

Campus Realengo
Graduação em Farmácia

Beatriz da Silva Motta

Expressão gênica da enzima
urease em cepas de *Sporothrix*
brasiliensis

Rio de Janeiro
2020

BEATRIZ DA SILVA MOTTA

**EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA UREASE EM CEPAS DE
*Sporothrix brasiliensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto Federal do Rio de Janeiro, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia

Orientadores: Dr. Luã Cardoso de Oliveira, Dr^a
Rosely Maria Zancopé Oliveira e Prof^a Dr^a
Débora Leandro Rama Gomes.

Rio de Janeiro - Realengo
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Karina Barbosa dos Santos

Bibliotecária - CRB 7 nº 6212

M921

Motta, Beatriz da Silva

Expressão gênica da enzima urease em cepas de *Sporothrix brasiliensis*. / Beatriz da Silva Motta, 2020.

60f.: il.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Débora Leandro Rama Gomes.

Coorientador(a): Prof. Dr Luã Cardoso de Oliveira; Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2020.

1. Sporothrix. 2. Urease. 3. Expressão gênica. I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Gomes, Débora Leandro Rama. III. Oliveira, Luã Cardoso de. IV. Oliveira, Rosely Maria Zancopé. V. Título.

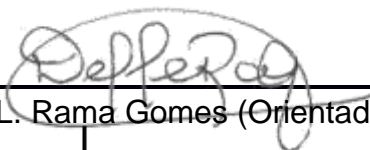
Beatriz da Silva Motta

**EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA UREASE EM CEPAS DE
*Sporothrix brasiliensis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Data da aprovação: 22/12/2020.

Banca Examinadora:



Profª Drª Débora L. Rama Gomes (Orientadora Interna – IFRJ)



Dr. Luã Cardoso de Oliveira (Orientador Externo – INI/Fiocruz)



Drª Rosely Maria Zancopé Oliveira (Orientadora Externa – INI/Fiocruz)



Dr. Marcos de Abreu Almeida (INI/Fiocruz)



M. Sc. Farm. Andrezza do Espírito Santo Cucinelli (HUAP - UFF)

Rio de Janeiro
2020

Dedico este trabalho aos meus pais que
foram incentivadores da minha educação
durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

A parte mais difícil de escrever este trabalho, depois do Resumo, com certeza foi escrever esses agradecimentos. Relembrar todas as etapas me proporcionou imensa alegria, afinal, cheguei ao fim! Entretanto, minhas lembranças me fizeram refletir sobre o quão importante os últimos anos foram em minha vida. Então, começo agradecendo a Deus, pois Ele me permitiu alcançar o final desta longa jornada.

Aos meus pais quero agradecer por toda dedicação ao me ensinar, por me mostrarem, desde cedo, que estudar é importante. Também quero agradecer por todo apoio e incentivo infinitos para que eu formasse. Paulo André e Rosana são os maiores responsáveis por eu ter conquistado meu grande sonho.

Gostaria de ter todos os meus avós para comemorarem comigo este momento, mas infelizmente não é possível. Por isso, quero agradecer à minha avó Herci por representar tão bem o amor que eu recebi.

Quero agradecer a minha família por ter entendido meus momentos de ausência, diversas vezes, por estar estudando ou por ter algum compromisso com a faculdade que impedisse minha presença. Também agradeço ao Paulo Ricardo e sua família por estarem ao meu lado e por me incentivarem.

Aos meus amigos, Gabriel, Lohaine, Pedro, Rafaela, Rayanne e Rebeca quero agradecer por tornarem esses anos mais leves, por terem compartilhado momentos de desespero, cansaço, alegria e os inúmeros trabalhos. Quero agradecer as “farmaravilhosas” por todas as vindas à minha casa para estudar, por revisarem conteúdo e ouvirem diversos desabafos.

Agradeço as professoras Rosana Candida e Alessandra Licursi por terem me proporcionado semestres de monitoria, estes foram fundamentais para que a carreira acadêmica fosse vista por um outro ângulo. Foi muito importante para mim.

À professora Paula Maciel por ter me oferecido o primeiro contato com a pesquisa através de um projeto de iniciação científica. Naquela época eu descobri o que esta área poderia representar para mim.

À professora Débora Rama por ter sido um exemplo durante esses anos, os alunos do IFRJ são privilegiados. Obrigada pela orientação, sempre aprendi muito com você!

Aos meus professores da graduação eu agradeço por compartilharem o conhecimento, cada um contribuiu para minha jornada de diferentes formas, mas todos formaram a profissional que estou me tornando.

Ao doutor Luã Cardoso, meu orientador, por ter me ensinado e compartilhado seus conhecimentos tantas vezes e por ter me “escutado” mais vezes ainda. Obrigada pela orientação e por ter permitido que eu fizesse parte desses seus anos de doutorando.

À doutora Rosely Zancopé, minha orientadora, por ter confiado em mim e ter me dado esse presente, minha iniciação científica. Obrigada pela orientação e oportunidade!

Aos meus companheiros do Setor de Imunodiagnóstico, do Laboratório de Micologia (INI-Fiocruz), por terem sido companheiros de caminhada, por me lembrarem de almoçar e pelos cafés no escritório. E também, ao doutor Otávio Espíndola, por ter cedido o espaço de seu laboratório e contribuído para o projeto e meu aprendizado.

Por fim, quero agradecer ao IFRJ – Campus Realengo por ter se tornado minha segunda casa durante esses anos.

“Você tem, pelo menos, mil capacidades em
você, mesmo que você não ache isso”.

Theodore Finch

MOTTA, B. S. Expressão gênica da enzima urease em cepas de *Sporothrix brasiliensis*. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Farmácia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

RESUMO

O gênero *Sporothrix* é composto por fungos dimórficos e é responsável por causar a esporotricose. Esta micose subcutânea de implantação traumática tem prevalência mundial e é frequentemente negligenciada. A esporotricose pode ser causada pelas seguintes espécies patogênicas: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. chilensis*, *S. luriei* e *S. pallida*. A epidemia de esporotricose observada no Brasil (principalmente no estado do Rio de Janeiro) é a maior já observada e é causada principalmente por *S. brasiliensis*. A urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e carbonato. As cepas de *S. brasiliensis* consideradas mais virulentas produzem mais urease em meio de cultura do que aquelas consideradas menos virulentas. No entanto, ainda não foi observado seu papel funcional em nível molecular (expressão gênica). Este trabalho teve como objetivo geral padronizar reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para a verificação da expressão gênica de urease em cepas de *S. brasiliensis*. Como objetivos específicos, buscou-se (i) avaliar a produção fenotípica de urease em cepas de *S. brasiliensis*; (ii) padronizar a reação de qPCR para avaliar a expressão do gene codificador para urease em cepas de *S. brasiliensis* e (iii) verificar a cinética de expressão de transcritos de urease em função do tempo. Os resultados obtidos demonstraram que as cepas IPEC-34910 e IPEC-16490 foram consideradas produtoras de urease em caldo de ureia de Christensen, enquanto que a cepa IPEC-654-H foi considerada não produtora. Além disso, foi possível determinar que a concentração de 10 μM dos *primers* foi a mais adequada para a realização dos testes de cinética de expressão gênica. A expressão gênica da urease foi calculada em função do gene constitutivo através da fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. A cepa IPEC-34910 exibiu cinética crescente de produção de urease através do tempo. Apesar de uma diminuição após 6h de cultivo, a produção voltou a aumentar após 9h. As cepas IPEC-16490 e IPEC-654-H apresentaram cinética decrescente de produção de urease até 6h de crescimento. Entretanto, foi observado grande aumento da produção de urease após 9h em ambas as amostras. Com base nos resultados encontrados, é possível presumir que o gene *ure* seja um gene constitutivo em *S. brasiliensis*, uma vez que sua expressão foi detectada em meio de cultivo sem ureia como fonte de nitrogênio. Contudo, para confirmar tais hipóteses, é necessário analisar uma maior quantidade de cepas em diferentes condições de cultivo.

