarem seus antígenos sequencialmente ao hospedeiro e poderem sintetizar antígenos que só são produzidos durante a infecção. Estes mimetizam a infecção natural sendo capazes de desencadear uma resposta imune protetora duradoura, devido ao estabelecimento de uma memória imunológica, mas sem o risco de uma infecção progressiva (HIRAMOTO et al, 2002).

Um exemplo bem sucedido e bastante conhecido é a vacina BCG utilizada na prevenção da tuberculose. O microrganismo, *Mycobacterium bovis*, foi atenuado acidentalmente após o cultivo da bactéria *in vitro* por um período prolongado de 13 anos. Após sucessivas passagens da amostra em cultura foi observada perda gradual da virulência e alterações da sua morfologia sem alteração da sua imunogenicidade. A BCG tem sido utilizada com êxito sem registros de grandes complicações (ANDRADE et al, 2005). A vacina tríplice viral, constituída de vírus vivos atenuados, contra sarampo, caxumba e rubéola, também tem se mostrado eficaz desde seu licenciamento no início da década de 70. Os eventos imediatos de hipersensibilidade após a administração da vacina são extremamente raros, sendo contraindicada apenas em pessoas com história de reação anafilática após ingestão de ovo ou da neomicina contida na formulação da vacina (ANDRADE et al, 2005).

Existem muitas indicações de que vacinas vivas atenuadas são efetivas na proteção contra infecções fúngicas. Camundongos imunizados pela via subcutânea com leveduras de *Blastomyces dermatitidis* deficientes na proteína de adesão BAD1 (*Blastomyces* adhesion 1) sobreviveram a um desafio letal com a cepa nativa virulenta (WÜTHRICH et al, 2000). Uma vacina similar para *Histoplasma capsulatum* também foi efetiva (WÜTHRICH et al, 2003). Um mutante geneticamente modificado de *Coccidioides posadasii*, deficiente para o gene da enzima quitina sintetase, foi capaz de induzir imunidade e resistência em camundongos (OKEKE et al, 2003). Um mutante avirulento de *Coccidioides immitis* no qual genes para a enzima quitinase foram deletados induziu imunidade em camundongos vacinados pela via subcutânea (CUTLER et al, 2007). Outro exemplo importante é a vacina viva atenuada

utilizada no controle da dermatofitose bovina causada pelo *Trychophyton verrucosum*, que tem permitido o controle da enfermidade (GUDDING et al, 1986). Proteção tem sido obtida também utilizando-se variantes naturais do fungo que perderam a patogenicidade, como uma variedade de *Candida albicans* que perdeu a capacidade de filamentar (CENCI et al, 1989).

4.8.1. RADIAÇÃO IONIZANTE – FERRAMENTA NA ELABORAÇÃO DE VACINAS

Um dos problemas associados a vacinas vivas atenuadas é a possibilidade de reversão da virulência. Na proposta deste projeto este problema é minimizado devido à utilização da radiação ionizante para realizar a atenuação.

Muito empregada na esterilização de alimentos e produtos hospitalares, a radiação ionizante também pode ser utilizada na produção de vacinas (WALES, KUSEL, 1992), pelo fato de produzir danos diretos ou indiretos sobre as moléculas associadas à reprodução dos seres vivos.

A aplicação de doses específicas de radiação gama provoca uma extensiva fragmentação do DNA, além da capacidade de reparo da célula (DEMICHELI et al, 2007). A fragmentação do DNA leva a uma perda irreversível da capacidade de reprodução e conseqüentemente da virulência, mas preserva algumas de suas funções biológicas, permitindo ao patógeno estimular uma resposta imunológica específica.

As irradiações com raios gama e raios X se apresentaram de forma consistente como bons agentes de atenuação para uma variedade de patógenos. Os microrganismos radioatenuados, freqüentemente, perdem a sua capacidade patogênica, mantendo seus aspectos morfológicos e a capacidade de estimular uma resposta imune específica. Em alguns casos os patógenos atenuados por radiação ionizante, por razões ainda não esclarecidas, são mais imunogênicos que os controles não irradiados (WALLES, KUSEL, 1992).

Além da ação sobre os processos reprodutivos dos agentes ou indução de morte fisiológica, alguns fenômenos relacionados a alterações de proteínas induzidas pela ação direta da radiação ou através de radicais produzidos durante a radiólise da água são sugestivos de uma melhor resposta imunológica (PINHO et al, 1995). Tal fato provavelmente decorre da oxidação das proteínas, levando a uma fagocitose preferencial por células imunes, através de receptores *scavenger* (CARDI et al, 1998), sendo uma importante ferramenta para a produção de imunógenos (GALISTEO JR., 2004).

Vacinas baseadas em microrganismos vivos atenuados por radiação ionizante têm sido estudadas desde 1950. Vacinas com parasitas irradiados já foram utilizadas com bons resultados tanto para helmintos como para protozoários (WALLES, KUSEL, 1992).

Uma vacina radioatenuada contra o *Dictyocaulus viviparus*, nematódeo causador da bronquite parasitária em bovinos, tem sido utilizada com êxito desde 1958 (TAYLOR et al, 1986). Em adição, larvas irradiadas utilizadas no controle da bronquite parasitária provocada por *D. filaria sp.* em carneiros e cabras (SHARMA et al, 1988), e na imunização de cães contra *Ancylostoma caninum* (VINAYAK et al, 1981) têm sido empregadas em escala comercial.

Cordeiros vacinados com larvas infectantes de *Gaigeria pachyscelis* irradiadas resistiram, com êxito, à uma infecção letal. Nos cordeiros vacinados, as manifestações de resistência foram demonstradas por uma acentuada redução do estabelecimento do verme, no retardo do seu desenvolvimento, na sua esterilidade e na ausência de sinais clínicos da ancilostomíase após a infecção desafio (ANSARI, SINGH, 1978).

Imunizações efetivas em animais de laboratório têm sido alcançadas utilizando vários protozoários irradiados, incluindo espécies de *Plasmodium* (CLYDE, 1990; HERRINGTON et al, 1990), *Leishmania* (BONETTI et al, 2002; RIVIER et al, 1993; YANG et al, 1991), *Trypanosoma* (VOS, GARDINER, 1990) e o *Toxoplasma gondii* (DUQUESNE et al, 1991; HIRAMOTO et al, 2002). Estudos em modelos animais utilizando cercárias radioatenuadas de *Schistosoma mansoni* também conferiram alto grau de proteção, contra a esquistossomose (COULSON, 1997).

Além dos exemplos citados acima, resultados satisfatórios foram obtidos com muitos helmintos e nematódeos, incluindo *Onchocerca volvulus* (PRINCE, et al, 1992), *Brugia malayi* (YATES, HIGASHI, 1986), *Brugia pahangi* (CHUSATTAYANOND, DENHAM, 1986), *Toxocara canis* (ABO-SHEHADA et al, 1991), *Nippostrongylus brasiliensis* (WEDRYCHOWICZ et al, 1984), *Trichinella spiralis* (AGYEI-FREMPONG, CATTY, 1983) e *Ascaris suum* (URBAN, TROMBA, 1982) e várias espécies de *Schistosoma* (DEAN, 1983).

A vacinação de camundongos BALB/c com larvas infectantes de *Brugia malayi* e *B. pahangi* (espécies de parasitas nematóides causadores da filariose ou elefantíase) atenuadas por radiação, foi avaliada. Camundongos vacinados apresentaram uma redução de 95,5% dos vermes recuperados na infecção desafio de *B. malayi* em comparação com a infecção

controles não-vacinados e uma redução de 93,8% no grupo *B. pahangi* (HAYASHI et al, 1984).

Um exemplo instrutivo é o da vacina que utiliza cercarias de *Shistosoma mansoni* atenuadas pela radiação que confere imunidade e proteção, superando qualquer formulação que tem como base proteínas purificadas ou recombinantes (COULSON, 1997).

Outro exemplo é a vacina com esporozoítos irradiados de *Plasmodium falciparum*, que foi testada em voluntários humanos sendo constatada o desenvolvimento de imunidade protetora contra a malária (HOFFMAN et al, 2002). Essas duas vacinas possibilitaram um maior conhecimento de mecanismos de indução e manutenção da resposta imune protetora, assim como dos antígenos protetores (COULSON, 1997).

A primeira vacina contra toxoplasmose foi desenvolvida através da atenuação do parasita causador (*Toxoplasma gondii*) através da radiação gama. Foram avaliados o desenvolvimento da imunidade sistêmica e intestinal e a resistência à infecção em diferentes camundongos imunizados por via oral e parenteral com taquizoítos irradiados pelo Cobalto 60, a uma dose de 255 Gy e desafiados com cistos da cepa ME-49. Foi conferida proteção a todos os esquemas avaliados (GALISTEO, 2008). Após o desafio com cistos, houve um aumento na sobrevivência dos animais imunizados. Os taquizoítos irradiados perderam sua capacidade reprodutiva, mantendo atividades metabólicas como respiração, capacidade de invasão de células e de sintetizar proteínas (HIRAMOTO et al, 2002).

Bonetti et al (2002) confirmaram que após irradiação das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com dose de 1500 Gy houve destruição total dos materiais nucléico e citoplasmático, o que gerou perda da capacidade metabólica e impedimento da capacidade respiratória e reprodutiva do parasito. No entanto, sua membrana citoplasmática não sofreu alterações morfológicas, o que indica que a célula continuou sendo reconhecida como viável pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), como o macrófago. Foi demonstrado ainda, que os protozoários irradiados desencadearam uma resposta imunológica, em camundongos suscetíveis, melhor que nos modelos desafiados pela infecção natural de *Leishmania*. As células esplênicas dos camundongos imunizados reconheceram melhor os parasitas irradiados, sem, no entanto o desenvolvimento de lesão cutânea no local do inóculo, ou em qualquer outra parte do corpo dos animais. Tanto na sua imunogenicidade quanto na sua morfologia, as cepas de *Leishmania amazonensis* tiveram suas características preservadas ou até mesmo otimizadas, enquanto seu crescimento, reprodução e patogenicidade foram inibidos, demonstrando assim a eficiência do uso deste modelo de imunização e a sua utilidade em

estudos futuros de produção de fármacos e até mesmo de uma vacina contra leishmaniose cutânea (BONETTI et al, 2002).

No laboratório de Radiobiologia do CDTN foram desenvolvidas leveduras de *P. brasiliensis* (agente etiológico da paracoccidioidomicose) atenuadas por irradiação gama. Estas leveduras perderam a capacidade de produzir infecção e de se multiplicar, porém mantiveram preservadas sua viabilidade, atividade metabólica e a capacidade de sintetizar os mesmos antígenos presentes nas leveduras nativas (DEMICHELI et al, 2006). Conservaram também a morfologia e os aspectos ultraestruturais fundamentais, embora uma extensiva degradação do DNA tenha sido verificada (DEMICHELI et al, 2007). Foi demonstrado que a imunização de camundongos susceptíveis BALB/c com as leveduras radioatenuadas foi capaz de conferir uma proteção potente e duradoura contra desafios subsequentes com formas altamente virulentas de *P. brasiliensis* (MARTINS et al, 2007). Estes trabalhos foram pioneiros em demonstrar o potencial da atenuação por radiação gama para o desenvolvimento de vacinas contra doenças fúngicas, abrindo um leque de possibilidades na busca de vacinas para micoses.

CAPÍTULO 5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. CAMUNDONGOS

Camundongos machos BALB/c com 6 a 8 semanas de idade foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Os animais foram mantidos sob condições livres de patógenos específicos.

Os protocolos, utilizados neste trabalho para os experimentos realizados com animais, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) número do protocolo 179/09.

5.2. CULTURA

A cultura de leveduras do *Sporothrix schenckii*, amostra ATCC, foi cedida pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

O fungo foi inicialmente cultivado na forma micelial, em meio ágar mycosel, na temperatura de 26°C e em seguida foram obtidas as leveduras cultivando-se à 35⁰C, em meio ágar BHI (infusão de cérebro e coração) suplementado com solução de tiamina 0,5% e Cloranfenicol (0,1mg/mL). A forma micelial demonstrou crescimento rápido, apresentando-se como uma colônia inicialmente branca amarelada, membranosa, posteriormente tornando-se pregueada e escurecida. Na forma parasitária ou leveduriforme, a colônia se apresentou com uma coloração creme. As FIG. 8 e 9 mostram, respectivamente, as formas leveduriforme e micéial em cultivo.

O fungo, em meio ágar BHI a 35°C, foi mantido em tubos inclinados e repicado a cada 7 dias. A forma micelial em ágar Mycosel a 26°C, também foi mantida em tubos inclinados e também repicado a cada 7 dias. A forma micelial foi mantida para eventual recuperação da forma leveduriforme. Para tal, fragmentos do micélio foram implantados no meio se cultura, descrito anteriormente para o cultivo de leveduras, e o material incubado a 35°C. Após 7 dias a cultura com predomínio de leveduras era repicada e mantida nas mesmas condições.

Após o cultivo em meio de cultura por período prolongado, o *S. schenckii* perde a virulência, sendo necessário recuperá-la segundo descrito no item 5.3.



FIGURA 8 – Cultura de *S. schenckii* na forma leveduriforme crescendo em meio BHI na temperatura de 37°C. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/mycology>



FIGURA 9 – Cultura de *S. schenckii* na forma micelial crescendo em meio Mycosel, na temperatura de 20°C. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/mycology>

5.3. IMUNOSSUPRESSÃO COM RADIAÇÃO GAMA

Para a recuperação da virulência, camundongos machos BALB/c foram submetidos à irradiação gama, com a dose de 2,5 Gy e taxa de dose de 129 Gy/h. Os animais foram mantidos em condições estéreis e infectados, 24 horas após a irradiação pela via traqueal com 10^7 leveduras de *S. schenckii*. As irradiações foram realizadas no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do CDTN. Após 15 dias, os animais foram sacrificados e os órgãos (pulmão, baço e fígado) removidos e utilizados para recuperação de UFC's.

5.4. IRRADIAÇÃO GAMA

As culturas de leveduras do *S. schenckii* em meio sólido BHI (Infuso Cérebro Coração) e em placas de Petri foram irradiadas com doses variando de 1.0 a 9,0 kGy e uma placa irradiada com 12 kGy. As irradiações foram realizadas no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do CDTN, na presença de oxigênio, em fonte uniforme de ^{60}Co . A taxa de dose utilizada foi de 1500 Gy/hora. Após a irradiação foram avaliadas a capacidade de multiplicação, a viabilidade e a atividade metabólica das leveduras.

5.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE REPRODUÇÃO (CRESCIMENTO) DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

A capacidade de multiplicação foi avaliada pela habilidade das leveduras de formar colônias. Após cada dose de irradiação, as placas, em duplicata, foram removidas do irradiador e as culturas ressuspendidas em 1mL de PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer e inóculos com concentrações crescentes, variando de 10^3 a 10^7 células foram plaqueados. Foi feito, também, um inóculo massivo com número incontável de células na dose de 12 kGy e plaqueado. As placas foram incubadas por até 7 dias a 35°C e as unidades formadoras de colônias (UFC) contadas. O meio utilizado para o plaqueamento foi o BHI ágar suplementado com solução de tiamina 0,5% e cloranfenicol (0,1mg/mL).

5.6. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

A viabilidade das leveduras irradiadas com diferentes doses de radiação gama foi avaliada utilizando-se do Kit FungaLight CFDA, AM/ Propidium Iodide (invitrogen), através da microscopia de fluorescência. Este Kit combina um substrato para esterase com um indicador de integridade da membrana, o iodeto de propídio, para avaliar a viabilidade celular. O éster acetoximetil (AM) do substrato de esterase 5-diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) permite que este reagente permeie as membranas celulares. Uma vez dentro da célula, os grupos lipofílico e diacetato são separados pela clivagem promovida por esterases não específicas, resultando em um composto fluorescente que por ser carregado deixa a célula muito lentamente. Em contraste, o indicador de integridade de membrana, iodeto de propídio penetra as leveduras com membranas danificadas. Utilizando uma mistura adequada dos dois componentes as células com a esterase ativa e a membrana íntegra se coram de verde e as células inviáveis de vermelho.

Foram feitos repiques de *S. schenckii* em placas com meio BHI. Após dois dias foram realizadas as irradiações e o experimento. Foram utilizadas as doses de 6, 7, 8 e 9 kGy. Uma placa não irradiada foi utilizada como controle positivo. A viabilidade foi avaliada, para cada dose, 2 e 24 horas após a irradiação. As células foram contadas e 10^6 células de cada amostra foram colocadas em tubos eppendorfs. Completou-se o volume para 1ml com PBS. Em cada eppendorf, foi acrescentado 1 μ L de CFDA,AM e 5 μ L de iodeto de propídio. Protegeu-se o material da luz com papel laminado e este foi incubado a temperatura ambiente por 2 horas. Foi feita a leitura no microscópio de fluorescência. Os comprimentos de onda máximos de excitação/emissão para esses corante são de 492/517 para o CFDA,AM e 490/635 nm para o Iodeto de Propídio.

5.7. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE SÍNTESE DE PROTEÍNAS DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

Para estimar a capacidade de síntese de proteínas das leveduras irradiadas com as diferentes doses testadas, estas foram ressuspendidas em PBS e inoculadas em meio líquido (BHI) contendo ^{35}S - Metionina. Para 10 mL de meio, com inóculo inicial de 10^7 células, foram acrescentados 10 μCi de ^{35}S - Metionina. As células foram incubadas por 16 horas a 35°C. Após essa etapa, a cultura foi centrifugada, à 3000 rpm, a 4°C por 15 minutos, e as leveduras coletadas. As células foram lavadas por 3 vezes em PBS e rompidas com pérolas de

vidro, no tampão Tris (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0), contendo 1 mM de PMSF, 1 mM de iodoacetamida, 1 mM de EDTA e 1mM de pepstatina. Para a lise foram realizados seis ciclos de 30 segundos no vortex, com o material permanecendo 1 min no gelo entre cada ciclo. Logo em seguida, a cultura foi centrifugada à 3000 rpm, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e a quantidade de proteína determinada pelo método de Lowry.

A radioatividade incorporada às proteínas foi determinada pela contagem em cintilador líquido. Para tal uma solução contendo 1,0 mg de proteína foi adicionada a 4,5mL de líquido de cintilação (Insta-Gel Plus). As contagens foram realizadas no analisador de cintilação líquida e expressas em contagens por minuto (cpm).

5.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

Após determinada a dose de radiação gama que afeta a capacidade de multiplicação nas leveduras mas conserva a viabilidade e a atividade metabólica, estas foram avaliadas quanto à capacidade de provocar infecção. A avaliação foi monitorada a partir da recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC`s) de camundongos infectados com a levedura irradiada.