Palavras-chave: *Sporothrix*. Urease. Expressão gênica.

MOTTA, B. S. Urease gene expression in *Sporothrix brasiliensis* strains. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Farmácia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

ABSTRACT

The genus *Sporothrix* is composed of dimorphic fungi and is responsible for causing sporotrichosis. This traumatic implantation subcutaneous mycosis has worldwide prevalence and is often neglected. Sporotrichosis can be caused by the following pathogenic species: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosea*, *S. mexicana*, *S. chilensis*, *S. luriei* and *S. pallida*. The epidemic of sporotrichosis observed in Brazil (mainly in the state of Rio de Janeiro) is the largest ever observed and is primarily caused by *S. brasiliensis*. Urease is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of urea into ammonia and carbonate. The strains of *S. brasiliensis* considered more virulent produce more urease in culture medium than those considered less virulent. However, its functional role at the molecular level (gene expression) has not yet been observed. The general objective of this work was to standardize a real-time quantitative PCR (qPCR) reaction to verify the urease gene expression in *S. brasiliensis* strains. As specific objectives, we sought (i) to evaluate the phenotypic production of urease in *S. brasiliensis* strains; (ii) to standardize a real-time quantitative PCR (qPCR) reaction to verify the urease gene expression in *S. brasiliensis* strains and (iii) to verify the expression kinetics of urease transcripts as a function of time. The results showed that the IPEC-34910 and IPEC-16490 *S. brasiliensis* strains were considered to be urease producers in Christensen urea broth, while the IPEC-654-H strain was considered non-producing. In addition, it was possible to determine that the primer concentration of 10 μ M was the most appropriate for performing gene expression kinetic assays. The urease gene expression was calculated as a function of the constitutive gene using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The IPEC-34910 strain exhibited increasing kinetics of urease production overtime. Despite a reduction after 6h of cultivation, production enhanced again after 9h. The IPEC-16490 and IPEC-654-H strains showed decreasing kinetics of urease production up to 6h of growth. However, a large increase in urease production was observed after 9h in both samples. Based on the results, it is possible to assume that the *ure* gene is a constitutive gene in *S. brasiliensis*, since its expression was detected in culture medium without urea as a nitrogen source. Nevertheless, to confirm such hypotheses, it is necessary to analyze a greater number of strains under different cultivation conditions.

Keywords: *Sporothrix*. Urease. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	15
Figura 2 - Modelo tridimensional da enzima urease.	21
Figura 3 - Fluxograma do crescimento fúngico com o objetivo de esgotar a produção de ureia da cepa IPEC-34910 de <i>S. brasiliensis</i>	26
Figura 4 - Produção de urease pelas cepas de <i>S. brasiliensis</i> em caldo de ureia de Christensen.	31
Figura 5 - Produção de urease das cepas ATCC 18804 de <i>C. albicans</i> e ATCC 32045 de <i>C. neoformans</i> em caldo de ureia de Christensen.	32
Figura 6 - Densidade óptica da análise fenotípica das cepas de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910, IPEC-16490, IPEC-654-H, <i>C. neoformans</i> ATCC 32045 e <i>C. albicans</i> ATCC 18804 após 4 e 7 dias de cultivo.	32
Figura 7 - Curva de <i>melting</i> do <i>primer</i> L6 com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910.	33
Figura 8 - Curva de <i>melting</i> do <i>primer</i> L34 com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910.	34
Figura 9 - Curva de <i>melting</i> do <i>primer</i> GAPDH com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910.	34
Figura 10 - Curva de <i>melting</i> do <i>primer</i> EF1A com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910.	35
Figura 11 - Curva de <i>melting</i> do <i>primer</i> EF1A nas concentrações 5µM, 10µM e 20µM.	36
Figura 12 - Curva de amplificação de EF1A a 10µM com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910 nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/µL.	37
Figura 13 - Curva de <i>melting</i> de EF1A a 10µM com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910 nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/µL. Temperatura: 87,25°C.	37
Figura 14 - Curva de amplificação de URE a 10µM com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910 nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/µL.	38
Figura 15 - Curva de <i>melting</i> de URE a 10µM com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910 nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/µL. Temperatura: 91,55°C.	38

Figura 16 - Representação da reta obtida para obtenção de 115% de eficiência de EF1A.	39
Figura 17 - Representação da reta obtida para obtenção de 106% de eficiência de URE.	39
Figura 18 - $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de urease em função de EF1A, demonstrando a cinética de expressão gênica nos tempos de produção de cDNA (0h, 3h, 6h e 9h) referente à cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910.	41
Figura 19 - $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de urease em função de EF1A, demonstrando a cinética de expressão gênica nos tempos de produção de cDNA (0h, 3h, 6h e 9h) referente à cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-16490.	42
Figura 20 - $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de urease em função de EF1A, demonstrando a cinética de expressão gênica nos tempos de produção de cDNA (0h, 3h, 6h e 9h) referente a cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-654-H.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela representativa do conjunto de <i>primers</i> utilizados nas reações de qPCR.....	29
Tabela 2 - Dados de Ct das reações de qPCR dos <i>primers</i> L34, L6, GAPDH e EF1A com cDNA da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910.....	33
Tabela 3 - Representação dos Cts para definição da concentração do <i>primer</i> EF1A para estudos futuros.....	36
Tabela 4 - Dados das reações de qPCR referentes aos tempos 0h, 3h, 6h e 9h de crescimento da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-34910.....	40
Tabela 5 - Dados das reações de qPCR referentes aos tempos 0h, 3h, 6h e 9h de crescimento da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-16490.....	40
Tabela 6 - Dados das reações de qPCR referentes aos tempos 0h, 3h, 6h e 9h de crescimento da cepa de <i>S. brasiliensis</i> IPEC-654-H.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI: *Brain Heart Infusion* (infusão cérebro-coração)

cDNA: DNA complementar

Ct: *Cycle threshold*

DEPC: Reagente dietil pirocarbonato

DO: Densidade ótica

EF1A: Fator de alongação 1A

ELISA: Ensaio imunoenzimático

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

INI-Fiocruz: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fiocruz

L34: Proteína ribossomal L34

L6: Proteína ribossomal L6

PCR: Reação da polimerase em cadeia

qPCR: Reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real

R²: Coeficiente de correlação

RNA: Ácido ribonucleico

RPM: Rotações por minuto

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase com a enzima transcriptase reversa