A capacidade de provocar infecção das leveduras irradiadas foi avaliada em camundongos BALB/c imunossuprimidos. Quinze camundongos machos BALB/c imunossuprimidos através de radiação gama (como descrito no item 5.2) foram utilizados. Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: grupo Controle Positivo, composto por 5 camundongos imunossuprimidos infectados com as leveduras virulentas; grupo 7 kGy I, composto por 5 camundongos imunossuprimidos infectados com as leveduras irradiadas a 7 kGy e grupo 9 kGy I, composto por 5 camundongos imunossuprimidos infectados com a levedura irradiada a 9 kGy. Os camundongos foram infectados pela via traqueal com $0,5 \times 10^7$ células em 60 μ L. Após 13 dias de infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos (pulmão, baço e fígado) homogeneizados em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15 M, pH 7,2. Em seguida, 100 μ L do macerado foi plaqueado em meio BHI (infuso cérebro-coração) – ágar suplementado com tiamina. Após 15 dias de incubação das placas à 35°C, as colônias foram contadas e os resultados expressos em número de UFCs por grama de tecido por camundongo (UFCs/g).

5.9. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

A extração do DNA das células irradiadas e controles foi realizada seguindo o protocolo do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). O DNA foi extraído 2 e 24 horas após a irradiação.

A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260 nm. A qualidade da extração foi avaliada pela razão das absorções a 260 nm e 280 nm, sendo que só foram utilizadas amostras cuja razão permaneceu entre 1,8 e 2,0. O DNA das leveduras foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (5µg/mL). As bandas de DNA foram visualizadas em um transiluminador UV.

5.10. DETECÇÃO DE APOPTOSE NAS LEVEDURAS IRRADIADAS

A detecção de apoptose foi realizada utilizando-se o kit de Detecção de Apoptose SR-FLICA que utiliza um peptídeo inibidor de caspase acoplado a sulforodamina (FLICA). Estes inibidores penetram pelas membranas celulares e não são citotóxicos.

Caspases são um grupo de cisteíno-proteases essenciais à apoptose celular. Uma vez dentro da célula, Flica se liga covalentemente à caspase ativa e inibe a atividade enzimática. Parte de Flica é retido na célula, acoplado à enzima e o restante, desacoplado, é difundido para fora da célula durante a etapa de lavagem. Os sinais vermelhos, observados no microscópio de fluorescência, são uma medida direta do número de enzimas caspases ativas presentes nas células no momento em que os reagentes foram acrescentados.

Foram feitos repiques de *S. schenckii* em duplicata para placas com meio BHI. Após dois dias foram feitas as irradiações e o experimento. A dose de radiação utilizada foi de 7,0 kGy. O controle positivo não foi irradiado. Após a irradiação células foram contadas e 10^7 células foram colocadas em tubos eppendorfs. As células foram lavadas duas vezes em PBS e reconstituídas em 1mL de PBS. Deste volume, 200 µL foram transferidos para outro tubo eppendorff e acrescidos de 10 µL da solução 30 x FLICA, sendo agitados levemente. O material foi incubado, no escuro, por 2 horas, a 37°C, com agitação eventual. Em seguida, foram adicionados 2ml de tampão de lavagem e as amostras agitadas. Centrifugou-se a 400 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante. O pellet foi levemente agitado e ressuspensionado em 1 mL de tampão de lavagem. Centrifugou-se a 400 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e descartou o sobrenadante. O pellet foi ressuspensionado em

300 μ L de tampão de lavagem. As amostras foram deixadas no gelo e observadas ao microscópio de fluorescência com comprimentos de onda de excitação de 550 nm e emissão > 580.

5.11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG.

Após o cultivo do fungo em meio apropriado, as células foram lavadas por três vezes em PBS. Entre cada lavagem as células foram centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos, a 4^oC, e o sobrenadante foi desprezado. Amostras do fungo irradiado com a dose de 7,0 kGy (2 e 24 horas após a irradiação) e controle foram preparadas.

Primeiramente o pellet foi lavado por 3 vezes, em seguida o mesmo foi ressuspendido e fixado em Karwosky nud (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 e deixado “overnight”. A solução foi lavada por 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 e centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm. O material foi incluído em ágar a 4% e fragmentos foram cortados. Os fragmentos foram fixados em seguida com tetróxido de ósmio 1%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 por 1 hora a 4^oC.

Após esta etapa os fragmentos foram lavados por 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 e subsequentemente desidratadas em uma série de álcool. Primeiramente os fragmentos foram desidratados durante 15 minutos em concentrações crescentes de 50%, 70% e 80%, em seguida desidratados por 2 vezes na concentração de 95%, durante 10 minutos. Finalmente foram desidratados 3 vezes na concentração de 100% por 10 minutos. Após essas desidratações os fragmentos foram desidratados 2 vezes em acetona 100% durante 15 minutos. Após essas etapas os fragmentos foram infiltrados em mistura Epon/acetona (2:1) “overnight”.

As leveduras foram observadas em microscópio de transmissão 120 kV e fotografadas.

5.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, seguida pelo teste de Bonferroni, que realiza a comparação de todos os grupos entre si. Adotou-se o nível de significância de 5%.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

6.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE REPRODUÇÃO (CRESCIMENTO) DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

Uma curva de sobrevivência em função da dose de radiação gama absorvida foi realizada e os resultados foram apresentados na FIG. 10. O número de sobreviventes decresce linearmente em função da dose de radiação. Com a dose de 6,0 kGy verificamos uma redução de 6 ciclos Log_{10} no número de sobreviventes. Em doses superiores a 8,0 kGy não verificamos sobreviventes (células capazes de formar colônias) quando inóculos de até 10^7 células foram utilizado para o plaqueamento. Por outro lado, quando repiques utilizando quantidades massivas e incontáveis de células foram realizados, verificou-se o crescimento eventual e escasso de colônias até a dose de 12 kGy, indicando a presença de algumas células de elevada radioresistência na população.

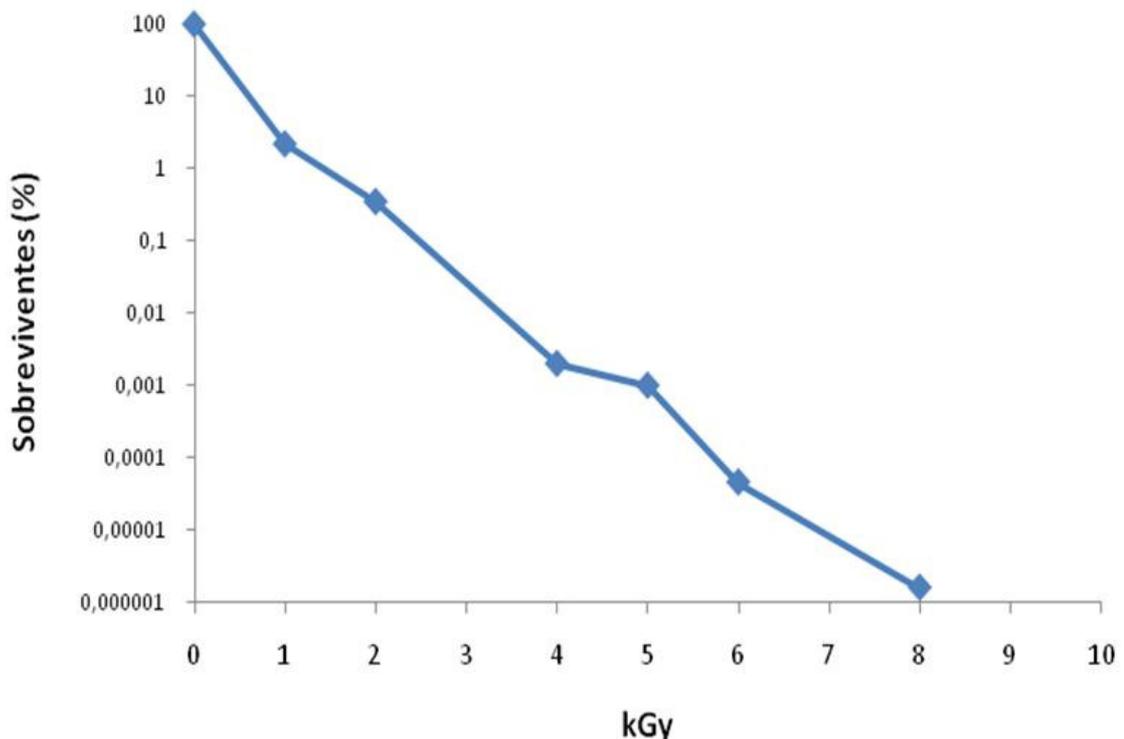


FIGURA 10 – Curva de sobrevivência das leveduras do *S. schenckii* em função da dose de radiação gama. As culturas foram irradiadas com doses variando entre 1 e 9 KGy. Com a dose de 6,0 kGy verificamos uma redução de 6 ciclos Log_{10} no número de sobreviventes e acima de 8,0 kGy não verificamos sobreviventes (células capazes de formar colônias). Esta curva representa uma média de dois experimentos independentes.

6.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

O estudo da viabilidade das células irradiadas foi realizado utilizando-se o Kit FungaLight CFDA, AM/ Propidium Iodide (invitrogen). Foram avaliadas a viabilidade das leveduras irradiadas com as doses de 6,0 a 9,0 kGy, doses onde a capacidade de multiplicação foi significativamente afetada. Neste teste as células vivas se coram de verde e as mortas em vermelho (Figura 11). A viabilidade foi avaliada duas e 24 horas após a irradiação (Figura 12). No Controle Positivo, como era de se esperar, as células estavam em sua maioria viáveis: 95,5% após 2 horas e 94,4% após 24 horas. As células irradiadas na faixa de 6,0 a 9,0 kGy conservaram a sua viabilidade em níveis similares aos controles.

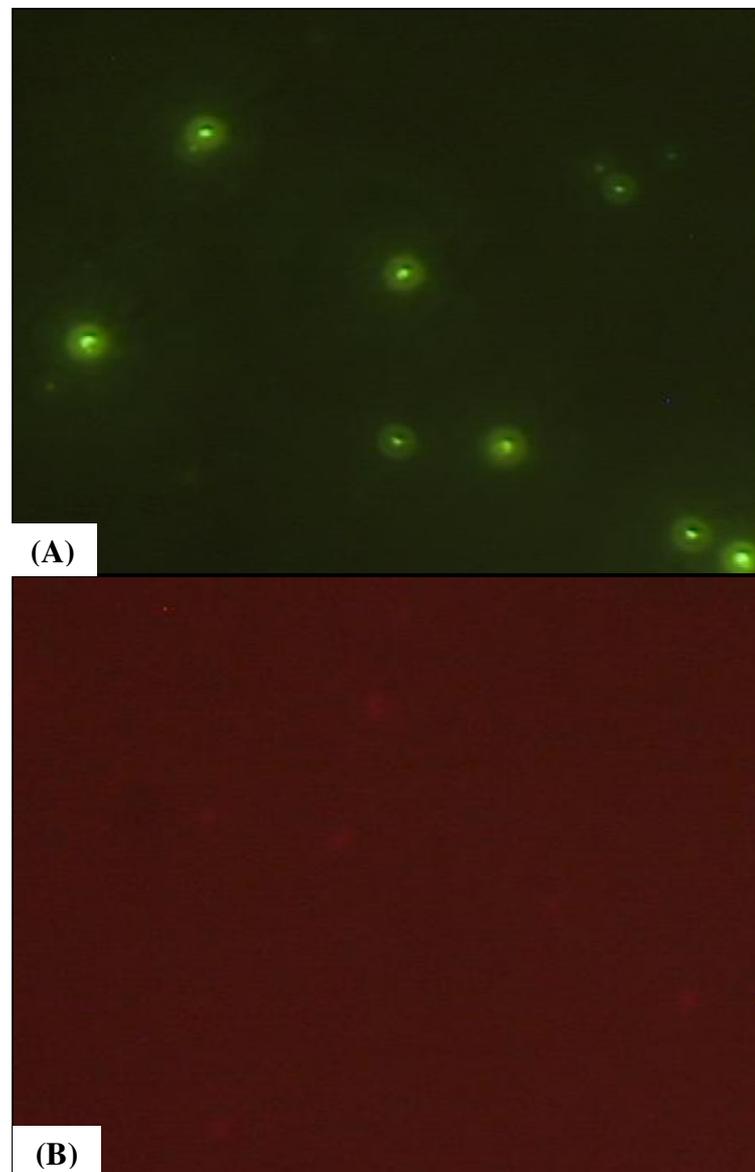


FIGURA 11 – Visualização no microscópio de fluorescência da viabilidade das leveduras de *Sporothrix schenckii* através do kit FungaLight CFDA,AM/Propidium Iodide. A) Leveduras viáveis com coloração esverdeada. B) Leveduras mortas coradas de vermelho.

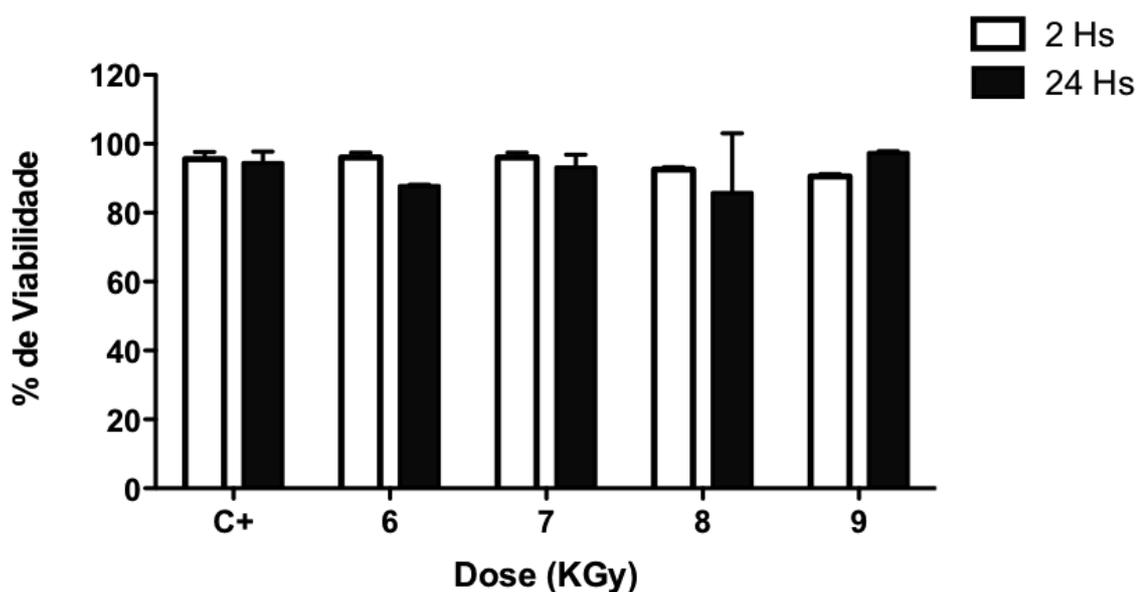


FIGURA 12 – Viabilidade das leveduras de *S. schenckii* em função da dose de radiação gama. As culturas foram irradiadas com doses de 6 a 9 KGy. Foi utilizado um controle positivo (C⁺) não irradiado. A viabilidade foi avaliada 2 e 24 horas após a irradiação. Os valores representam as medianas e desvios-padrão de dois experimentos.

6.3. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

O experimento de avaliação do metabolismo de síntese proteínas foi realizado para as doses de 4, 7 e 9 kGy. A capacidade de sintetizar proteínas foi mantida para todas as doses avaliadas (quando comparadas ao controle negativo constituído de células mortas pelo calor), porém em diferentes níveis (FIG. 13). Duas horas após a irradiação não foi verificada diferença estatística entre a incorporação de ³⁵S metionina nas diferentes doses, exceto em relação ao controle de células mortas. Após 24 horas da irradiação, houve diferença estatística significativa para todas as doses, quando comparadas ao controle positivo e quando comparadas ao controle negativo, apenas a dose de 9 kGy não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle de células mortas. Na dose de 4,0 kGy, 2 horas após a irradiação, não verificamos diferença significativa no nível de incorporação da ³⁵S- Metionina. Porém após 24 horas ocorreu um aumento acentuado desta incorporação sugerindo que um processo intenso de *turnover* estava em curso, provavelmente relacionado à reposição das proteínas oxidadas no processo de irradiação. Não houve diferença significativa na dose de 7,0 kGy entre 2 e 24 horas após irradiação, enquanto na dose de 9,0 kGy verificamos uma redução na síntese de proteínas 24 horas após a irradiação, indicando que este parâmetro foi severamente afetado pela radiação.

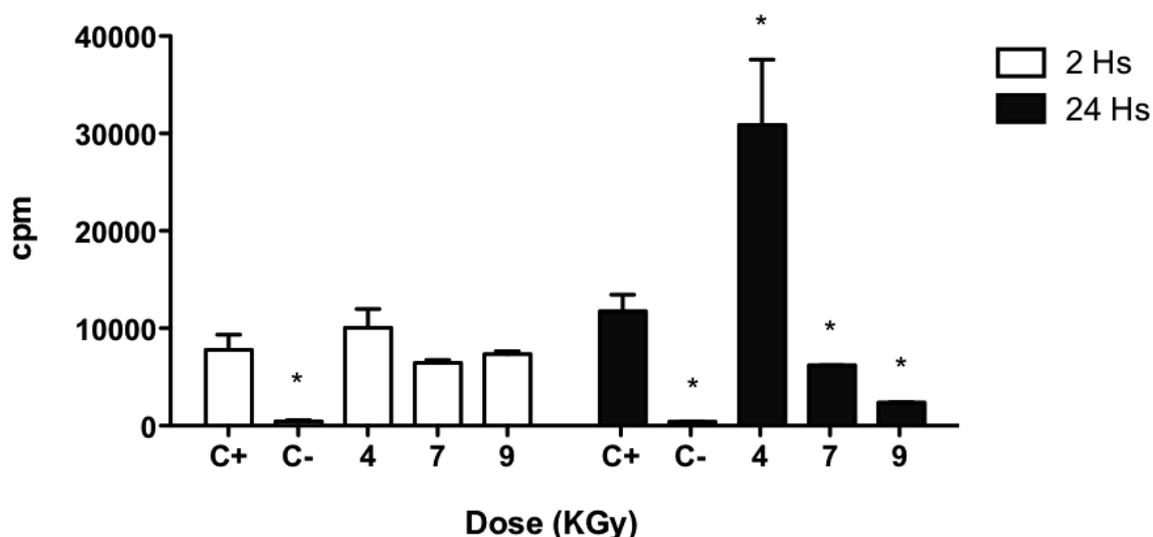


FIGURA 13 – Incorporação da 35S-Metionina em leveduras de *S. schenckii* em função da dose de radiação gama. As células de levedura foram irradiadas com doses crescentes de radiação gama e o metabolismo da síntese protéica acompanhada pela incorporação de [L 35S] methionine. C + controle não irradiado, C- células mortas por aquecimento. Os valores representam as medianas e desvios-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,01$ em relação ao controle positivo.

6.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

A análise da capacidade de produzir infecção das leveduras foi realizada através da inoculação das leveduras irradiadas e controles em camundongos BALB/c imunossuprimidos (com uma dose de radiação de 2,5 Gy) e posterior recuperação de UFCs dos pulmões, baço e fígado. Foram utilizadas leveduras irradiadas com as doses de 7,0 e 9,0 kGy.

Os resultados apresentados na TAB. 1 mostram que não foram recuperadas UFCs dos tecidos dos camundongos infectados com as leveduras irradiadas com as doses citadas, enquanto nos tecidos dos camundongos infectados com a levedura não irradiada (controle) foram recuperadas UFCs, principalmente no baço.

Esses resultados demonstram que as leveduras irradiadas com doses a partir de 7,0 kGy perdem a capacidade de produzir infecção.

TABELA 1 - Recuperação de UFCs em camundongos BALB/c imunossuprimidos

Órgão	LC (UFC*)	LI 7.0 kGy (UFC*)	LI 9.0 kGy (UFC*)
Pulmão	210 ± 45,55	0	0
Baço	714,2 ± 425,72	0	0
Fígado	12 ± 7,08	0	0

*UFCs por grama de tecido do camundongo (n = 5)

LC – Leveduras Controle

LI – Leveduras Irradiadas

6.5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA DAS LEVEDURAS IRRADIADAS

Foi avaliado o efeito da radiação gama, dose de 7,0 kGy, no DNA das leveduras irradiadas através de eletroforese em gel de agarose (FIG. 14). Os resultados demonstram que ocorreu um alto grau de fragmentação do DNA das leveduras após irradiação, enquanto que no DNA das leveduras controle não foi verificada fragmentação. A fragmentação pode ser verificada pela diminuição da intensidade da banda relacionada ao DNA genômico e o aparecimento de material, correspondendo ao DNA fragmentado, na parte inferior do gel.

6.6. DETECÇÃO DE APOPTOSE NAS LEVEDURAS IRRADIADAS

A análise de detecção de apoptose foi realizada utilizando-se o kit de Detecção de Apoptose SR-FLICA que utiliza um peptídeo inibidor de caspase, enzima essencial à apoptose celular, acoplado a sulforodamina (FLICA).

FLICA se liga à caspase ativa nas células apoptóticas, inibindo a atividade desta, ficando retido dentro da célula. As células apoptóticas são visualizadas na cor vermelha ao microscópio de fluorescência.

Os resultados apresentados na FIG. 15 mostram que não houve diferença significativa na ocorrência de apoptose entre as leveduras controle e irradiadas com a dose de 7,0 kGy, quando observadas 2 horas após a irradiação. Porém, quando analisadas 24 horas após a irradiação verificou-se um aumento discreto, mas significativo, no número de células apoptóticas em relação ao controle. Não se verificou diferença significativa no número de células apoptóticas 2 e 24 horas após a irradiação dentro de cada grupo (controle e irradiado). Os resultados como um todo indicam a indução de apoptose nas leveduras irradiadas com 7,0 kGy.



Figura 14 – Avaliação da integridade do DNA das leveduras em função da dose de radiação gama. Foi utilizado gel de agarose 1%. 1- Levedura não irradiada; 2 – Levedura irradiada com 7 kGy.

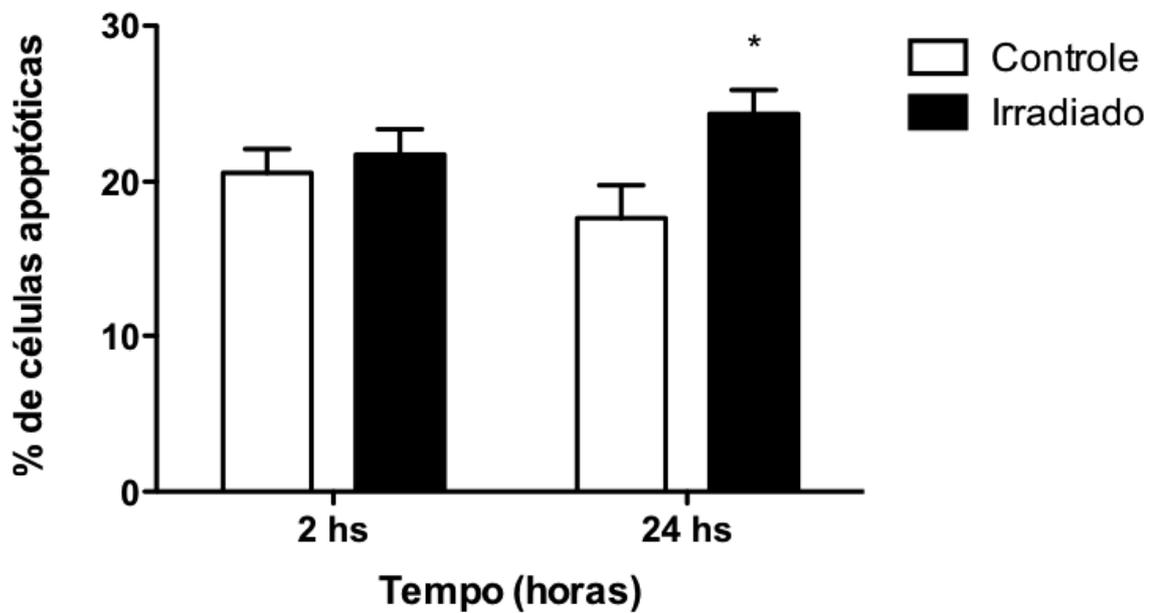


FIGURA 15 – Detecção de apoptose em leveduras de *S. Schenckii* irradiadas. Grupo (1) Controle não irradiado e Grupo (2) leveduras irradiadas com 7 kGy. * $p < 0,01$ em relação ao controle.

6.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A morfologia das leveduras de *S. schenckii* e a presença de alterações ultraestruturais nas leveduras irradiadas com 7,0 kGy, 2 e 24 horas após irradiação, foi analisada através da microscopia eletrônica de transmissão.

As FIG. de 16 a 22 apresentam a morfologia das células controle não irradiadas. As características ultraestruturais são semelhantes às descritos por LANE et al (1969). O aspecto geral das leveduras de *S. schenckii* é mostrado na FIG. 16. Verificamos a parede celular bem definida, citoplasma denso e homogêneo. Na FIG 17 a parede celular, membrana plasmática, grânulos de estocagem são mostrados em detalhes. Na FIG 18 o núcleo foi apresentado em evidência. As FIG. 19A e B apresentam mitocôndrias em detalhes e também o núcleo, com os aspectos característicos. Um corpúsculo lipídico típico é visto na FIG. 20 e um grande vacúolo no citoplasma preenchido com material eletrondenso é visualizado na FIG. 21. Vesículas secretoras estão presentes, como mostram as FIG. 22A e B.

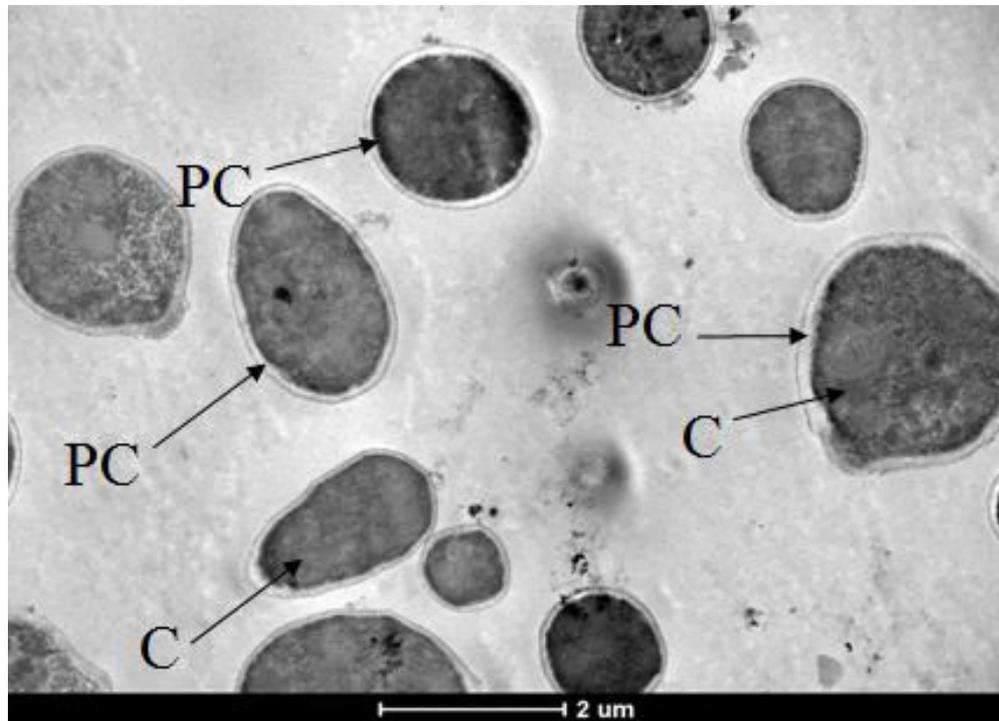


FIGURA 16 – Aspecto geral das leveduras controle de *S. schenckii*. Parede celular (PC) bem definida, citoplasma (C) homogêneo.

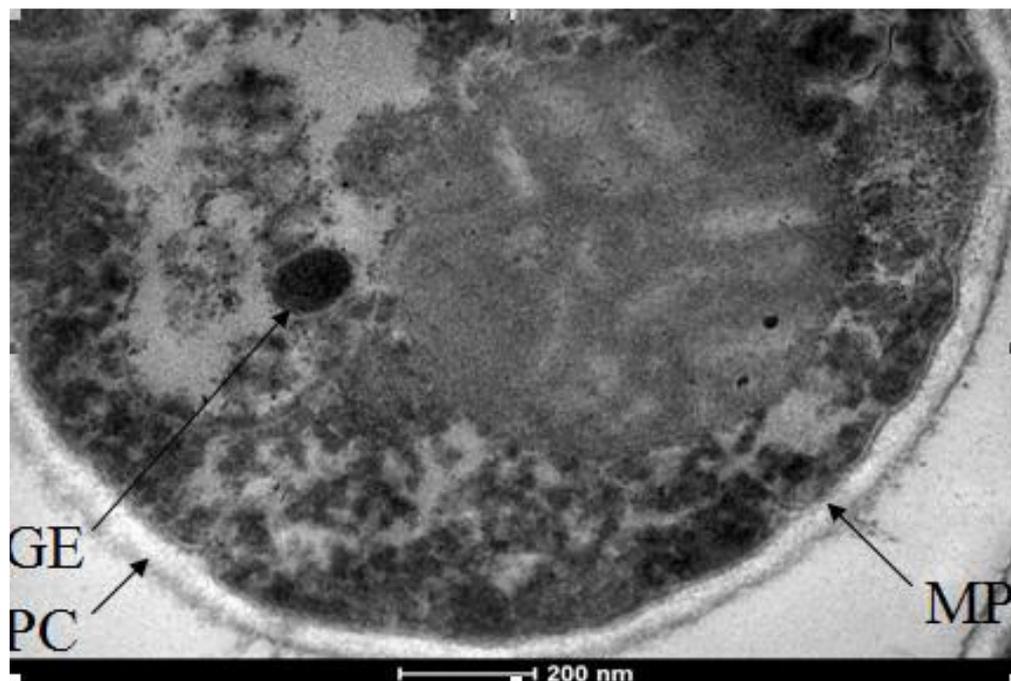


FIGURA 17 – Visão detalhada da parede celular, membrana plasmática e grânulo de estocagem das leveduras controle de *S. schenckii*. Parede celular (PC) e membrana plasmática (MP) intactas e presença de grânulos de estocagem (GE).

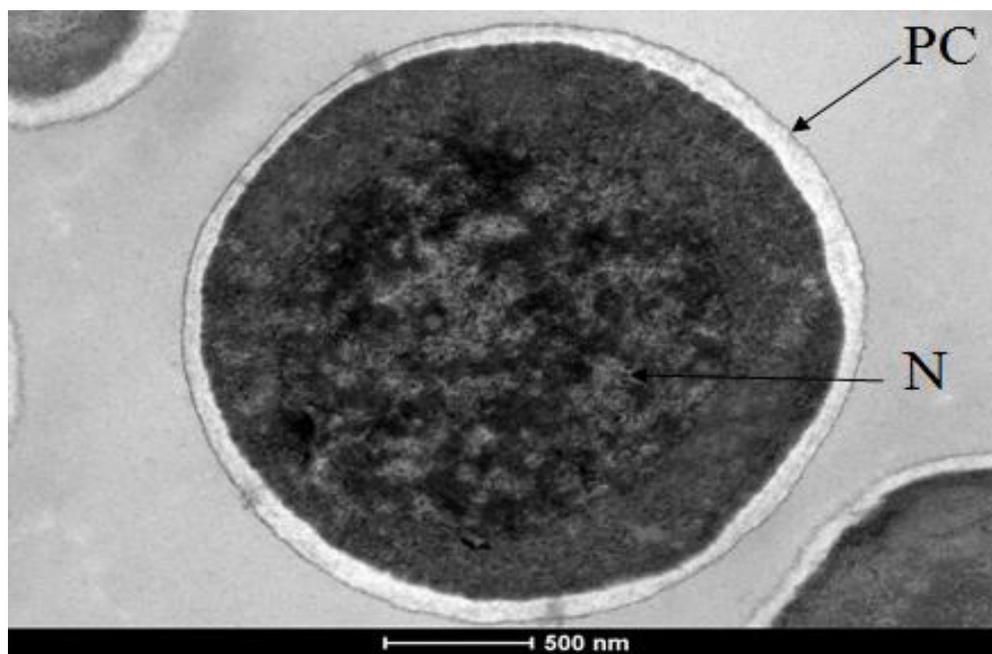


FIGURA 18 – Levedura controle de *S. schenckii* com o núcleo em evidência. Parede celular (PC) definida, citoplasma homogêneo e núcleo (N).

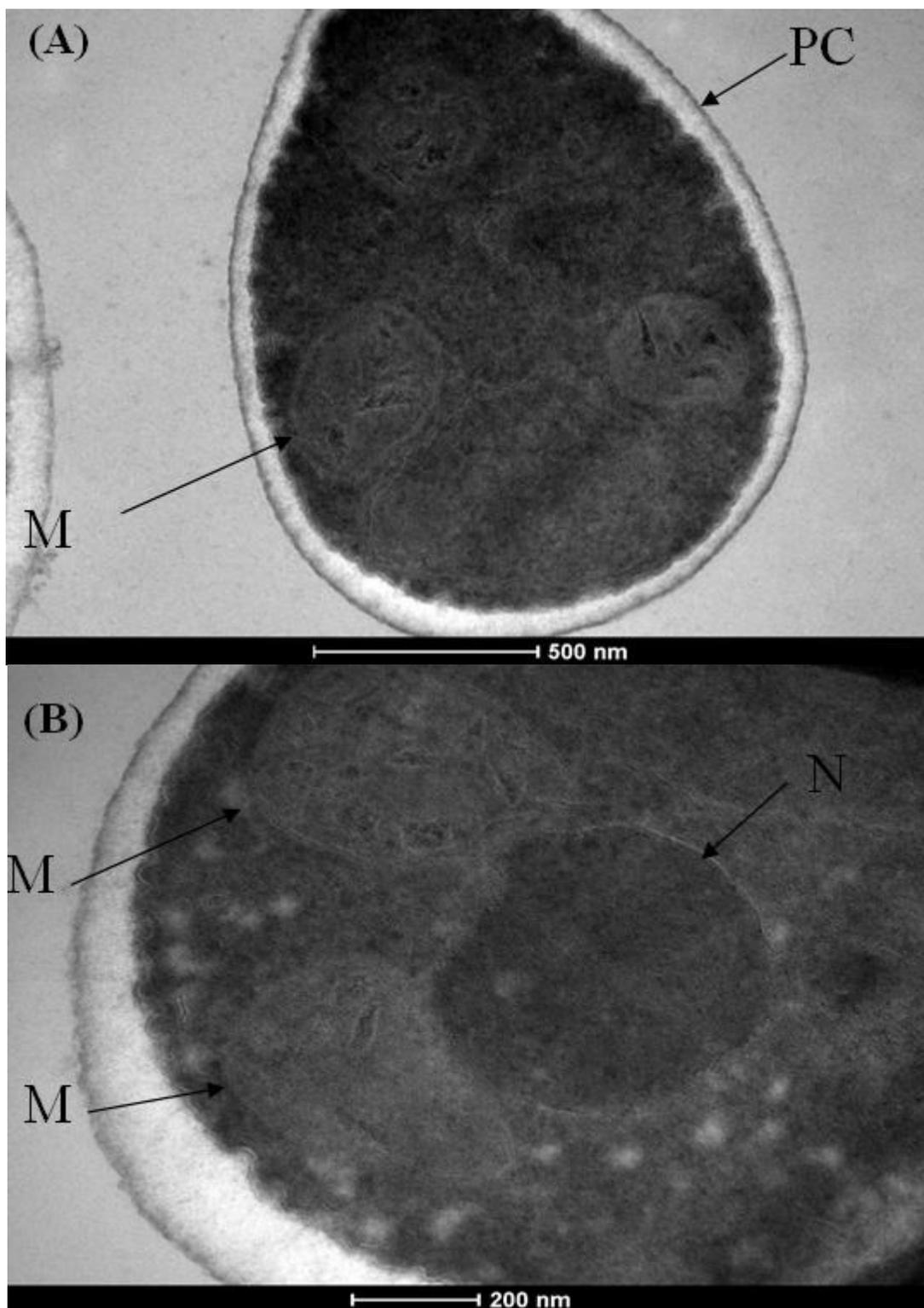


FIGURA 19 – Leveduras controle de *S. schenckii* com mitocôndrias e núcleo visíveis. Parede celular (PC) definida, núcleo (N) e mitocôndrias (M).

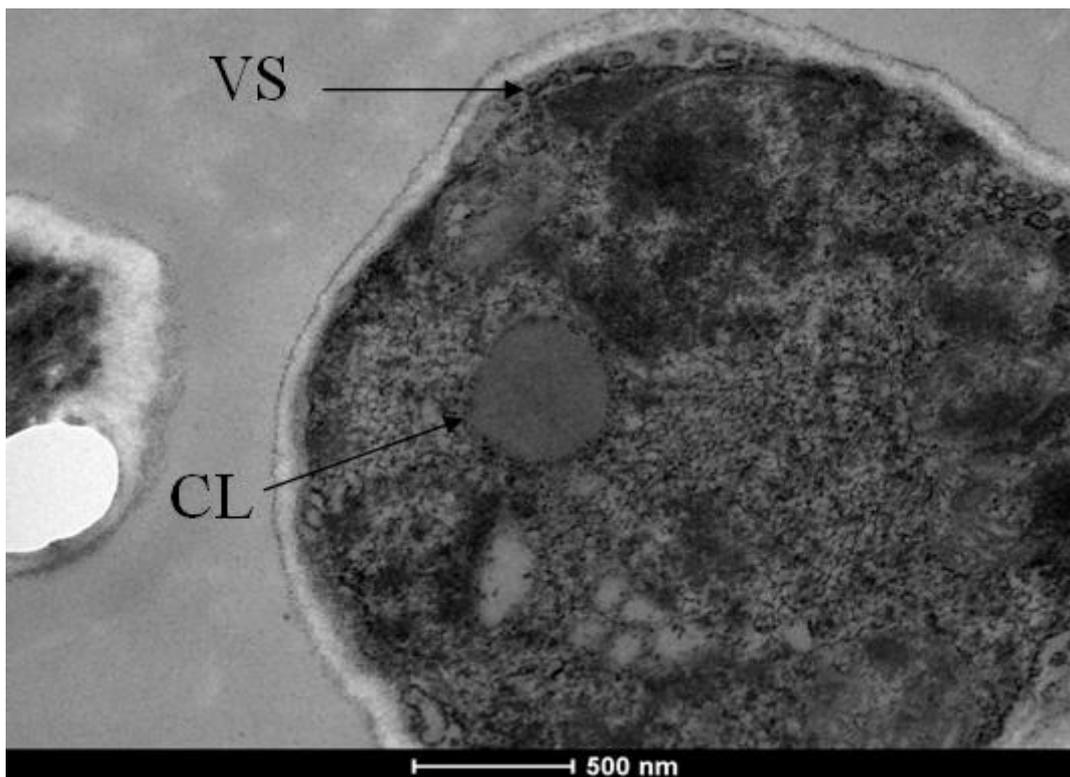


FIGURA 20 – Corpúsculo lipídico em levedura controle de *S. schenckii*. Corpúsculo lipídico (CL) e vesículas secretoras (VS).