URE: Gene da urease

UV: Ultravioleta

YCB: *Yeast Carbon Base*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. GÊNERO <i>Sporothrix</i> : BREVE HISTÓRICO	14
1.2. MORFOLOGIA	15
1.3. ESPOROTRICOSE	15
1.4. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO	17
1.5. QUADRO CLÍNICO	18
1.6. DIAGNÓSTICO	19
1.7. VIRULÊNCIA DE <i>Sporothrix</i>	20
1.8. FATOR DE VIRULÊNCIA: UREASE	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. METODOLOGIA	25
3.1. CEPAS DE <i>S. brasiliensis</i>	25
3.2. ANÁLISE FENOTÍPICA.....	25
3.3. CULTIVO DAS CEPAS SELECIONADAS	26
3.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA	27
3.5. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA EM DNA COMPLEMENTAR (cDNA).....	28
3.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR).....	28
3.7. MÉTODO $2^{-\Delta\Delta Ct}$	30
4. RESULTADOS	31
4.1. ANÁLISE FENOTÍPICA.....	31
4.2. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE qPCR	33
4.2.1. Definição do <i>primer</i> constitutivo.....	33
4.2.2. Definição da concentração do <i>primer</i> constitutivo	35
4.2.3. Eficiência da reação	36
4.3. CINÉTICA DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A – Produção Acadêmica	59
ANEXO B – Premiação	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. GÊNERO *Sporothrix*: BREVE HISTÓRICO

A esporotricose humana teve seu primeiro caso descrito em 1898, em Baltimore, Estados Unidos da América, em um paciente no Hospital Johns Hopkins que apresentou abscesso em dedo com linfagite nodular em antebraço (SCHENCK, B., 1898 *apud* OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). No segundo caso descrito, em 1900, por Hektoen e Perkins (1900), o fungo foi isolado e denominado como *Sporothrix schenckii*. Já no Brasil, as primeiras descrições foram feitas em 1907 e 1908 por Lutz e Splendore (2004) que isolaram este fungo na mucosa bucal de ratos. Até a segunda década do século foram descritos muitos casos de formas generalizada. Na década de 1940, na África do Sul, foram registrados mais de 3.000 casos da doença em 2 anos, caracterizando a primeira grande epidemia de esporotricose em humanos (QUINTAL, 2000 *apud* REIS, 2016).

Singer e Muncie (1952) descreveram o primeiro caso de esporotricose humana com histórico de manuseio de gato infectado e após esse dado foi constatado que poderia haver casos de transmissão zoonótica (BARROS *et al.*, 2013).

Por muito tempo, o agente causador da esporotricose pertenceu ao gênero *Sporotrichum* até o ano de 1962, entretanto, estudos de sua morfologia e fisiologia constataram algumas diferenças entre este fungo e outros pertencentes a este gênero, sendo que a maioria dos exemplares deste gênero não apresentam patogenicidade ao homem e nem a outros animais (CARMICHAEL, 1962).

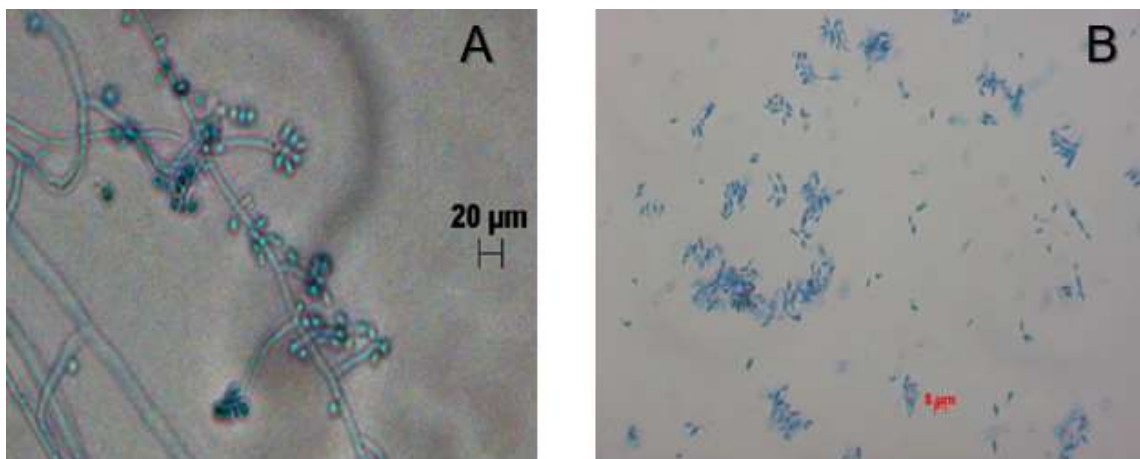
Após este e outros estudos, o agente causador da esporotricose recebeu o nome de *S. schenckii*, que, na época foi considerada a única espécie causadora da doença (LACAZ *et al.*, 2002). Em 2006, Marimon e colaboradores verificaram, após análises filogenéticas, diferenças entre diversas cepas de diferentes regiões geográficas, assim no ano seguinte, 2007, estes mesmos pesquisadores propuseram a divisão de *S. schenckii* em um complexo com outras três espécies causadoras de esporotricose, além de *S. schenckii*, sendo elas: *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix brasiliensis* (MARIMON *et al.*, 2006; MARIMON *et al.*, 2007). Atualmente, as espécies *Sporothrix pallida* (MORRISON *et al.*, 2013), *Sporothrix chilensis* (RODRIGUES *et al.*, 2016) e *Sporothrix luriei* (PADHYE *et al.*, 1992) também são consideradas causadoras desta doença.

1.2. MORFOLOGIA

O gênero *Sporothrix* é composto por fungos dimórficos, ou seja, se apresenta na forma filamentosa no solo ou em meios de cultura apropriados, como os meios Mycosel e Sabouraud, na temperatura de 25°C a 30°C, onde se comportam macroscopicamente como colônias úmidas, glabras com superfície enrugada e dobrada. Já microscopicamente, como hifas septadas, finas e hialinas, de 1-2 µm de largura, em que seus conídios são ovoides ou alongados, medindo 3-6 x 2-3 µm, com paredes lisas e aparecendo a partir de hifas indiferenciadas com arranjo semelhante a margarida (Figura1). A pigmentação pode variar de branco a creme e até negro (ZANCOPE-OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Em parasitismo ou em meios de cultura apropriados, como meio infusão cérebro-coração (BHI – *Brain Heart Infusion*), com crescimento em temperatura de 35°C a 37°C, o fungo assume a forma de levedura e se divide por brotamento. Esta forma apresenta como características macroscópicas, colônias de coloração branca a creme e glabras. E microscopicamente, as leveduras são unicelulares e essas células se apresentam esféricas ou ovais, globosas ou em “forma de charuto”, como representado na Figura 1 (ZANCOPE-OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Figura 1 - Morfologia de *Sporothrix brasiliensis*.