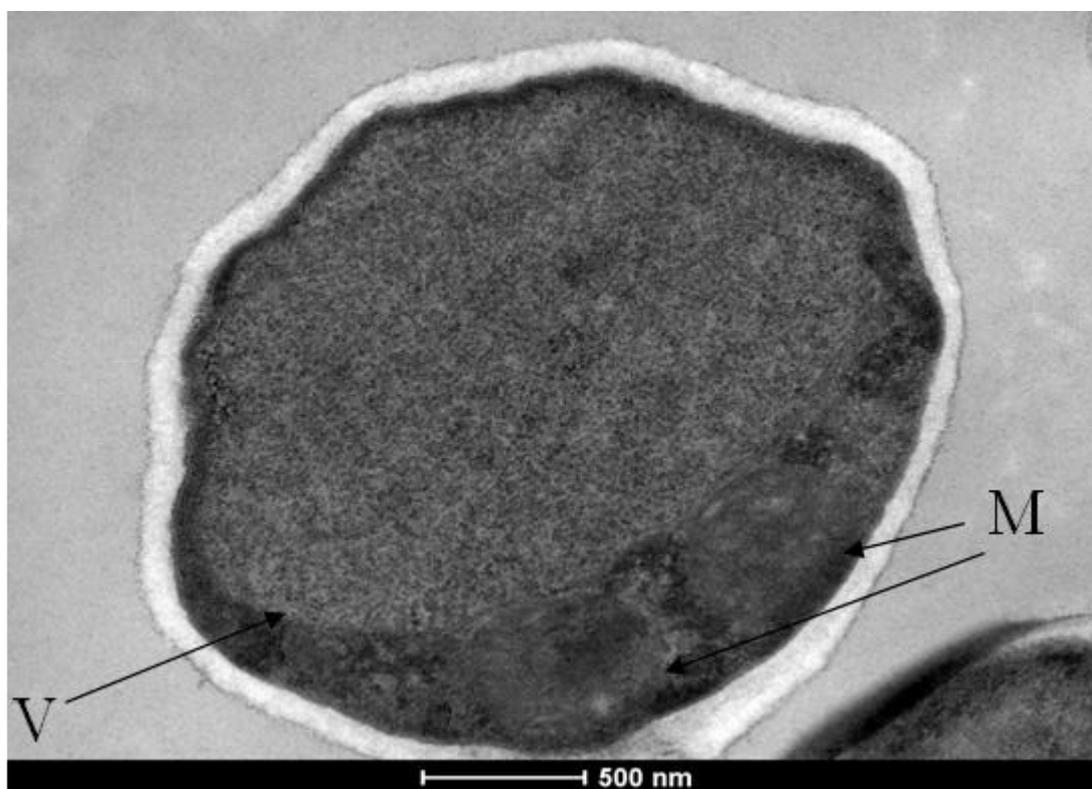


FIGURA 21 – Vacúolo em citoplasma de levedura controle de *S. schenckii*. Vacúolo (V) e mitocôndrias (M).

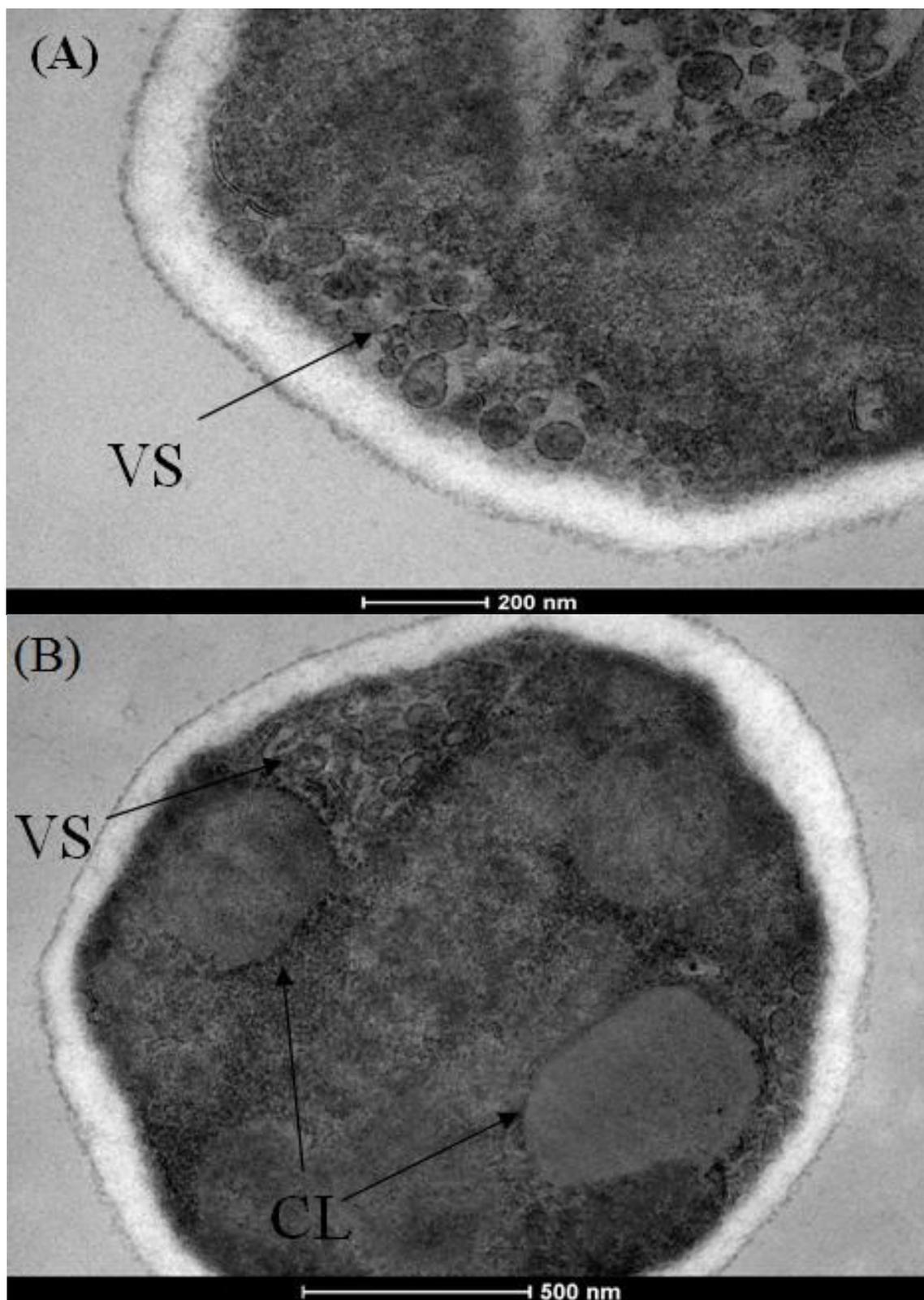


FIGURA 22 – Vesículas secretoras em leveduras controle de *S. schenkii*. Vesículas secretoras (VS) e corpúsculo lipídico (CL).

Uma visão geral das leveduras de *S. schenckii* 2 horas após irradiação com 7 kGy é apresentada na FIG. 23. As imagens mostram diferentemente das células não irradiadas, um citoplasma menos homogêneo e a presença generalizada de vacúolos vazios. É possível se observar a parede celular e a membrana plasmática preservadas, mitocôndria intactas, corpúsculos lipídicos e vesículas secretoras (FIG. 24, 25 e 26). A FIG. 27 mostra em detalhes a aparência do citoplasma que se apresenta menos homogêneo e eletrondenso.

As Figuras 28 e 29 mostram a presença de vesículas secretoras, duas horas após a irradiação, nas leveduras irradiadas indicando a presença de atividade metabólica. As FIG. 30A e B mostram em detalhes os vacúolos formados no citoplasma que foram as principais alterações ultraestruturais verificadas duas horas pós irradiação.

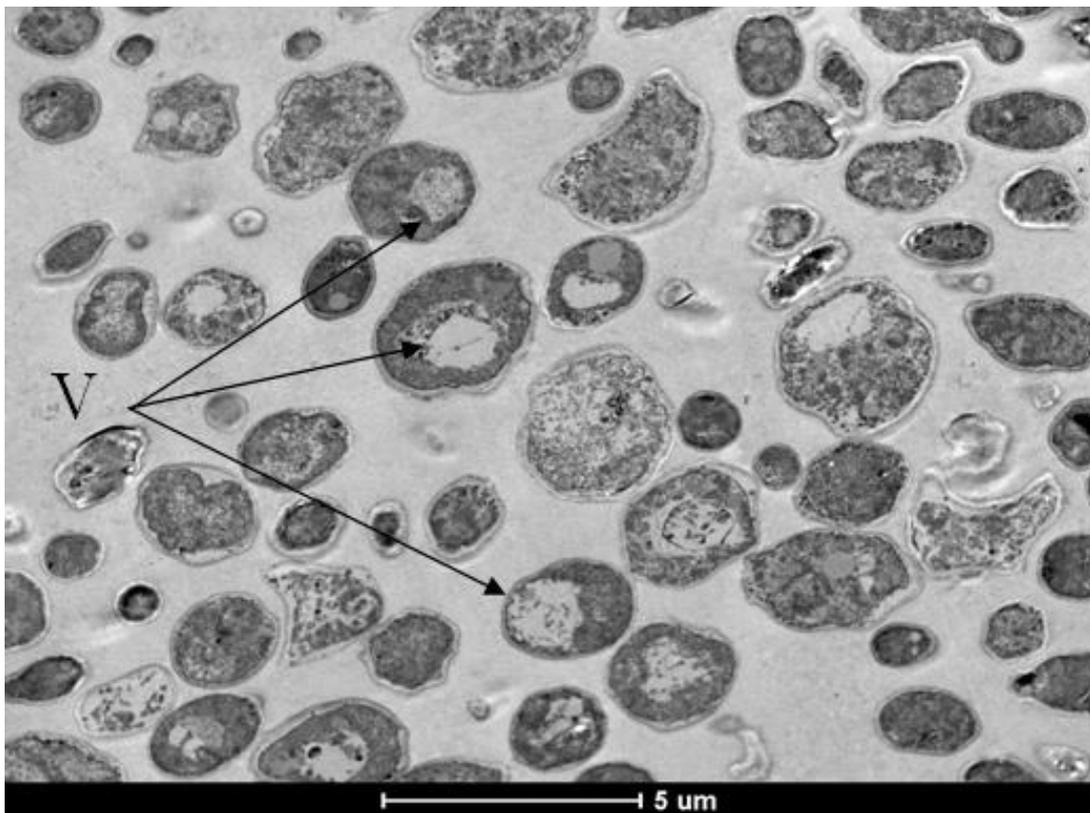


FIGURA 23 – Visão geral de leveduras de *S. schenckii* 2 horas após irradiação de 7 kGy. Aumento no número e tamanho dos vacúolos (V).

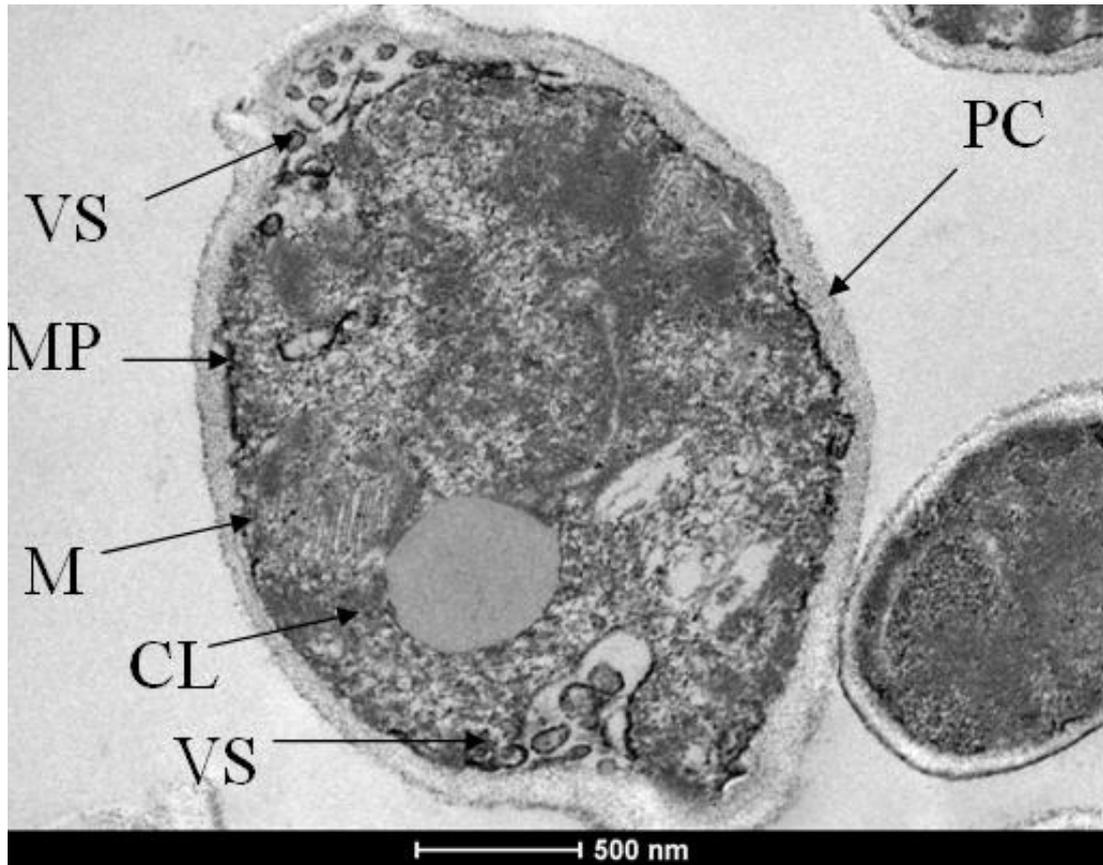


FIGURA 24 – Vesículas secretoras e corpúsculo lipídico de levedura de *S. schenckii* 2 horas após irradiação, de 7 kGy. Preservação de vesículas secretoras (VS), corpúsculo lipídico (CL), parede celular (PC), membrana plasmática (MP) e mitocôndria (M).

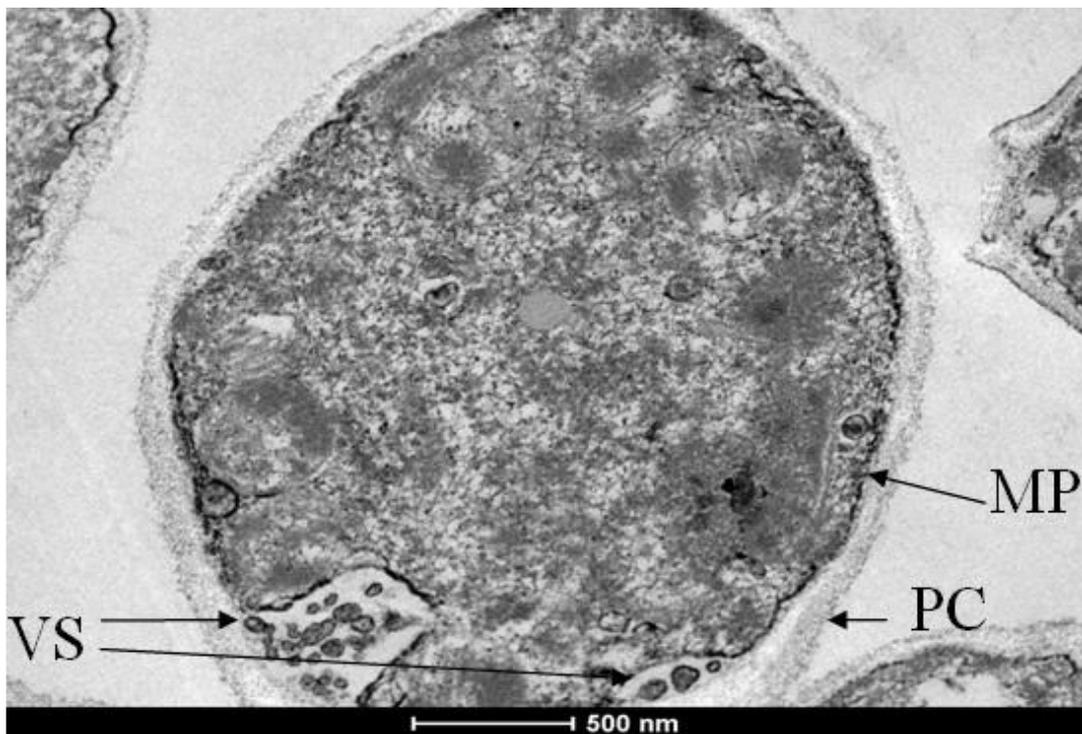


FIGURA 25 – Vesículas secretoras em levedura de *S. schenckii* 2 horas após irradiação de 7 kGy. Vesículas secretoras (VS), parede celular (PC) e membrana plasmática (MP) definidas.