A – Representação da forma filamentosa. B – Representação da forma de levedura.

Fonte: OLIVEIRA, 2020.

1.3. ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma micose subcutânea de implantação traumática com prevalência mundial, sendo negligenciada com frequência (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017), uma vez que a maioria dos casos não são notificados e divulgados, assim, a

população desconhece a gravidade da infecção e não possui informação sobre o número de casos na região em que reside mantendo o ciclo de contaminação. Além disso, a ausência de informação contribui para automedicação e execução de animais. Esta micose pode ser causada pelas seguintes espécies patogênicas:

- a) ***S. schenckii***: Considerado o principal agente etiológico no mundo (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011), e por muitos anos considerado o único fungo causador da esporotricose até a separação em espécies patogênicas do gênero por Marimon e colaboradores (2006). Apresenta L-ramnose que, junto com glicopeptídeos, ramnomananas, colaboram para patogenicidade do fungo, assim como a presença de adesinas para fibronectinas na superfície do fungo em murinos (KAUFFMAN *et al.*, 2007).
- b) ***S. brasiliensis***: é a espécie considerada mais virulenta do gênero (ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009) e principal causadora da hiperendemia de esporotricose observada no estado do Rio de Janeiro (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014). Esta espécie parecia estar restrita ao Brasil (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). Entretanto, em 2018 foram publicados casos na Argentina de esporotricose em humanos e em animais causada por *S. brasiliensis* (CÓRDOBA *et al.*, 2018). É a principal espécie associada a transmissão zoonótica em sua maioria por felinos (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2016).
- c) ***S. luriei***: é uma espécie de ocorrência mais rara, isolada pela primeira vez em um caso na África do Sul (AJELLO; KAPLAN, 1969). A diferenciação para os outros fungos patogênicos do gênero é feita através de análises fenotípicas e testes moleculares. Sua baixa prevalência pode estar ligada com a baixa virulência observada nesta espécie (CRUZ *et al.*, 2018).
- d) ***S. globosa***: espécie pouco virulenta e encontrada em várias partes do mundo (MADRID *et al.*, 2009), contudo é mais observada na Ásia (KANO *et al.*, 2013; LIU; ZHANG; ZHOU, 2014) e Venezuela (CAMACHO *et al.*, 2015).
- e) ***S. mexicana***: espécie responsável por alguns casos na Europa e no Brasil, e também por amostras ambientais no México (DIAS *et al.*, 2011; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2013).

- f) ***S. chilensis***: espécie incluída recentemente no gênero com características morfológicas atípicas, e é considerada pouco virulenta em murinos. (RODRIGUES *et al.*, 2016).
- g) ***S. pallida***: espécie anteriormente chamada de *S. albicans*, conhecida por ser ambiental, não-virulenta e se mostrou não patogênica em ensaios com murinos (ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009).

1.4. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

A esporotricose tem distribuição universal, principalmente em regiões tropicais e temperadas, sendo classicamente considerada uma doença ocupacional. Por isso, já foi conhecida como “doença dos jardineiros”, pois sua transmissão se dá pela inoculação traumática a partir de espinhos de plantas ou farpas de madeira, prejudicando trabalhadores agrícolas e de cultivo de rosas. Profissionais de laboratório são raramente infectados de forma acidental pela manipulação de culturas de *Sporothrix* (KWON-CHUNG; BENNET, 1992; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2016).

Atividades ocupacionais ou de lazer, como floricultura, horticultura, jardinagem, pesca, caça, agropecuária, mineração e exploração de madeira, podem representar exposição ao fungo e, conseqüentemente, podem estar também relacionadas à transmissão do mesmo (RIPPON, 1988; KAUFFMAN *et al.*, 2007).

A epidemia de esporotricose observada no Brasil desde 1998, principalmente no estado do Rio de Janeiro, é a maior já descrita e é causada majoritariamente por *S. brasiliensis*, chegando a 7.897 casos notificados em humanos de 1992 até 2015 (FALCÃO, 2018). Além dos casos de esporotricose em humanos, foram diagnosticados 5.113 casos de esporotricose felina de 1998 a 2018 e 244 casos de esporotricose canina até o ano de 2014 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-Fiocruz, Rio de Janeiro) (GREMIÃO *et al.*, 2017; 2020).

De fato, a epidemia no estado do Rio de Janeiro difere de outros lugares do mundo, uma vez que o gato doméstico atua como principal fonte de infecção (SILVA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; GREMIÃO *et al.*, 2017, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020). No entanto, nos últimos anos, houve aumento do número de casos no estado do Rio Grande do Sul, sendo descritos mais de 100 casos em cinco anos (BRANDOLT *et al.*, 2018). Tal fato pode ser justificado pelo meio de transmissão mais comum observado no Brasil: a mordedura ou a arranhadura por gatos infectados, que são

muito susceptíveis à doença (ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009). Sendo assim, veterinários, tratadores e donos dos animais domésticos são considerados grupos de risco para esta micose (DUNSTAN; REIMANN; LANGHAM, 1986; LARSSON *et al.*, 1989).

Em novembro de 2020, o evento *online* intitulado “Esporotricose humana e animal: tirando dúvidas e trocando ideias” abordou o aumento de casos desta micose em todo o país. Este evento foi organizado pelo INI-Fiocruz e contou com a participação de profissionais e pesquisadores que atuam na assistência, vigilância e controle desta doença nas esferas municipal, estadual e federal (Ministério da Saúde). A zona oeste do Rio de Janeiro foi apontada como foco da infecção no município: a representante de um hospital da região informou o tratamento de aproximadamente 400 animais e o registro de 150 novos casos por mês durante a atual pandemia. Além disso, a necessidade da notificação compulsória foi reforçada, uma vez que a maioria dos casos é subnotificada. Por fim, diferentes representantes expuseram projetos para a criação de protocolos de atendimento e tratamento desta infecção (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2020).

1.5. QUADRO CLÍNICO

A patogenia é iniciada com a inoculação do fungo na pele ou mucosas de forma traumática por plantas ou animais (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2016). Após a inoculação, alguns fatores como virulência da cepa infectante, profundidade e tamanho do inóculo fúngico e *status* imunológico do paciente contribuem para um amplo espectro clínico que pode ser observado nessa infecção (CARLOS *et al.*, 2009).