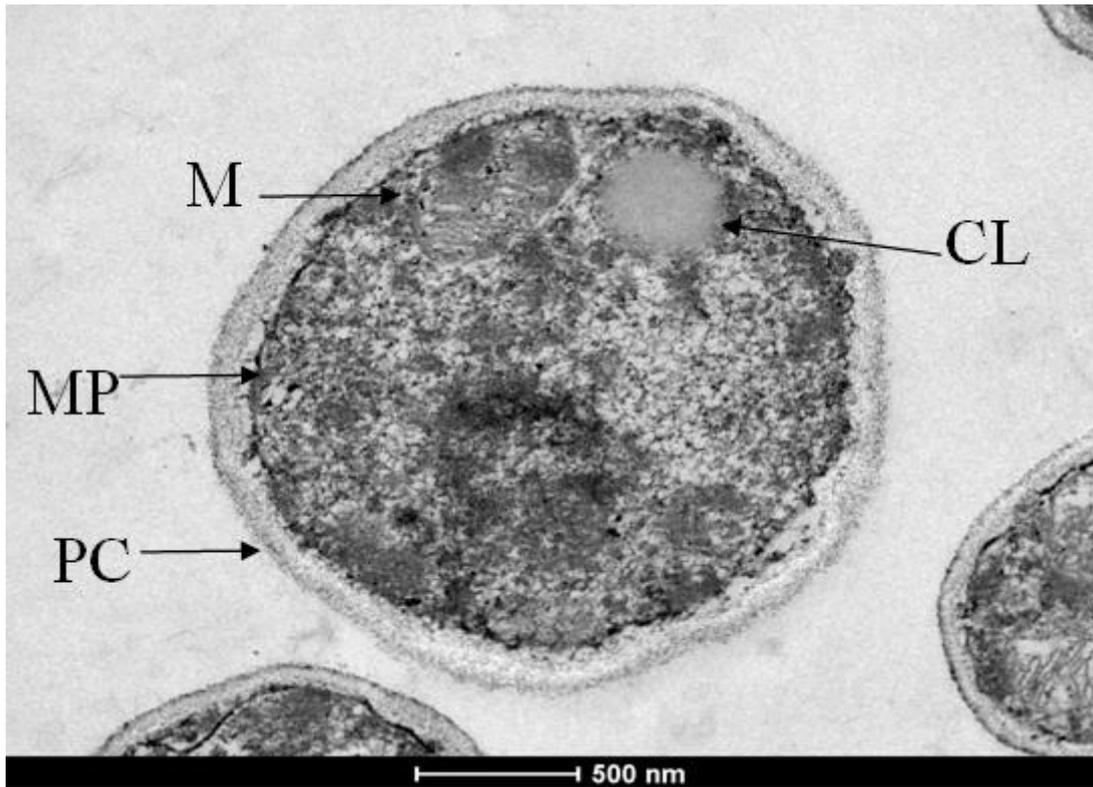


FIGURA 26 – Mitocôndria e corpúsculo lipídico de levedura de *S. schenckii* 2 horas após irradiação de 7 kGy. Preservação de mitocôndria (M), corpúsculo lipídico (CL), parede celular (PC) e membrana plasmática (MP).

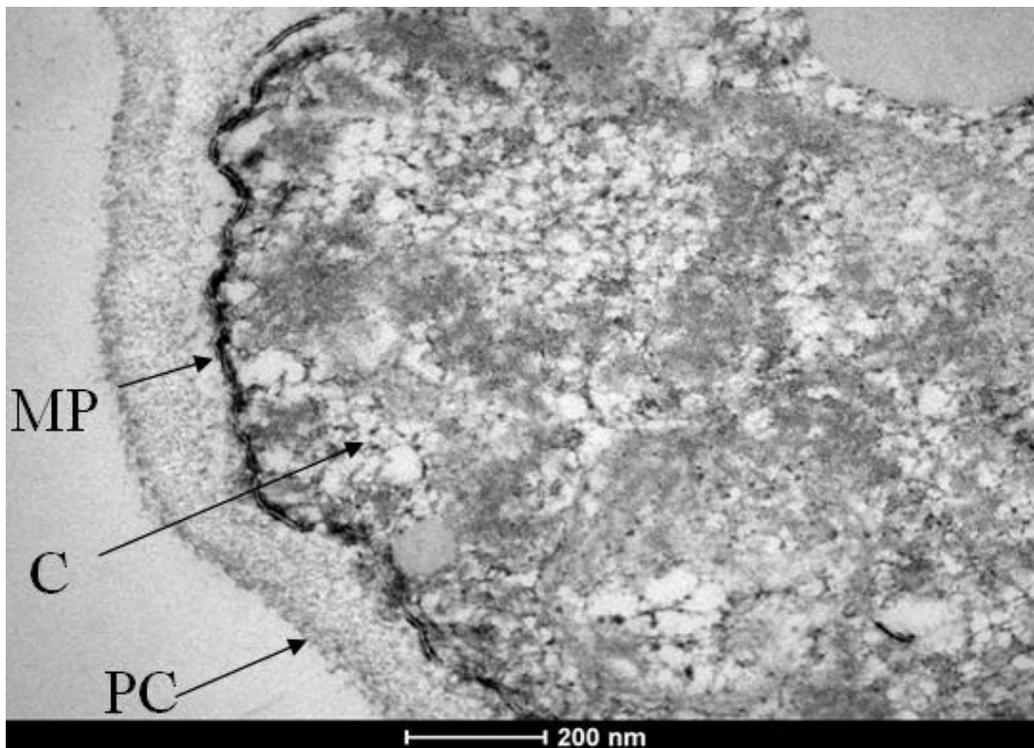


FIGURA 27 – Levedura de *S. schenckii* 2 horas após irradiação de 7 kGy, apresentado citoplasma menos homogêneo. Parede celular (PC) e membrana plasmática (MP) conservadas e citoplasma (C) menos homogêneo.

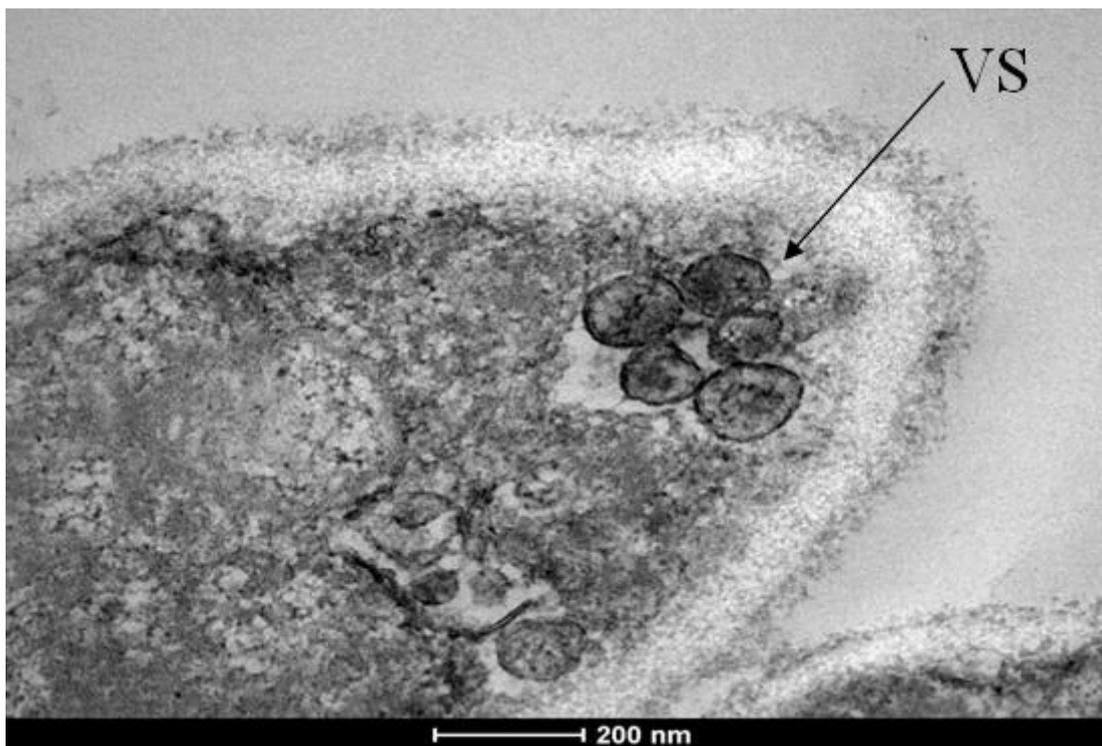


FIGURA 28 – Vesículas secretoras em levedura de *S. schenckii* 2 horas após irradiação de 7 kGy. Preservação de vesículas secretoras (VS).

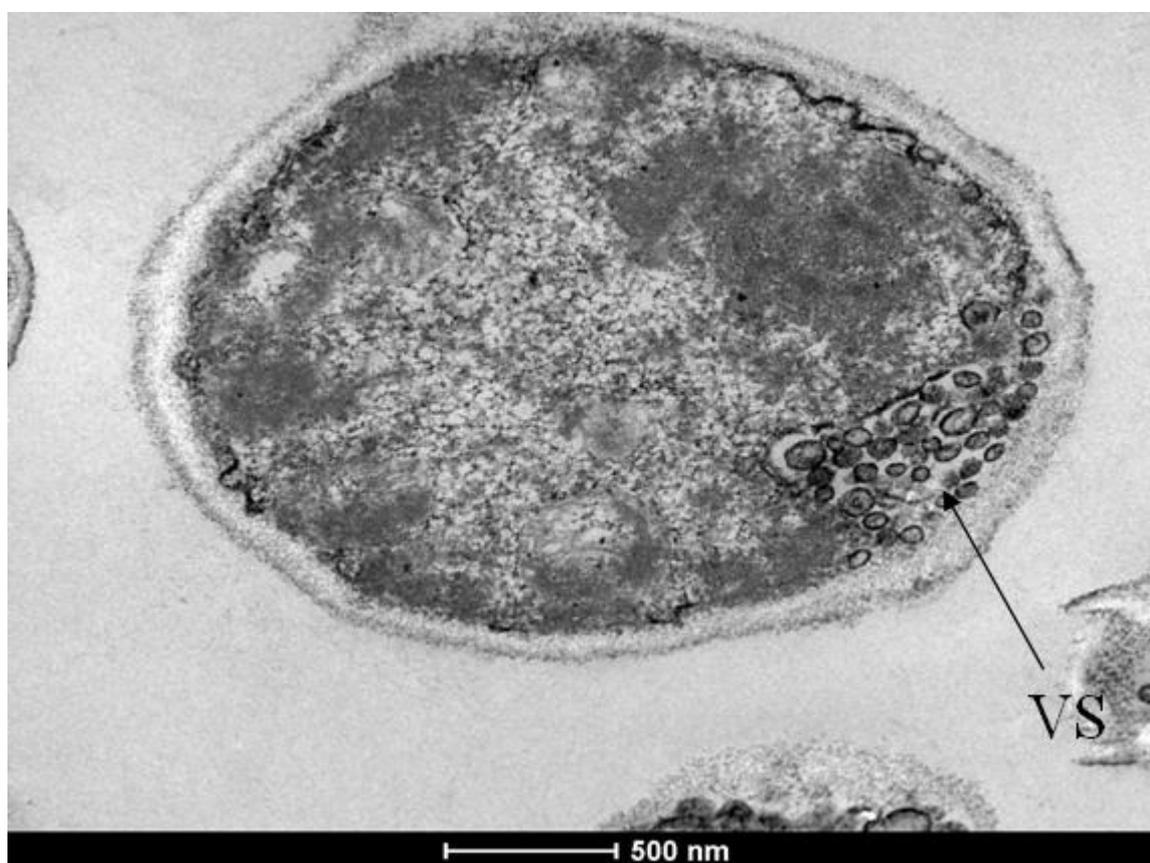


FIGURA 29 – Vesículas secretoras e citoplasma menos homogêneo em leveduras de *S. schenckii* 2 horas após irradiação de 7 kGy. Vesículas secretoras (VS) conservadas.

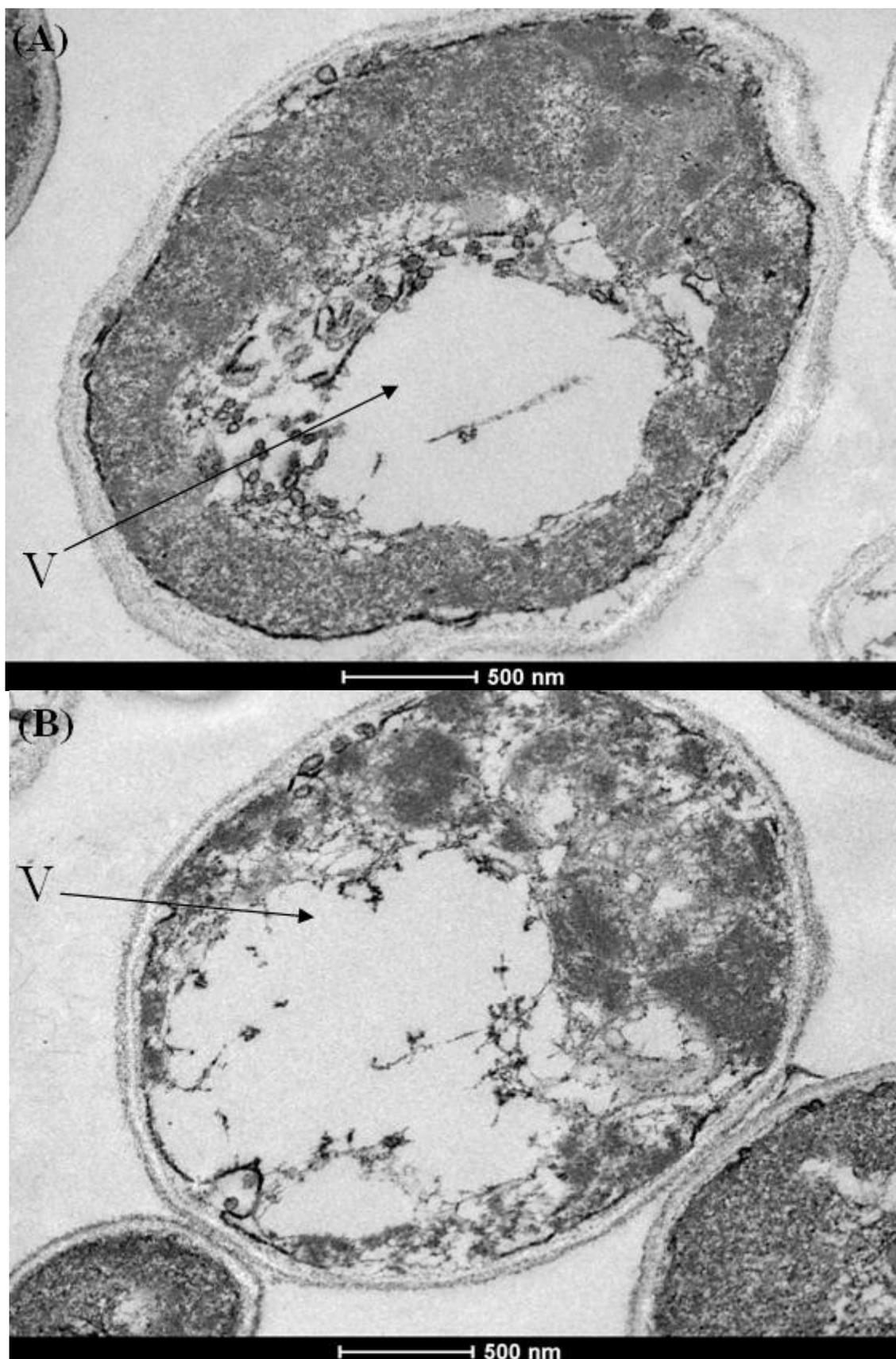


FIGURA 30 – Vacuolização no citoplasma de leveduras de *S. schenckii* 2 horas após irradiação de 7 kGy. Presença de vacúolos (V) no citoplasma.

A FIG 31 apresentam uma visão geral das leveduras de *S. schenckii* 24 horas após irradiação com 7 kGy. Como verificado após duas horas da irradiação as células se apresentam vacuolizadas, porém podem ser observadas também um grande número de células apresentando uma retração do citoplasma, onde a membrana plasmática se descola da parede celular.

Corpúsculos lipídicos e o citoplasma se descolando da parede celular podem ser visualizados na FIG. 32. A FIG. 33 destaca o vacúolo e vesículas secretoras podem ser observadas nas FIG. 34A e B, evidenciando a retenção da atividade metabólica 24 horas pós irradiação. A FIG. 35 apresenta o núcleo intacto, aparentemene com cromatina condensada no canto inferior direito. Nas FIG 36A, B e C são apresentados em maiores deralhes áreas onde o citoplasma se descola da parede celular, alteração mais evidente, junto com a vacuolização, verificada dentro deste intervalo de tempo.

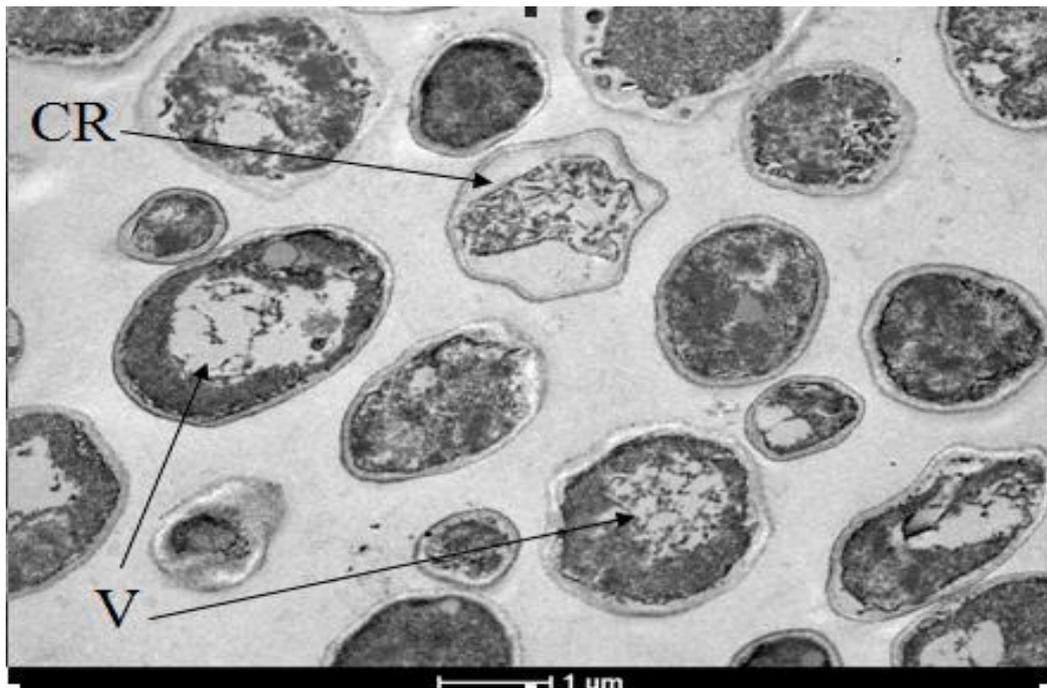


FIGURA 31 – Aspecto geral das leveduras de *S. schenckii* 24 horas após irradiação de 7 kGy . Vacuolização (V) e citoplasma retraído (CR)

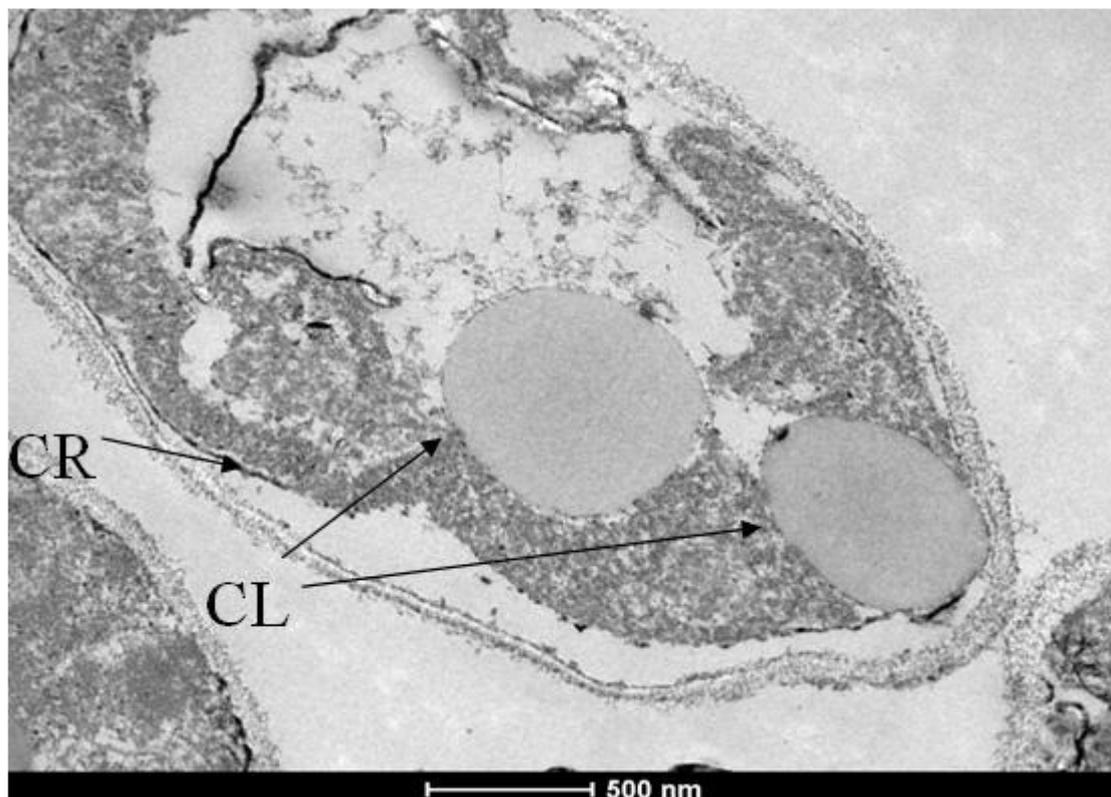


FIGURA 32 – Corpúsculos lipídicos e citoplasma retraído em levedura de *S. schenckii* 24 horas após irradiação de 7 kGy. Presença de corpúsculos lipídicos (CL) e citoplasma retraído (CR).

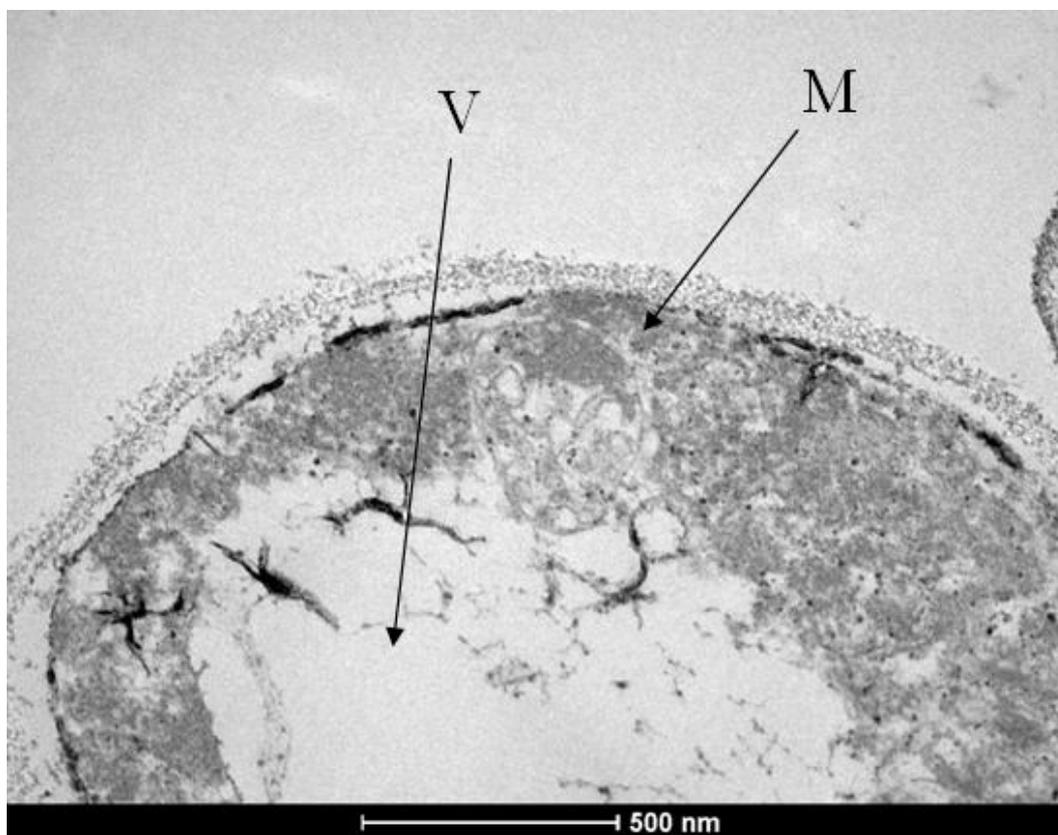


FIGURA 33 – Visão detalhada de vacúolo no citoplasma de levedura de *S. schenckii* 24 horas após irradiação de 7 kGy. Vacúolo (V) e mitocôndria (M).

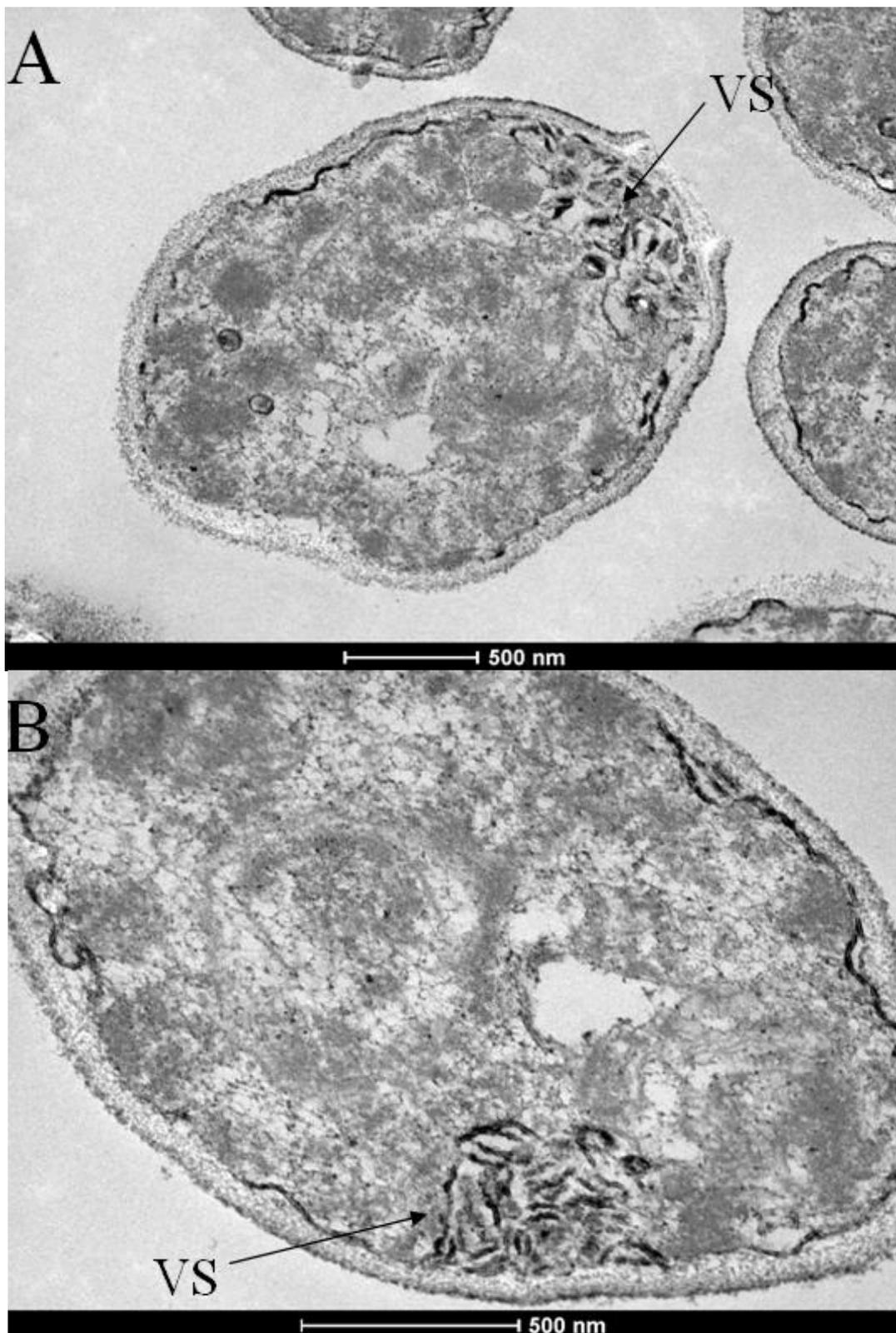


FIGURA 34 – Vesículas secretoras de leveduras de *S. schenckii* 24 horas após irradiação de 7 kGy. Preservação de vesículas secretoras (VS).

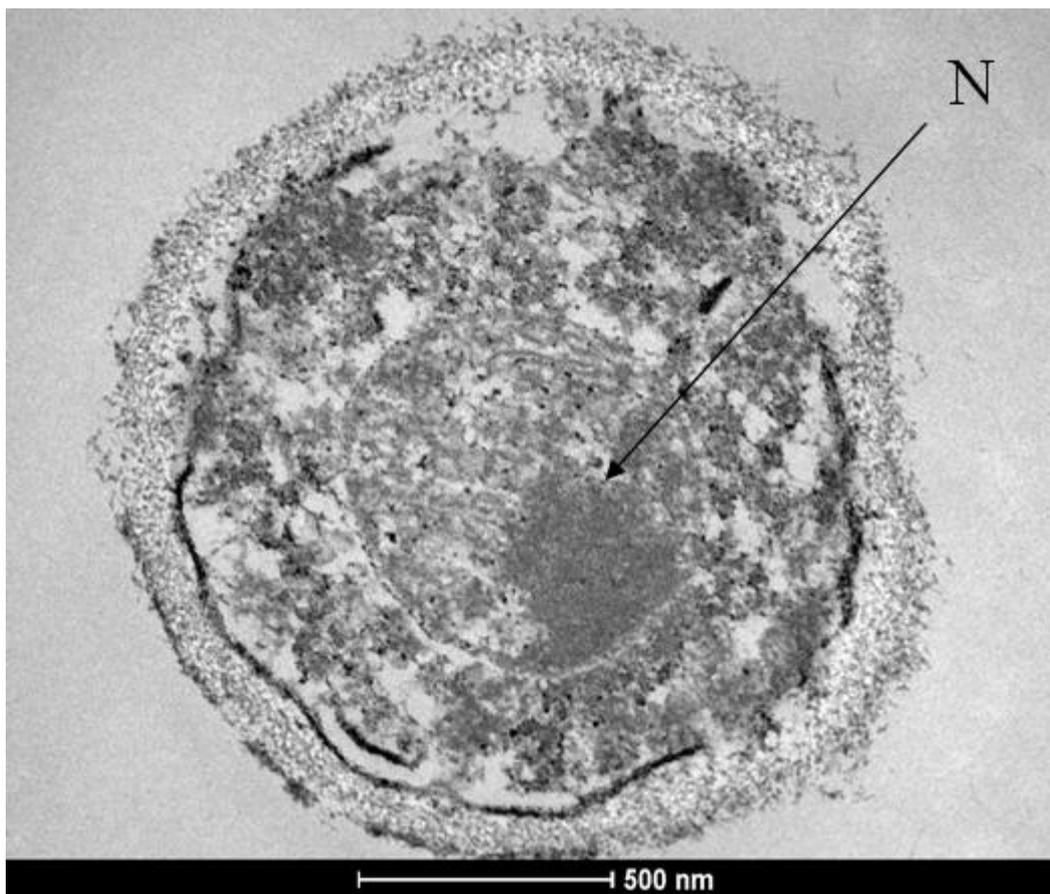


FIGURA 35 – Levedura de *S. schenckii* 24 horas após irradiação de 7 kGy com núcleo em evidência. Núcleo (N) bem definido.

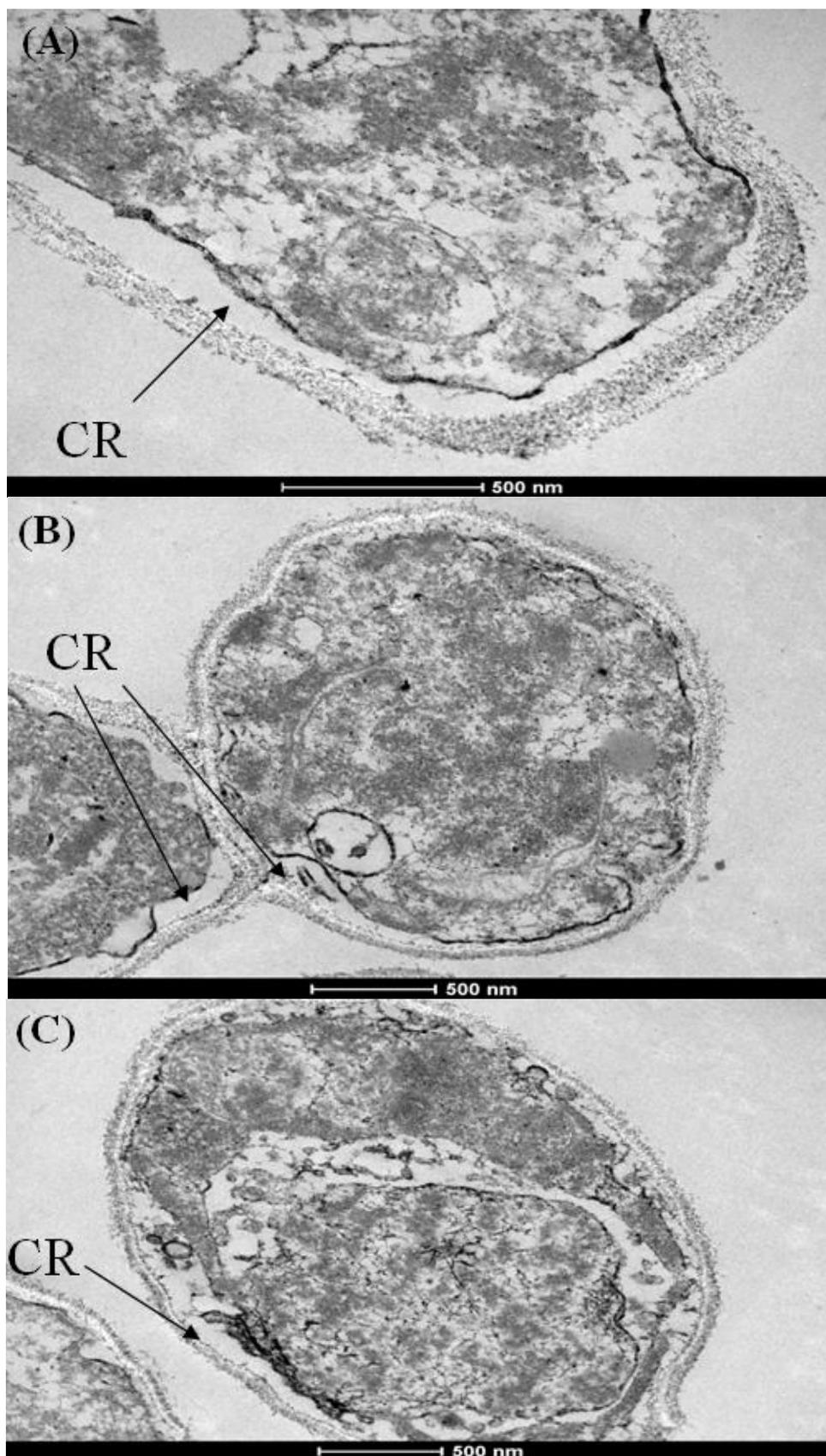


FIGURA 36 – Citoplasma retraído em leveduras de *S. schenckii* 24 horas após irradiação de 7 kGy. Citoplasma retraído (CR).

CAPÍTULO 7. DISCUSSÃO

As leveduras do *S. schenckii* apresentaram uma grande resistência à radiação gama, comum a um grande número de fungos, se comparadas a outros microorganismos e células de mamíferos (SALEH et al, 1988).

Doses de milhares de grays foram necessárias para se conseguir inibir significativamente a reprodução (crescimento) das leveduras enquanto para as células de mamíferos são necessários apenas poucos grays para se atingir a dose letal.

Esta resistência do *S. schenckii* e outros fungos à radiação gama foi avaliada por Saley et al (1998) (TAB. 2). A dose de inativação da maioria das espécies ficou entre 1,7 e 2,5 kGy, destacando-se duas espécies, *Curvularia geniculata* e *C. lunata* que necessitaram de doses altas para inativação, 17,0 e 20,0 kGy, respectivamente. O autor relacionou esta alta resistência à presença de melanina na parede celular.

TABELA 2 – Resistência relativa de espécies fúngicas à irradiação gama

Espécies	dose de inativação (kGy)
<i>Alternaria alternata</i>	>11,5 - <13,9
<i>Aspergillus flavus</i>	>2,5 - <3,0
<i>A. niger</i>	>1,7- <2,5
<i>A. fumigatus</i>	>1,7- <2,5
<i>A. parasiticus</i>	>1,7- <2,5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	>6,0- <6,5
<i>Curvularia geniculata</i>	>17- <20
<i>C. lunata</i>	>17- <20
<i>Fusarium solani</i>	>1,7- <2,5
<i>Penicillium sp.</i>	>1,7- <2,5

Baseado em Saleh *et al.* (1988).

Como já citado anteriormente, Morris-Jones et al (2003) demonstraram a presença de melanina nas células leveduriformes de *S. schenckii* e Romero-Martinez et al (2000) observaram que células deste fungo melanizadas foram mais resistentes à ação de fagócitos que as células não melanizadas. Sendo a melanina, comprovadamente um fator de proteção da célula contra estresses ambientais, no caso da resistência do *S. schenckii* à radiação, ela pode

estar intimamente relacionada, funcionando na neutralização dos radicais livres produzidos pela hidrólise da água e responsáveis pelos efeitos indiretos das radiações.

A radiação ionizante pode ser absorvida pelas moléculas biológicas que compõem as células, podendo causar ionização ou excitação nessas moléculas e conseqüentemente mudanças químicas no meio. A ação da radiação sobre a célula pode ocorrer de forma direta ou indireta, dependendo do local onde ocorra a interação.