As manifestações clínicas podem ser agrupadas em cutânea fixa, linfocutânea, cutânea disseminada e extracutânea (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Suas características são:

- a) **Linfocutânea:** é considerada a forma mais predominante e também de mais fácil diagnóstico. Após a inoculação, há uma lesão inicial no sítio do inóculo e a partir desta surgem lesões secundárias ao longo do caminho dos vasos linfáticos que se estendem ao linfonodo adjacente a lesão. Os locais mais afetados são as extremidades superiores. As lesões podem ser úlceras de base infiltrada, nodular, papulosa, por exemplo (FREITAS, 2014).

- b) **Cutânea fixa:** é considerada a segunda forma mais frequente, geralmente, acomete crianças e adultos saudáveis. Após a inoculação, a lesão se mantém restrita ao local do inóculo, sendo a face, pescoço e tronco os locais mais afetados. As lesões podem ser reconhecidas como úlceras, placas verrucosas, acneiformes ou placas infiltradas (FREITAS, 2014).
- c) **Cutânea disseminada:** é considerada a terceira forma mais observada na clínica médica e acomete indivíduos imunocomprometidos. Após a inoculação, através da via hematogênica, há a disseminação na pele. As lesões são subcutâneas e amolecidas em sua forma inicial e podem ulcerar após determinado tempo (FREITAS, 2014).
- d) **Extracutânea:** é considerada a forma mais rara e também de mais difícil diagnóstico. O indivíduo pode adquirir esta forma através da disseminação hematogênica, inalação de conídios, convívio com lesão cutânea e, por fim, inoculação direta. Pode acometer qualquer órgão ou tecido e os sintomas apresentados estão relacionados a estes. Além disso, geralmente, os indivíduos também apresentam lesão cutânea (FREITAS, 2014).

1.6. DIAGNÓSTICO

O método de referência para o diagnóstico é a cultura e visualização do agente, pois observa-se as estruturas fúngicas. Primeiramente, após a coleta do material clínico proveniente da lesão (raspagem, *swab*, aspirado de lesão ou biópsia) o fungo é inoculado em meio Sabouraud dextrose e Mycosel, para crescimento em sua forma filamentosa (25-30°C), e então este fungo é inoculado em meio BHI a 35°C - 37°C para conversão na forma de levedura e somente após a comprovação do dimorfismo é confirmado o diagnóstico. Outro método utilizado em evidências cutâneas é o exame histopatológico, neste as células na forma de levedura podem ser observadas com a coloração hematoxilina e eosina, prata de Gomori ou ácido periódico-Schiff, em biópsias de pele para identificação das estruturas fúngicas (QUINTELLA et al., 2011). Procedimentos invasivos são realizados nas formas extracutâneas ou disseminadas sem evidência cutânea (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; BARROS et al., 2013).

O método de ensaio imunoenzimático (ELISA) proporciona um diagnóstico sorológico presuntivo com a pesquisa de anticorpos anti-*Sporothrix*, este método disponibiliza resultados em menor tempo, enquanto o tempo do diagnóstico em

cultura é longo. Então, principalmente, para portadores de HIV que são considerados imunocomprometidos, utilizar o método de ELISA proporciona um diagnóstico mais rápido e, conseqüentemente, o início do tratamento imediato (ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2011; BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2015). Entretanto, este método ainda não é utilizado rotineiramente em laboratórios clínicos.

Para identificação molecular das espécies é recomendado o sequenciamento de DNA usando principalmente as regiões ITS, D1/D2, β -tubulina e calmodulina (MARIMON *et al.*, 2007), que diferencia os fungos do gênero a nível de espécie. Outro método é a reação da polimerase em cadeia (PCR) com *primers* específicos que pode detectar e identificar as diferentes espécies de *Sporothrix sp.* em amostras de culturas e clínicas, além disso, este método é considerado como preciso e sensível (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2015).

1.7. VIRULÊNCIA DE *Sporothrix*

As manifestações clínicas da esporotricose podem ser influenciadas pela expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção, associada à sua permanência, que pode resultar na virulência. A capacidade e velocidade de dimorfismo apresentado por espécies de *Sporothrix* é considerado um dos principais fatores de virulência (FERNANDES, 2013; OLIVEIRA, 2016).

Alguns fatores de virulência bem descritos nas mais variadas espécies de fungos, como melanina, peróxido de ergosterol, produção de proteínas ou glicoproteínas e termotolerância, estão associadas à infecção por *Sporothrix*. Sabe-se que sua termotolerância é fundamental para o parasitismo, por exemplo (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2012).

O gênero *Sporothrix* produz três tipos de melanina, sendo uma delas a piomelanina, que é um composto solúvel que recobre as células fúngicas e protege da luz ultravioleta (UV), antifúngicos, como anfotericina B, reativos de nitrogênio e oxigênio (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2012).

O peróxido de ergosterol é formado, na fase leveduriforme, para evitar espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose exercida pelo organismo do hospedeiro, assim protege o fungo (CARLOS *et al.*, 2009). Há também as adesinas, que após a inoculação do fungo na pele, realizam a adesão nas células endoteliais e epiteliais (LIMA *et al.*, 1999).

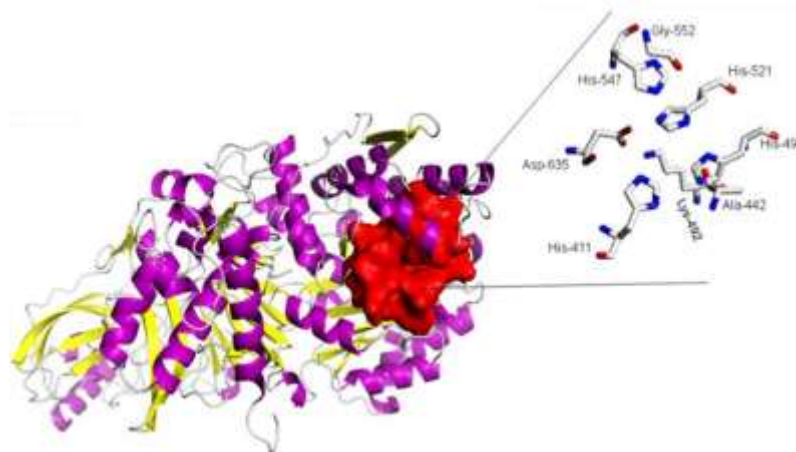
Segundo Almeida-Paes *et al.* (2015), *S. brasiliensis* expressa urease e proteases, que são fatores que podem colaborar para as manifestações clínicas, entretanto, são necessários mais ensaios que confirmem suas contribuições para virulência de *S. brasiliensis*, assim como as ações observadas em outros fungos.

1.8. FATOR DE VIRULÊNCIA: UREASE

A urease é uma enzima que catalisa a hidrólise de ureia em amônia e carbonato, este último transforma-se, espontaneamente, em bicarbonato, esse processo é rápido e eficiente (KARPLUS; PEARSON; HAUSINGER, 1997). Tal atividade permite que a urease tenha importância na patogênese de diversas espécies bacterianas e fúngicas, uma vez que pode contribuir para colonização em tecidos e causar danos mais graves a estes, por exemplo.