A ação direta ocorre quando a radiação interage e é absorvida por uma macromolécula biológica como o DNA, o RNA, proteínas estruturais ou enzimáticas, ou qualquer outra macromolécula da célula, provocando alterações na sua estrutura ou função. Assim, o dano se produz pela absorção direta da energia e pela subseqüente ionização de uma macromolécula da célula.

A ação indireta ocorre quando a absorção da radiação se dá através do meio no qual se encontram as moléculas, principalmente a água (uma vez que cerca de 80% da célula é composta por água). Nesse caso, a radiação provoca a radiólise da água dando lugar à formação de íons e de radicais livres que irão iniciar reações químicas e, portanto, produzir lesões na célula.

Existindo na célula maior quantidade de água do que qualquer outra substância, a probabilidade de que a radiação produza danos por ação indireta é muito maior do que por ação direta.

Foi verificado que quando se utilizou inóculos de até 10^7 células não foi verificada a recuperação de colônias em doses superiores a 8,0 kGy, porém quando repiques massivos foram realizados o crescimento eventual de algumas colônias pode ser observado até a dose de 12,0 kGy, indicando a presença na população de algumas células de elevada radioresistência. Este comportamento não foi observado com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, onde com doses a partir 6,5 kGy não se observou o crescimento de colônias nem em repiques massivos (DEMICHELI et al, 2006), indicando uma maior radioresistência de *S. schenckii*.

Os testes de viabilidade indicaram que as células permaneciam viáveis e metabolicamente ativas até a maior dose avaliada, que foi de 9,0 kGy. Este é um efeito conhecido das radiações no qual a dose necessária para abolir a atividade metabólica é muito superior a necessária para abolir a habilidade reprodutiva. Desta forma, utilizando-se esta ferramenta é possível obter células sem capacidade de multiplicação, mas com a atividade

metabólica parcialmente preservada e portando adequadas para utilização, no contexto deste trabalho, como vacinas vivas.

Os resultados mostraram que a capacidade de sintetizar proteínas foi retida pelas células irradiadas, embora na dose 9,0 kGy esta capacidade tenha sido fortemente diminuída. Este comportamento também foi verificado em leveduras do *P. brasiliensis* onde na dose de 6,5 kGy, dose que aboliu a capacidade reprodutiva, as células mantiveram o metabolismo de síntese de proteínas em níveis similares aos controles (DEMICHELI et al, 2006). Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, irradiados com 200 gy para aplicação como vacina, também conservaram a habilidade de sintetizar proteínas (HIRAMOTO et al, 2002). Estes estudos, no entanto, avaliaram a síntese de proteínas somente imediatamente após a irradiação. No presente estudo a síntese de proteínas foi monitorada também 24 horas pós irradiação, quando foi verificada uma diminuição significativa da incorporação de ³⁵S-metionina para a dose de 9,0 kGy, indicando que os efeitos neste parâmetro bioquímico são tardios. Quando analisadas 2 horas após a irradiação não foi verificada diferença estatística em relação ao controle não irradiado para todas as doses testadas.

A avaliação da capacidade de produzir infecção demonstrou que as leveduras irradiadas com 7,0 e 9,0 kGy não foram capazes de infectar camundongos Balb/c imunossuprimidos. Foram utilizados camundongos imunossuprimidos para permitir o desenvolvimento da infecção sem a oposição do sistema imunológico do hospedeiro, comprovando desta forma a perda da virulência. Evitamos a utilização de camundongos imunocompetentes, pois o não desenvolvimento da infecção nestes animais não eliminaria dúvidas sobre o possível efeito de uma vacina baseada em leveduras radioatenuadas em hospedeiros imunossuprimidos.

Para as leveduras de *Sporothrix schenkii* não foi possível obter uma dose que eliminasse completamente a presença de células com capacidade reprodutiva enquanto permitisse a retenção da atividade metabólica, como verificado para o *P. brasiliensis*. Foi possível obter doses em que a capacidade metabólica foi preservada, porém com a presença, ainda que muito escassa, de células com habilidade reprodutiva. Escolhemos a dose de 7,0 kGy para a atenuação pois nesta dose foi possível reter a atividade de síntese de proteínas e o percentual de células com capacidade reprodutiva foi extramamente baixo (0,00001%). Com esta dose não houve recuperação de UFCs nos camundongos imunossuprimidos. Por outro lado, com a dose de 9,0 kGy a síntese de proteínas foi severamente afetada.

Dos danos celulares, os mais importantes são os relacionados à molécula do DNA, que armazenam a informação para a síntese de proteínas, que são responsáveis por praticamente

todo o trabalho realizado dentro da célula. Assim, se houver uma alteração no código contido no DNA, por algum motivo, a célula poderá se tornar incapaz de produzir uma determinada proteína, ou mesmo produzir uma proteína alterada ou diferente da que deveria ser produzida.

As lesões no DNA que podem ser provocadas pela radiação são: quebras simples e duplas da fita de DNA, alterações estruturais das bases, eliminação das mesmas, anomalias na desoxirribose e ligações cruzadas (DNA-DNA ou DNA - proteína).

As duplas quebras, dentre os danos causados no DNA, são os mais difíceis de serem reparados, pois seu mecanismo de reparo é complexo e mais sujeito a erros (DEMICHELI, 2006).

Estudos anteriores demonstram que duplas quebras são lesões diretamente relacionadas à eliminação da capacidade reprodutiva em leveduras (FAVAUDON, 2000; FRANKENBERG et al., 1981; RHIND et al., 1998).

Como demonstrado na Figura 15 o DNA das leveduras de *S. schenckii* irradiadas com 7 kGy, está totalmente fragmentado. A fragmentação do DNA é uma conhecida causa da paralisação do ciclo celular e de desequilíbrio na distribuição da cromatina entre as células filhas no momento da divisão celular o que leva à perda de material genético essencial e conseqüente morte mitótica (FAVAUDON, 2000; FRANKENBERG et al., 1981; RHIND et al., 1998). Provavelmente, a causa da perda da capacidade reprodutiva das leveduras irradiadas a 7,0 kGy são as duplas quebras nas fitas polinucleotídicas do DNA.

Nos resultados apresentados, foi mostrado que apesar da fragmentação do DNA verificada com a dose de 7,0 kGy, as leveduras conservaram a atividade de síntese de proteínas, provavelmente porque as duplas quebras ocorreram fora das regiões de operon, que representam uma fração menor do genoma, permitindo assim o funcionamento dos genes até o momento da divisão celular e a preservação da atividade metabólica.

Lesão no DNA celular é um dos estímulos patológicos para que aconteça apoptose, também conhecida como morte celular programada (MADEO et al, 2004). É um mecanismo bioquímico altamente conservador que permite que as células morram de forma controlada e organizada. Esse processo é essencial para diferenciação celular normal e homeostase do tecido dentro dos organismos multicelulares. Quando esta lesão é maior que a capacidade da célula de revertê-la, é mais seguro para o organismo que o programa de morte celular seja ativado.

Porém leveduras não são organismos multicelulares e a apoptose nestes organismos pode parecer sem sentido, sendo esta uma área intensa de pesquisa e até o momento poucos são os fatores conhecidos capazes de induzir a morte celular programada em leveduras como, aplicação de ácido acético, estresse por açúcar ou sal, peptídeos anti-fúngicos, peróxido de hidrogênio e radicais de oxigênio (MADEO et al, 2004). Embora a radiação ionizante seja uma causa bem estabelecida de apoptose em células de mamíferos (ROZE, LINZ, 1998) são escassos os trabalhos neste sentido em leveduras. Apenas um trabalho do nosso conhecimento, até o momento, reportou a indução de apoptose em leveduras por radiação (BRYAN et al, 2008). Neste estudo anticorpos marcados com radionuclídeos foram capazes de induzir apoptose em leveduras de *Cryptococcus neoformans*. Foi demonstrado que as radiações beta, alfa e gama induziram a apoptose, porém na radiação gama essa indução foi mais pronunciada. Todos estes tipos de radiação aumentaram os níveis de caspases fúngicas, verificados com o inibidor FLICA, que também foi utilizado neste estudo.

Os resultados da avaliação de ocorrência de apoptose em leveduras de *S. Schenckii* irradiadas com a dose de 7,0 kGy, utilizando-se o inibidor FLICA, mostraram que após duas horas de irradiação não houve uma diferença significativa entre as leveduras controle e irradiadas, mas após 24 horas, os resultados indicaram que houve uma pequena porém significativa indução de apoptose nas células irradiadas. Estes estudos corroboram que a radiação gama é um fator capaz de induzir apoptose em leveduras.

Foi verificado um elevado nível de células apoptóticas entre as leveduras controle, apesar de que para estes experimentos foram utilizadas culturas de apenas dois dias. O fato de terem sido utilizadas leveduras crescidas em meio sólido, onde estas crescem de forma confluyente ocorrendo intenso contato entre as células pode explicar este resultado. Neste cenário a apoptose pode ser estimulada como um “fator de limpeza”, eliminando as células menos adaptadas da população (HERKER et al, 2004). A cultura em meio líquido poderia diminuir este efeito, por outro lado com a irradiação em meio líquido as células seriam mais afetadas pelo aumento da geração de radicais livres derivados da radiólise da água.

A presença de alterações morfológicas nas leveduras irradiadas foi avaliada pela microscopia eletrônica de transmissão. Existem na literatura poucos trabalhos reportando alterações ultraestruturais provocadas pela radiação ionizante em leveduras. Entre as alterações citológicas reportadas estão: degeneração das mitocôndrias (MEISSEL et al, 1966), alterações nos sistemas internos de membrana (PASCHEV et al, 1966), vacuolização do citoplasma (MEISSEL et al, 1966) e distorção dos vacúolos em *Saccharomyces* (KOEHLER

et al, 1961). Alterações envolvendo o núcleo incluem fragmentação (PASCHEV et al, 1966) e inchamento (MEISSEL et al, 1966), em *Saccharomyces*, dispersão a cromatina em *Rhodotorula* (PASCHEV et al, 1966) e condensação da cromatina em *P. brasiliensis* (DEMICHELI et al, 2007). Rompimento da parede celular (PASCHEV et al, 1966) e perda da cápsula em *Cryptococcus neoformans* também foram reportados (DEMBITZER et al, 1972).

Neste estudo foram verificadas nas células de *S. Schenckii* as características ultraestruturais típicas descritas para esta espécie em trabalhos anteriores, como citoplasma homogêneo, parede celular definida, mitocôndria, corpúsculos lipídicos, grânulos de estocagem e núcleo (DEMBITZER et al, 1972). As leveduras irradiadas conservaram a integridade da membrana celular e da parede, bem como a morfologia das mitocôndrias e do núcleo. Vesículas secretoras foram visualizadas 2 e 24 horas após a irradiação, indicando a retenção de atividade metabólica. As principais alterações verificadas nas leveduras irradiadas foram a vacuolização do citoplasma e a perda da homogeneidade do mesmo. Após 24 horas foi freqüente a presença de células apresentando o citoplasma retraído, se descolando da parede celular, sugerindo um processo de desidratação. Porém estas alterações não inviabilizaram as células como demonstrado nos testes de viabilidade e síntese de proteínas.

Os resultados deste estudo demonstraram que para as leveduras de *S. Schenckii* foi possível encontrar uma dose absorvida (7,0 kGy) em que o número de células com capacidade reprodutiva é extremamente baixo, enquanto as leveduras conservam a viabilidade e a atividade metabólica. Estas células perdem a capacidade de produzir infecção, mesmo em hospedeiros imunossuprimidos, demonstrando estar atenuadas. Portanto estas leveduras irradiadas preenchem os requisitos necessários para aplicação como vacinas vivas atenuadas

Uma vacina com estas características é reconhecida pelo hospedeiro como um agente viável, porém sem o risco de uma infecção progressiva. Permite o estímulo simultâneo por vários antígenos que são apresentados sequencialmente ao hospedeiro como na infecção natural. Permite ainda a síntese de antígenos que são produzidos somente durante a infecção.

CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES

A irradiação gama com a dose de 7,0 kGy foi capaz de atenuar as células leveduriformes de *S. schenckii*, visto que não foram recuperadas UFCs de camundongos imunossuprimidos inoculados com as mesmas. Nesta dose o percentual de células que mantiveram a capacidade reprodutiva *in vitro* foi muito baixo (0,00001%) e estas por estarem danificadas ou em número muito reduzido não foram capazes de estabelecer a infecção e de se multiplicar *in vivo*. Foi demonstrado que as leveduras irradiadas com 7,0 kGy permanecem viáveis e retiveram a capacidade de sintetizar proteínas, preenchendo os requisitos para utilização como vacinas vivas. Conclui-se que foi possível a atenuação de *S. schenckii* por irradiação gama e agora a capacidade das leveduras radioatenuadas de conferir proteção em modelos animais será o próximo estágio deste estudo.

CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS

As questões que deverão ser respondidas na seqüência serão: verificar a eficácia protetora das leveduras radioatenuadas com 7,0 kGy em ensaios de proteção, analisar as repostas imune celular e humoral desencadeadas e avaliar a estabilidade da vacina verificando se o perfil antigênico é constante entre diversas preparações. Serão necessários também ajustes no cultivo celular para diminuir a presença de células apoptóticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-SHEHAD, M. N., AL. ZUBAIDY, B. A.; HERBERT, I. V. Acquired immunity to *Toxocara canis* infection in mice, **Veterinary Parasitology**, Londres, v.38, p. 289- 298, 1991.
- AGYEI-FREMPONG, M.; CATTY, D. The measurement of antigens released by radiation-attenuated *Trichinella spiralis* larvae, **Parasite Immunology**, Hoboken, v.5, p.289-303, 1983.
- ANDRADE, T. C. B. et al. BCG Moreau: An oral vaccine against tuberculosis: review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, p. 459-465, 2005.
- ANSARI, M. D. Z.; SINGH, K.S. The use of gamma-radiation-attenuated larvae of *Gaigeria pachyscelis* Railliet and Henry, 1910, for vaccination in lambs, **Journal of Helminthology**, Cambridge, v. 52, p.287-290, 1978.
- BARCELOS, F.; MARTINS, R. L. G.; PINHEIRO JR, O. A. Esporotricose. In: Semana de Patologia Veterinária e Simpósio de Patologia Veterinária do Centro Oeste Paulista, FAMED - FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DA FAEF, 2, 2005. **Anais da III Semana de Patologia Veterinária**, São Paulo, **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 3 p., 2005.
- BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A.C.; GUTIERREZ GALHARDO, M.C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T.M.P.; REIS, R.S.; MARZOCHI, K.B.F.; WANKE, B.; CONCEIÇÃO, M.J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infection Disease**, Chicago, v. 38, p. 529-535, 2004.
- BARROS M.B.L.; SCHUBACH, T.M.;GALHARDO, M.C.; SCHUBACH, A.O.; MONTEIRO, P.C.;ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; SANTOS, L.M.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCLO, T.C.; MARZOCHI, K.B.; WANKE, B.; VALLE, A.C. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz** , Rio de Janeiro, v. 96, p. 777– 779, 2001.
- BECHELLI, L.M.; CURBAN, C.V. **Compêndio de Dermatologia**. S. Paulo: Ed. Atheneu, 1988. 6 Ed.
- BELKNAP, B.S. Sporotrichosis, **Dermatol Clin**, Dakota do Norte, v.7, p.193-202, 1989.
- BICKLE, Q.D. Radiation-attenuated schistosome vaccination a brief historical perspective, **Parasitology**, Cambridge, v.136, p. 1621-32, 2009.
- BONETTI, F. C.; HIRAMOTO,R.M.; PAIVA, B.; ANDRADE,Jr, H.F.;NASCIMENTO, N. Aspectos morfológicos da *Leishmania amazonensis* submetida à ação da radiação ionizante. In: INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE – INAC, 2009, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: ABEN, 2009. CD-ROM).

BRYAN, R.A.; HUANG, X.; MORGENSTERN, A.; BRUCHERTSEIFER, F.; CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E. Radiofungicidal Effects of External Gamma Radiation and Antibody-Targeted Beta and Alpha Radiation on *Cryptococcus neoformans* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 2232-2235, 2008.

CARAVALHO Jr., J.; CALDWELL, J.B.; RADFORD, B. L.; FELDMAN, A. R. Feline-transmitted sporotrichosis in the southwestern United States, **The Western Journal of Medicine**, Bethesda, v. 154, p. 462-465, 1991.

CARDI, B.A.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE Jr, H.F. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors, **International Journal of Radiation Biology**, Londres, v.7, p. 557-564, 1998.

CENCI, E.; ROMANI, L.; VECCHIARELLI, A.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Role of L3T4⁺ lymphocytes in protective immunity to systemic *Candida albicans* infection in mice, **Infection Immunology**, Oxford, v. 57, p.3581-3587, 1989.

CHUSATTAYANOND, W.; DENHAM, D. A. Attempted vaccination of jirds (*Meriones unguiculatus*) against *Brugia pahangi* with radiation attenuated infective larvae, **Journal of Helminthology**, Cambridge, v.60, p.149-155, 1986.

CLYDE, D. F. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, **Bull WHO**, Nova York, v. 68, p. 9-12, 1990.

COULSON, S. P. The radiation-attenuated vaccine against Schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine, **Advances in Parasitology**, Londres, v.39, p. 271-336, 1997.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. Itaguaí: UFRJ, 1985.

CUTLER, J.E.; DEEPE, G.S.; KLEIN, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold, **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 5, p. 13-18, 2007.

DAVIES, C.; TROY, G. C. Deep mycotic infections in cats, **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 32, n. 5, p.380-391, 1996.

DEAN, D. A. Schistosoma and related genera: acquired resistance in mice, **Experimental Parasitology**, Londres, v. 1, p. 1-104, 1983.

DEMBITZER, H.M; BUZA, I; REISS, F. Biological and electron microscopic changes in gamma radiated *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia et Mycologia applicata**, v. 47, p. 307-15, 1972.

DEMICHELI, M.C. **Atenuação da forma leveduriforme do *Paracoccidioides brasiliensis* por irradiação gama**. 96 p. Dissertação (Mestrado). Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2006.

DEMICHELI, M. C.; REIS, B. S.; GÓES, A. M.; ANDRADE, A. S. R. *Paracoccidioides brasiliensis*: attenuation of cells by gamma irradiation, **Mycoses**, Hoboken, v. 49, p.184-189, 2006.

DEMICHELI, M. C.; GÓES, A. M. ; ANDRADE, A. S. R. Ultrastructural changes in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells attenuated by gamma irradiation, **Mycoses**, Hoboken, v. 50, p.397-402, 2007.

DOERING, T.L.; NOSANCHUKI, J.D.; ROBERTS, W.K.; CASADEVAL, L. Melanin as a potencial cryptococcal defence against microbicidal proteins, **Medical Mycology**, Londres, v.37, n.3, p.175-181, 1999.

DONABEDIAN, H.; O'DONNELL, E.; OLSZEWSKI, C.; MACARTHUR, R.D.; BUDD, N. Disseminated cutaneous and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Londres, v. 18, p. 111– 115, 1994.

DONADEL, K.W.; REINOSO, Y.D.; OLIVEIRA, J.C.; AZULAY, R.D. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.68, p.45-52, 1993.