Esta enzima apresenta três domínios estruturais, que serão alterados dependendo do micro-organismo produtor, diferenciando as ações da enzima, e um catalítico, em que se liga ao íon níquel (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995; SIMONI; HILL; VAUGHAN, 2002). O movimento intramolecular desta enzima fortalece sua ligação com a ureia, e quando a conformação é alterada de fechada para aberta há a liberação de amônia (BENINI *et al.*, 1999). É importante destacar que a urease tem seu mecanismo de catálise semelhante em todas suas apresentações (KOSIKOWSKA; BERLICKI, 2011). Na Figura 2 há a representação do modelo tridimensional desta enzima.

Figura 2 - Modelo tridimensional da enzima urease.



Neste modelo há a representação da fenda catalítica, a qual é formada pelas estruturas α -hélice (cor roxa), β -pregueada (cor amarela) e de alça (cor cinza). A cor vermelha representa o centro ativo da enzima. Fonte: OLIVEIRA, 2016.

É possível afirmar que há produção de urease em múltiplas plantas, fungos, bactérias e invertebrados (MCCARTY; BREMNER, 1991). Além disso, a enzima urease possui papel fisiológico diverso, uma vez que permite a utilização de ureia como fonte de nitrogênio e também apresenta intensas atividades indiretas, alheias à captação de nitrogênio, como atividade tóxica em insetos e protetora em algumas plantas, atividade de agregação plaquetária em alguns mamíferos, ou seja, exerce diferentes papéis na natureza (FOLLMER, 2008; CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

A atividade da urease pode ser descrita como fator causal de diversas condições clínicas associadas ao trato gástrico e urinário, em infecções por *Proteus mirabilis*, *Ureplasma urealyticum*, *Helicobacter pylori* e *Klebsiella aerogenes* (KOSIKOWSKA; BERLICKI, 2011).

Além disso, a amônia derivada da hidrólise da ureia pode ser usada como fonte de nitrogênio pelos patógenos. A urease é um fator de virulência bem descrito na infecção microbiana por *Helicobacter pylori*, uma vez que a hidrólise da ureia no estômago humano fornece NH_3 que permite a elevação do pH ácido. Esta elevação é benéfica para a colonização da bactéria no epitélio gástrico, uma vez que em pH ácido a bactéria sobrevive por poucos minutos, limitando sua colonização. É importante ressaltar que devido ao pH mais elevado, a bactéria consegue alcançar e se manter no epitélio gástrico. E também, a ação da urease modula o pH fagossômico, aumentando-o e impedindo que o fagossoma amadureça, favorecendo a sobrevivência da bactéria em macrófagos (GOBERT *et al.*, 2002; SCHWARTZ; ALLEN, 2006; SALAMA; HARTUNG; MULLER, 2013; RUTHERFORD, 2014).

O gene codificador da urease (*ure*) foi clonado pela primeira vez em fungos da espécie *Coccidioides immitis* (YU *et al.*, 1997), após essa clonagem e as descobertas sobre urease de *C. immitis* foi possível considerar a hidrólise da ureia como um fator de virulência de alguns agentes fúngicos, podendo assim, ter uma vantagem no processo de infecção, neste modelo, em que sua expressão pode ser demonstrada *in vivo*, e sugere que tal gene participe da patogênese e esporulação do fungo (FEDER *et al.*, 2015).

A ação da urease em *Cryptococcus neoformans* aumenta a invasão deste fungo no sistema nervoso central ao viabilizar a entrada de leveduras nos capilares da barreira hematoencefálica. Em *Coccidioides posadasii*, a amônia liberada através da hidrólise de ureia, durante a fase de endoesporulação, cria um ambiente alcalino que contribui para danos graves ao tecido pulmonar. É possível que este ambiente

alcalino interfira na ação de defesa do organismo, permitindo tais danos. Assim, a ação desta enzima é fundamental para a patogênese destes fungos. Além disso, a urease promove a polarização das respostas imunes para uma resposta anti-inflamatória, a qual não confere proteção (COLE, 1997; MIRBOD-DONOVA *et al.*, 2006; FU *et al.*, 2018).

Em 2015, foi descrito que as cepas que são consideradas mais virulentas de *S. brasiliensis* produzem mais urease do que as consideradas menos virulentas em meio de cultura, porém ainda não foi observado seu papel funcional a nível molecular, expressão gênica, e nem a nível bioquímico (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015).

No ano seguinte, um estudo demonstrou que o sítio catalítico da enzima urease em *S. brasiliensis* é formado por aminoácidos iguais aos presentes em bactérias e plantas, logo é possível presumir que o metabolismo da ureia neste fungo é semelhante ao de outros microrganismos, como os mencionados anteriormente. Além disso, quando feita a comparação entre *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, foi observado que as sequências de aminoácidos de urease são similares, então a diferença que apresentam no metabolismo da ureia pode estar relacionado as proteínas acessórias da enzima (OLIVEIRA, 2016).

O estudo de Oliveira (2016) indica que o isolado IPEC-654-H não produz urease em meio de ureia de Christensen, considerado apropriado para identificação desta enzima, ao apresentar uma curva de crescimento diferente dos isolados considerados produtores, apesar disso, a presença do gene codificador para URE foi detectada neste isolado, isto pode sugerir que este possui uma modificação proteica (OLIVEIRA, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para a verificação da expressão gênica de urease em cepas de *Sporothrix brasiliensis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção fenotípica de urease em cepas de *S. brasiliensis*;
- Avaliar parâmetros fundamentais para o estabelecimento da reação de qPCR através da determinação do gene constitutivo, concentração de *primers* e eficiência da reação;
- Verificar a cinética de expressão de transcritos de urease em função do tempo.

3. METODOLOGIA

3.1. CEPAS DE *S. brasiliensis*

A cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910 (considerada forte produtora de urease em meio de cultivo), foi selecionada para as padronizações dos testes. Além desta, as cepas IPEC-654-H (considerada não produtora de urease em meio de cultivo) e IPEC-16490 (cepa de referência e considerada média produtora de urease em meio de cultivo) foram utilizadas nos ensaios de avaliação da expressão gênica. Tais amostras são provenientes de quadros clínicos em humanos e compõem a coleção de fungos do Laboratório de Micologia do INI - Fiocruz.

Para os experimentos realizados no trabalho, as cepas foram recuperadas do freezer -80°C, onde estavam armazenadas em glicerol seguindo protocolo descrito por Oliveira (2020), para crescimento por 7 dias a 37°C sob agitação de 150 rotações por minuto (RPM) nos em BHI líquido.

3.2. ANÁLISE FENOTÍPICA

A amostra selecionada para padronização da reação de qPCR foi submetida à análise fenotípica para verificar a produção de urease, assim como todas as amostras selecionadas para o estudo de expressão gênica por qPCR. Para tal, as amostras foram semeadas em caldo de ureia de Christensen, meio de cultura que identifica a produção de urease através da hidrólise de ureia, componente presente no meio, que causa o aumento de pH e, conseqüentemente, a mudança de cor do caldo de ureia de vermelho para roxo (KANE; FISHER, 1971; CHRISTENSEN, 1946). Esta mudança é causada pela presença do indicador de pH vermelho de fenol (fenolsulfoftaleína), que identifica o aumento do pH e proporciona a alteração da cor em pH básico.

As células leveduriformes foram cultivadas em meio BHI por 7 dias. Após este período, as células foram suspensas em salina estéril equivalente à escala 2.0 de McFarland (6×10^8 UFC/mL), e em seguida foram adicionadas no caldo de ureia de Christensen. Após esse processo, os tubos contendo leveduras e meio de cultivo foram incubados a 37°C. Ao final de quatro e 7 dias de cultivos, foi verificada, além da mudança de coloração do meio de cultivo, a densidade ótica (DO) a 559 nm e para tanto, 100uL do sobrenadante, após centrifugação, em triplicata, foram transferidos para uma placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Corning, Tewksbury,

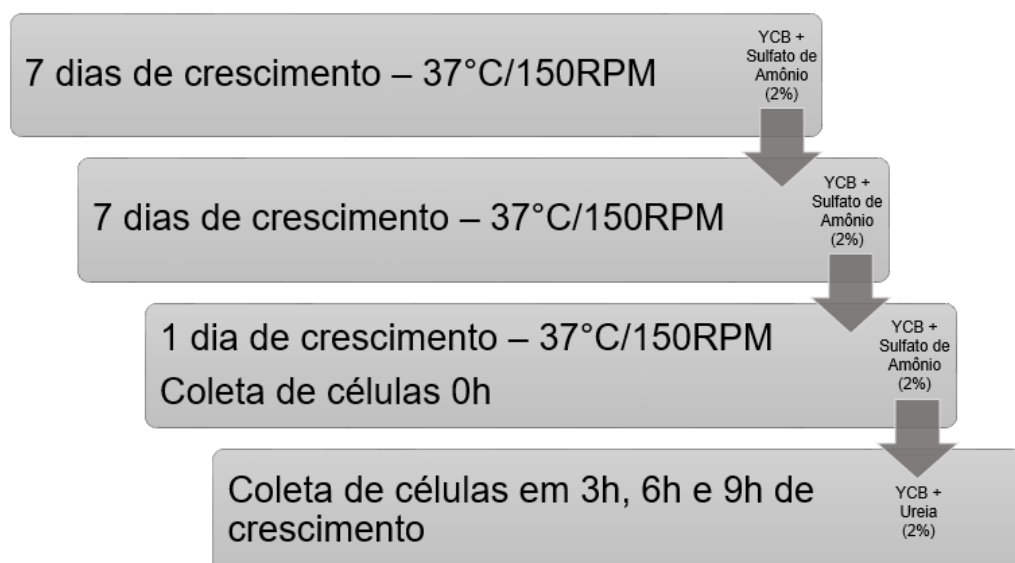
EUA). Isolados de *Candida albicans* ATCC 18804 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045 foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Esta análise foi realizada conforme a descrição de Oliveira (2016).

3.3. CULTIVO DAS CEPAS SELECIONADAS

Inicialmente, as cepas foram recuperadas do freezer -80°C e cultivadas em meio BHI por 7 dias. Em seguida, as células foram inoculadas em meio *Yeast Carbon Base* (YCB) com sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio por 7 dias a 37°C sob agitação de 150 RPM. Após esta etapa, foi feito um novo repique para o YCB também com sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio por outros 7 dias a 37°C em *shaker* com 150 RPM. Por fim, foi realizado mais um repique para YCB também com sulfato de amônio por 1 dia a 37°C em *shaker* com 150 RPM.

Após o último dia, foi coletada uma parte das células para extração de ácido ribonucleico (RNA) como tempo 0. Outra parte das células foi repicada para um novo meio YCB, sendo que desta vez com ureia como única fonte de nitrogênio. Então, as células foram coletadas após 3h, 6h e 9h de crescimento a 37°C em *shaker* com 150 RPM, conforme resumido no fluxograma exposto na Figura 3. Após cada período de incubação, as células foram guardadas em TRIZOL e armazenadas em freezer (-20°C). Este protocolo de crescimento fúngico foi criado neste trabalho.

Figura 3 - Fluxograma do crescimento fúngico com o objetivo de esgotar a produção de ureia da cepa IPEC-34910 de *S. brasiliensis*.



3.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA

A extração e purificação de RNA total foram realizadas utilizando o método do TRIZOL (Invitrogen), reagente que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina-isotiocianato. O TRIZOL mantém a integridade do RNA, ajuda a romper as células e dissolve os componentes celulares. Este método deriva da melhoria do procedimento descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) de extração do RNA.

As células com TRIZOL foram rompidas com auxílio da ação das pérolas de zircônia por agitação em *bead beater* por três ciclos de 30 segundos com agitação máxima e descanso de um minuto no gelo, e em seguida a fase aquosa foi retirada após centrifugação. Para ocorrer à separação de fases foi adicionado, para cada 0,75mL de TRIZOL, 0,2mL de clorofórmio (Invitrogen) seguido de centrifugação.

Na separação de fases, a solução foi separada em fase orgânica e aquosa, permanecendo o RNA exclusivamente na fase aquosa, após a transferência desta última, o RNA foi precipitado adicionando 0,375mL de isopropanol para cada 0,75mL de TRIZOL, que irá retirar sais e fenol remanescentes, seguido de centrifugação. Feito isso, a fase aquosa foi descartada mantendo apenas o precipitado no tubo. O RNA obtido foi purificado com 1mL de etanol 70% para cada 0,75mL de TRIZOL recuperado, para retirada de possíveis matérias orgânicas e restos celulares ainda contidos na solução. Então, após nova centrifugação, o etanol foi descartado e seco por evaporação antes da dissolução do RNA em água.

Todo o processo de extração de RNA foi realizado a frio, portanto as amostras foram mantidas em banho de gelo durante todo o procedimento e a centrifugação foi refrigerada. Além disso, todas as diluições e lavagens foram realizadas com água tratada com o reagente dietil pirocarbonato (DEPC), livre de DNase e RNase. Os RNA obtidos foram tratados com inibidor de RNase (Invitrogen), para inibir degradação de RNA.

A concentração de RNA extraído foi quantificada por espectrofotometria no equipamento Nanovue. O grau de pureza estabelecido, neste estudo, para as amostras de RNA extraído foi 2.2 em 260/280 e 1.8-2.3 em 260/280. Após este processo, o RNA foi tratado com DNase (Invitrogen), para degradar o resto de DNA que possa ter permanecido ao fim da extração, ambos tratamentos seguirão as recomendações dos *kits*.