DUQUESNE, V. et al. Identification of T cell epitopes within a 23-kDa antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*, **Clinical & Experimental Immunology**, Londres, v. 84, p 527–534, 1991.

DUSTAN, R.W.; LANGHAN, R.F.; REIMANN, K.A.; WAKENELL, P.S. Feline sporotrichosis; a report of five cases with transmission to humans, **Journal of the American Academy of Dermatology**, Auburn, v.15, p. 34-45, 1986.

DUSTAN, R.W.; LANGHAM, R.F.; REIMANN, K.A.; WAKENELL, P.S. Feline sporotrichosis: a report offive cases with transmission to humans, **Journal of the American Academy of Dermatology**, Auburn, v. 15, p. 37– 45, 1986a.

ESPINOSA-TEXIS, A. et al. Study of 50 patients with sporotrichosis. Clinical and laboratory assessment, **Gac Med Mex.**, v.137, n.2, p.111-116, 2001.

ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1992.

FAVAUDON, V. Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death. **Cancer Radiother.**, v.4, n.5, p. 355-368, 2000.

FELDMAN, E.C., **Tratado de Medicina Interna Veterinária- Moléstias do Cão e Gato**. São Paulo: Manole, 1995.

FINDLAY, G.H.; VISMER, H.F. Studies in sporotrichosis: fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments, **Mycopathology**, Albany, v. 96, p. 115-122, 1986.

FLEURY, R. N. et al. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil, **International Journal of Dermatology**, Hoboken, v.40, n.5, p.318-322, 2001.

FRANKENBERG, D. M.F.S.; BLÖCHER, D.; HARBICH, R. Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions, **Radiat. Res.**, v.88, p. 524-532, 1981.

FURTADO, T.; ARMOND, S. Esporotricose ocupacional e familiar, **Med. Cut. I.L.A.**, Rio de Janeiro , v. 9 (3), p. 207-210, 1981.

GALISTEO Jr, A. J. *Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Estudo da imunidade intestinal em camundongos C57Bl/6j experimentalmente vacinados com taquizoítos irradiados. 2004. 59 p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2004.

GALISTEO Jr, A. J. *Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: imunidade humoral e celular em baço e intestino de camundongos isogênicos imunizados com taquizoítos irradiados por Cobalto 60. 182 p. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

GARRISON, R. G.; BOYD, K. S.; KIER, A. B.; WAGNER, J.E. Spontaneous feline sporotrichosis: a fine structural study, **Mycopathology**, Albany, v. 69, n. 1-2, p. 57-62, 1979.

GOAD, D. L.; PECQUET GOAD, M. E. Osteoarticular sporotrichosis in a dog, **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 189, n. 10, p. 1326-1328, 1986.

GONZALEZ CABO, J. F.; GUILLAMON, N. H.; CEQUIEL, M. V. L.; CIERCOLES, J.A.G.J. Feline sporotrichosis: A case report, **Mycopathology**, Albany, v. 108, p. 149-154, 1989.

GUDDING, R.; NAESS, B. Vaccination of cattle against ringworm caused by *Trichophyton verrucosum*, **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 47, p. 2415-2417, 1986.

GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; VALLE, A.C.; ALMEIDA-PAES, R.; TAVARES, P.M.S.; MONZON, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil, **Medical Mycology**, Londres, v.46, p. 141-151, 2008.

HACHISUKA, H.; SASAI, Y. Development of experimental sporotrichosis in normal and modified animals, **Mycopathology**, Albany, v. 76, p. 79-82, 1981.

HAYASHI, Y.; NODA, K.; SHIRASAKA, A.; NOGAMI, S.; NAKAMURA, M. Vaccination of BALB/c mice against *Brugia malayi* and *B. pahangi* with larvae attenuated by gamma irradiation, **The Japanese Journal of Experimental Medicine**, Toquio, v. 54, p.177-181, 1984.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus, **Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v.5, p. 77– 89, 1900.

HENNEMAN, C.R.A.; GUIMARÃES, J.; BREMM, M. Esporotricose Felina: Uma Revisão, **Veterinária em foco**, Canoas: Ed. ULBRA, v.1, n.1, p.53-69, 2003.

HERKER, E.; JUNGWIRTH, H.; LEHMANN, K.A.; MALDENER, C.; FRÖHLICH, K.; WISSING, S. BÜTTNER, S.; FEHR, M.; SIGRIST, S.; MADEO, F. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. **JCB**, v. 164, p. 501-507, 2004.

HERRINGTON, D. A. et al. Human studies with synthetic peptide sporozoite vaccine (NANP)₃ – TT and immunization with irradiated sporozoites, **Bull WHO**, Nova York, v. 68, p. 33-37, 1990.

HIRAMOTO, R. M.; GALISTEO, A. J.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE, H. F. Jr.. 200 Gy sterilized *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice, **Vaccine**, Amsterdam, v. 20, p. 2072-81, 2002.

HOFFMAN, S. L. et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites, **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 18, p.1155-1164, 2002.

HOWARD, D. H. Dimorphism of *Sporothrix schenckii*, **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 81, p. 464-469, 1961.

JACOBSON, E.S. Pathogenic roles for fungal melanins, **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.13, n.4, p.708-717, 2000.

KAJIWARA, H; SAITO, M.; OHGA, S.; UENOTSUCHI, T.; YOSHIDA, S. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease, **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, p. 5073-5079, 2004.

KAUFFMAN, C.A.; HAJJCH, R.; CHAPMAN, S.W. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis for the Mycoses Study Group. Infectious Diseases Society of America, **Clinical Infection Disease**, Chicago, v. 30, p. 684-687, 2000.

KIER, A. B.; MANN, P.C.; WAGNER, J.E. Disseminated sporotrichosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 175, n. 2, p.202-204, 1979.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, O. Sporotrichosis in farmers, **Journal of UOEH.**, Tokio, v.24, n.2, p.219-224, 2002.

KOEHLER, J.K. The fine structure of normal and irradiated yeast cells and yeast ribosomes. **Univ Calif Rad Lab UCRL-9715**, v.12, p.36-41, 1961.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNET, J.E. **Sporotrichosis**. Medical Mycology: Lea & Fibeger, Philadelphia, p.707-729, 1992.

LARSSON, C. E.; GONÇALVES, M. A.; ARAUJO, V. C. Esporotricose felina: aspectos clínicos e zoonóticos, **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 351-358, 1989.

LIMA, L.B.; PEREIRA Jr, A.C. **Esporotricose: inquérito epidemiológico; importância como doença profissional**. Monografia (Graduação). Universidade do Rio de Janeiro, 1988.

LOPES, J. O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R.; BRUM, L.M.; WESTPHALEN, J.B.; ALTERMANN, M. J.; PRATES, F.B. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba , v.32, n.5, 1999.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.293-308, 2006.

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

MADEO,F.; HERKER, E. Herker; WISSING, S.; JUNGWIRTH, H.; EISENBERG, T; FROHLICH, K. U. Apoptosis in yeast. **Curr. Opin. Microbiol.** v.7, p. 655-660, 2004.

MADRID, I. M. ; MATTEI, A.; XAVIER, M. O.; GUIM, T.; MARTINS, A. A.; FERNADES, C. G.; NOBRE, M. de O. ; MEIRELES, M. C. A. Diferenças clínicas e histopatológicas entre isolados de *Sporothrix schenckii* pigmentados e albinos em modelo murino. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15, 2006, Pelotas, 2006.

MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; CARAPETO, L. P.; ANTUNES, T.A.; SANTOS Jr., R.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose óssea e cutânea em canino, **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.44, n.6, p.441-443, 2007.

MARINON, R; CANO, J; GENE, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p.3198-3206, 2007.

MARIMON, R.; GENE, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; DOS SANTOS LAZERA, M.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, p. 3251-3256, 2006.

MARTINS, E. M. N. et al. Immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* induces a long lasting protection in BALB/c mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, p.7893-9, 2007.

MATTEI, A. S.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; SANTIM, R.; ANTUNES, T.; MEINERZ, A. R.; MEIRELES, M. C. A.; NOBRE, M. de O. Avaliação da melanina em isolados selvagens de *Sporothrix schenckii* durante inoculação experimental em modelo murino. Universidade Federal de Pelotas, **XV Congresso de Iniciação Científica**, 2006

MEDLEAU, L.; HNILICA, A. K. **Dermatologia de Pequenos Animais: Atlas Clorido e Gia Terapêutico**. São Paulo: Roca, 2003. 354p.

MEISSEL,M; MEDVEDEVA, G; BIRJUSOVA, V; POMOSHNIKOVA, N; ZVJAGILSKAJA, R. Structure and development of normal and X-irradiated yeast protoplasts. **Abh Deul Akad Wiss**, Berlin, v.6, p. 43–54, 1966.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B.L.; AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *in vitro* and during mammalian infection, **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n.7, p.4026-4033, 2003.

MUNDELL, A. C. New therapeutic agents in veterinary dermatology, **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Maryland Heights, v. 20, n. 6, p. 1541-1556, 1990.

NAKAMURA, Y.; SATO, H.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, H.; KOIDE, K.; HASEGAWA, A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan, **Mycosis**, Tokyo, v. 39, n. 3-4, p. 125-128, 1996.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Dermatomycosis in human and animals. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.**, Tokyo, v.40, n.1, p.9-14, 1999.

NASCIMENTO, R. C.: **Identificação e caracterização de componentes antigênicos proteicos secretados por *S. Schenckii***. 2004. 74 p. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2004.

NOBRE, M. O. **Avaliação da virulência de diferentes cepas de *Sporothrix schenckii***. 2004. 77p. Tese (Doutorado) Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

NOBRE, M. O; ANTUNES, T. A.; FARIA, R. O; CLEFF, M.B.; FERNANDES, C. G.;MUSCHNER, A.C.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Differences in virulence between isolates of feline sporotrichosis, **Mycopathologia**, Pelotas, v. 160, p. 43-49, 2005.

NOBRE, M. O.; ANTUNES, T.A.; OLIVEIRA, I. A.; BERG, V.; JUNIOR, T.L.; FERNANDES, C.G.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Development of experimental sporotrichosis in a murine model with yeast and mycelial forms of *Sporothrix schenckii*, **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.31, p. 165-170, 2003.

NUSBAUM, B. P.; GULBAS, N.; HORWITZ, S. N. Sporotrichosis acquired from a cat, **Journal of the American Academy of Dermatology**, Auburn, v. 8, p. 386-391, 1983.

OKEKE, C.; COLE, G.T. Morphological defects and loss of virulence of *Coccidioides posadasii* caused by disruption of CHS5, encoding a chitin synthase with myosin motor like domain. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 103rd, Washington, D.C., **Anais...** p.227, 2003.

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

PAPPAGIANIS, D. Evaluation of the protective efficacy of the killed *Coccidioides immitis* spherule vaccine in humans. The Valley Fever Vaccine Study Group, **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 148, p. 656-660, 1993.

PASCHEV, I; SPASSOVA, N; KOSTOV, V; KASCHUKKEVA, M. Gamma Strahlen auf die subzellulare Struktur von Rhodotorula. **Abh Deul Akad Wiss**, Berlin, v. 6, p. 243–51, 1966.

PINHO, J.R.R.; CARDI, B.A.; ANDRADE Jr, H.F.; BARR, P.J.; BATHURST, I.C.; VICENTE, E.J.; SCHENBERG, A.C. Immunogenic properties of the *M. leprae* recombination 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gammairradiation. **Int. J. Leprosy**, v. 63(3), p.381-390, 1995.

READ, S.I.; SPERLING, L. C. Feline sporotrichosis, **Arch. Dermatol.**, v. 118, n. 6, p. 429-431, 1982.

REINA-SAN-MARTIN, B.; DEGRAVE, W.; ROUGEOT, C.; COSSON, A; CHAMOND, N.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; ARALA-CHAVE,S M.; COUTINHO, A.; MINOPRIO, P. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase, **Nat. Med.**, v. 6, p. 890-897, 2000.

REIS, R. S.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. DE M.; TAVARES, P. M. E S.; MONTEIRO, P. C. F.; SCHUBACH, T. M. P.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil, **Memórias**, Instituto Oswaldo Cruz, v.104, n.5, 2009.

RESENDE, P. P. DE; FRANCO, A. V. Esporotricose cutâneo-linfática. In: CADERNOS BRASILEIROS DE MEDICINA – Doenças Infecciosas. v. XIV, n. 1, 2, 3, 4. 2001.

RESENDE, P. P. DE; FRANCO, A. V. Esporotricose cutâneo-linfática – cadernos brasileiros de medicina – 2003. Monografia (Serviço do Prof. Mário Barreto Corrêa Lima; Clínica Médica “A”) Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

RHIND, N.; RUSSEL, P. Tyrosine phosphorylation of cdc2 is required for the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol. Cell Biol.** v. 18, p: 3782-3787, 1998.

RIVIER, D. et al. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge, **Parasite Immunology**, v.15, p. 75-84, 1993.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrixschenckii*, **Infection and Immunity**, Washington, v.68, p.3697-3703, 2000.

ROZE, L.V; LINZ, J.E. Lovastatin triggers an apoptosis-like death process in the fungus *Mucor racemosus*. **Fung Genet Biol** . v.25, p. 119-33, 1998.

SALEH, Y. G., MAYO, M. S.; AHEARN, D. G..Resistance of some common fungi to gamma irradiation. **Applied and environmental microbiology**, v.54, n.8, . p. 2134 – 2135, 1988.

SAMPAIO, S.A.P.; LACAZ, C.S.; ALMEIDA, F. Aspectos clínicos da esporotricose, **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v. 9, p.391-402, 1954.

SCHIAPPACASSE, R. H.; COLVILLE, J. M.; WONG, P.K et al. Sporotrichosis associated with an infected cat, **Cutis.**, v. 35, n. 3, p. 268-270, 1985.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A. Sporotrichosis of cat and dog – review. **Clin. Vet.** , v. 29, p. 21-24, 2000.

SHARMA, R. L.; BHAT, T. K.; DHAR, D. N. Control of Sheep lungworm in India, **Parasitology Today**, v. 4, p. 33-36, 1988.

SHAW, J.C.; LEVINSON, W.; MONTANARO, A. Sporotrichosis in the acquired immunodeficiency syndrome, **Journal of American Academy Dermatology**, Auburn, v. 21, p.1145– 1147, 1989.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA, F. M. V.; MEINERZ, A. R. M.; ALBANO, A.P.; ANTUNES, T. A.; MARTINS, A. A; MATTEI, A.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Esporotricose Sistêmica Experimental: Comparação da Resposta Clínica em Ratos Wistar Inoculados com Isolado Felino e Canino. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16, 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas, 2007.

SINGER, J. I. ; MUNCIE, J. E. Sporotrichosis, **J. Med.**, New York, v. 52, p.2147, 1952.

TAYLOR, S. M.; MALLON, T. R.; GREEN W. P. Comparison of vaccination and ivermectin treatment in the prevention of bovine lungworm, **Vet. Rec.**, v.119, p.370-372, 1986.

TILLEY, L. P.; SMITH Jr, F. W. K ; **Consulta Veterinária em 5 minutos, Espécies canina e felina**. São Paulo: Manole, 2003, 1423p.

TSAI, H.F.; CHANG, Y.C.; WASHBURN, R.G.; WHEELER, M.H.; KWON-CHUNG, K.J. The developmentally regulated alb-1 gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.20, p. 3031-3038, 1998.

URBAN, J. F.; TROMBA, F. G. Development of immune responsiveness to *Ascaris suum* antigens in pigs vaccinated with ultraviolet attenuated eggs. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v.3, p.399-409, 1982.

VIEIRA-DIAS, D.; SENA, C. M.; ORÉFICE, F.; TANURE, M.A.G.; HAMDAN, J. S. Ocular and concomitant cutaneous sporotrichosis, **Mycosis**, Belo Horizonte, v.40, n.5-6, p.107-201, 1997.

VINAYAK, V. K. *et al.* Efficacies of vaccines against canine hookworm disease, **Parasitology**, v. 82, p.375-82, 1981.

VISMER, H.F.; EICKER, A. Growth of human pathogenic isolates of *Sporothrix schenckii* on indigenous and exotic wood species in South Africa, **Mycol Res**, v. 98, p. 121-124, 1994.

VOS, G. J.; GARDINER, P. R. Antigenic relatedness of stocks and clones of *Trypanosoma vivax* from east and west, **Parasitology**, v. 100, p. 101–106, 1990.

XAVIER, M.O.; NOBRE, M.O.; SAMPAIO Jr, D.P.; ANTUNES, T.A.; NASCENTE, P.S.; SÓRIA, F.B.A.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose felina com envolvimento zoonótico, relato de caso na cidade de Pelotas, **Ciência Rural**, local, v.34, n.6, p.1961-1963, 2004.Z

WALES, A.; KUSEL, J. R. Biochemistry of irradiated parasite vaccines; suggested models for their mode of action, **Parasitology Today**, v.8, p.358-363, 1992.

WEDRYCHOWICZ, H.; MACCLEAN, J.M.; HOLMES, P.H. Nippostrongylus brasiliensis: local humoral responses in the lungs and intestines of rats following vaccination with irradiated larvae, **Exp Parasitol.**, v. 1, p. 25-33, 1984.

WERNER, A. H.; WERNER, B. E. Feline sporotrichosis, **Small animal**, v.15, n. 9, p. 1189-1197, 1993.

WIGNEY, D. I. ; OXENFORD, C. J. Feline sporotrichosis: successful surgical resolution, **Aust. vet. practit.**, v. 23, n. 1, p. 28-30, 1993.

WOLF, A.M; TROY, G.C.; Moléstias Micóticas profundas, In: ETTINGHER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- Moléstias do Cão e Gato**, 4 ed., São Paulo: Manole, p.650-653, 1995.

WÜTHRICH, M.B.; FILUTOWICZ, H.I.; KLEIN, B.S. Mutation of the WI-1 gene yield an attenuated *Blastomyces dermatitidis* strain that induces host resistance, **J. Clin. Invest**; local, v. 106, p.1381-1389, 2000.

WÜTHRICH, M.; FILUTOWICZ, H.I.; WARNER, T.; DEEPE, G.S.; KLEIN, B.S. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4⁺ help in exogenous antigen presentation to CD8⁺ T cells: implications for vaccine development in immunodeficient hosts, **J. Exp. Med.**, v. 197, p.1405-1416, 2003.

YANG, D. M.; ROGERS, M. V.; LIEW, F. Y. Identification and characterization of host-protective T-cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major*, **Immunology**, v. 72, p. 3-9, 1991.

YATES, J.A.; HIGASHI, G.I. Ultrastructural observations on the fate of *Brugia malayi* in jirds previously vaccinated with irradiated infective stage larvae, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**,v.35, p.982-987,1986. X

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, A.S.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: 1998.

ZAMRI-SAAD, M.; SALMIYA, T. S.; JASNI, S. *et al.* Feline sporotrichosis: an increasingly important zoonotic disease in Malaysia, **Veterinary record**, v. 127, p. 480, 1990.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)