3.5. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA EM DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Para esta metodologia, 2 µg de RNA total foram submetidos a uma reação da polimerase em cadeia com a enzima transcriptase reversa (RT-PCR) para obtenção de cDNA utilizando o *kit* comercial *High Capacity RNA-to-DNA* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2018). Para a preparação do *mix* foram utilizados 2µL de tampão, 0,8µL de nucleotídeo, 2µL de *primers* hexâmeros randômicos, 1µL da enzima e 4,2 µL de água tratada com DEPC. Após isso, o *mix* foi homogeneizado. Em seguida, 10µL do RNA foram adicionados ao *mix*. Por fim, os 20µL totais foram homogeneizados.

A transcrição reversa do RNA em cDNA foi realizada em quatro etapas, conforme recomendação do *kit*. A primeira etapa foi realizada a temperatura de 25°C por 10 minutos, a segunda por 120 minutos a 37°C, a terceira por 5 minutos a 85°C e por fim, a quarta etapa reduziu a temperatura para 4°C. Assim, houve a conversão do RNA. Este protocolo foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

3.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

Posteriormente à extração e transcrição reversa do RNA, foi realizada a reação de qPCR onde foram utilizados 12,5µL do *kit* Type-it HRM PCR Kit (QIAGEN, 2009), 2µL do cDNA na concentração de 100ng/µL, e 2µL de cada *primer* na concentração determinada em testes de reação de qPCR. A reação foi completa com a quantidade suficiente de água ultrapura para 25µL.

A amplificação foi realizada em dois passos, conforme recomendação do *kit* e do termociclador, que consiste em 45 ciclos de desnaturação a temperatura de 95°C por 5 segundos e anelamento e extensão a temperatura de 60°C por 30 segundos. Ao final destes 45 ciclos, foi realizada a curva de *melting* de temperatura de 60°C a 95 °C, crescendo de grau em grau.

Para avaliar o gene constitutivo que foi utilizado, foram investigados os *primers* que amplificam para proteína ribossomal L34 (L34), proteína ribossomal L6 (L6), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e fator de alongação 1A (EF1A), conforme descrito na Tabela 1, nos tempos de crescimento do estudo (0h, 3h, 6h e 9h).

Os *primers* L6, GAPDH e EF1A foram escolhidos para o estudo após uma pesquisa bibliográfica, na qual foi verificada a utilização destes em um estudo de

Tabela 1 - Tabela representativa do conjunto de *primers* utilizados nas reações de qPCR.

Alvo (Número de Acesso)	Sequências dos <i>primers</i>	Função biológica	Tamanho do Amplicon (pb)
<i>Urease</i> (ERS95967.1)	5'- CAACGACAGCGATCCCAAG -3' 5'- ACGGTGAGACAGGCGTCAAT -3'	Degradação da ureia	114
<i>L6</i> (XP_016584434)	5'- ATTGCGACATCAGAGAAGG -3' 5'- TCGACCTTCTTGATGTTGG-3'	RNA estrutural de ribossomo	224
<i>GAPDH</i> (XP_016586602)	5'- ATCAAGGCCGCTATTAAGG-3' 5'- CTATCGACCTTGGCTACG-3'	Participa da gliconeogênese e glicogênese	236
<i>EF1A</i> (XM_016731693)	5'-AAGACTCACATCAACGTCG-3' 5'-ACTTCCACAGAGCAATATCG'-3'	Fatores de alongação de tamanho celular	226
<i>L34</i> (XM_016732368.1)	5'-CCTGGTATCCCCGCACTG-3' 5'- CGCATCTTGAGCCACCGTA-3'	RNA estrutural de Ribossomo	91

Trujillo-Esquivel e colaboradores (2017). L34 foi, gentilmente, cedido por Dr. Marcus Teixeira.

Após a escolha do *primer* referente ao gene constitutivo, este foi analisado nas concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. Também foram testados os *primers* que amplificam para urease, desenhados para este trabalho, nessas mesmas concentrações.

A eficiência das reações, quando considerada ser 100%, indica que a cada ciclo de amplificação a intensidade de fluorescência está dobrando e, conseqüentemente, apresenta o dobro da quantidade de produto amplificado. Para estabelecer esta eficiência, foram utilizadas diferentes concentrações de cDNA (100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 ng/ μ L) com a concentração do *primer* determinada anteriormente.

Após essas etapas, foi feita a análise das amostras de cDNA em diferentes tempos, utilizando o *primer* mais indicado para avaliar a expressão de urease na cepa nas condições estabelecidas, com o intuito de estabelecer a cinética de expressão de urease. Todas as reações descritas foram realizadas em duplicata.

3.7. MÉTODO $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para quantificar as alterações na expressão gênica através das reações de qPCR, é necessário o uso de uma equação para analisar os dados obtidos, como o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Este método é realizado da seguinte forma:

- I. Devem ser obtidos os Cts das amostras amplificadas com EF1A e das amostras com URE referentes aos tempos do estudo, 0h, 3h, 6h e 9h.
- II. Para calcular ΔCt , o valor de Ct do gene constitutivo (EF1A) deve ser subtraído do valor de Ct do gene de interesse (*ure*). Esta etapa deve ser realizada para cada tempo de análise;
- III. Para calcular $\Delta\Delta Ct$, o resultado obtido no tempo 0h deve ser subtraído em todos os tempos de análise, incluindo 0h, pois como foi o primeiro tempo coletado, este foi utilizado como referência;
- IV. Por fim, o cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ deve ser realizado com os valores encontrados no tópico III. O resultado deste cálculo permite analisar a expressão gênica em cada tempo do estudo e sua variação ao longo do tempo.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE FENOTÍPICA

As cepas IPEC-34910 e IPEC-16490 foram consideradas produtoras de urease por apresentarem mudança de cor, vermelho para rosa/roxo, em caldo de ureia de Christensen ao final dos primeiros quatro dias de cultivo, enquanto a cepa IPEC-654-H foi considerada como não produtora de urease por não apresentar a mudança de cor esperada, como representado na Figura 4.

Para estabelecer tais afirmações foi realizada a comparação das amostras citadas acima, com os controles positivo (*C. neoformans* ATCC 32045) e negativo (*C. albicans* ATCC 18804), representados na Figura 5. Além disso, para estabelecer estes resultados foi realizada a comparação da variação na DO a 559nm após 4 dias e 7 dias de cultivo das cepas analisadas e seus controles (Figura 6).

Figura 4 - Produção de urease pelas cepas de *S. brasiliensis* em caldo de ureia de Christensen.



A

B

C

Legenda: A: IPEC-34910; B: IPEC-16490; C: IPEC-654-H.

Figura 5 - Produção de urease das cepas ATCC 18804 de *C. albicans* e ATCC 32045 de *C. neoformans* em caldo de ureia de Christensen.

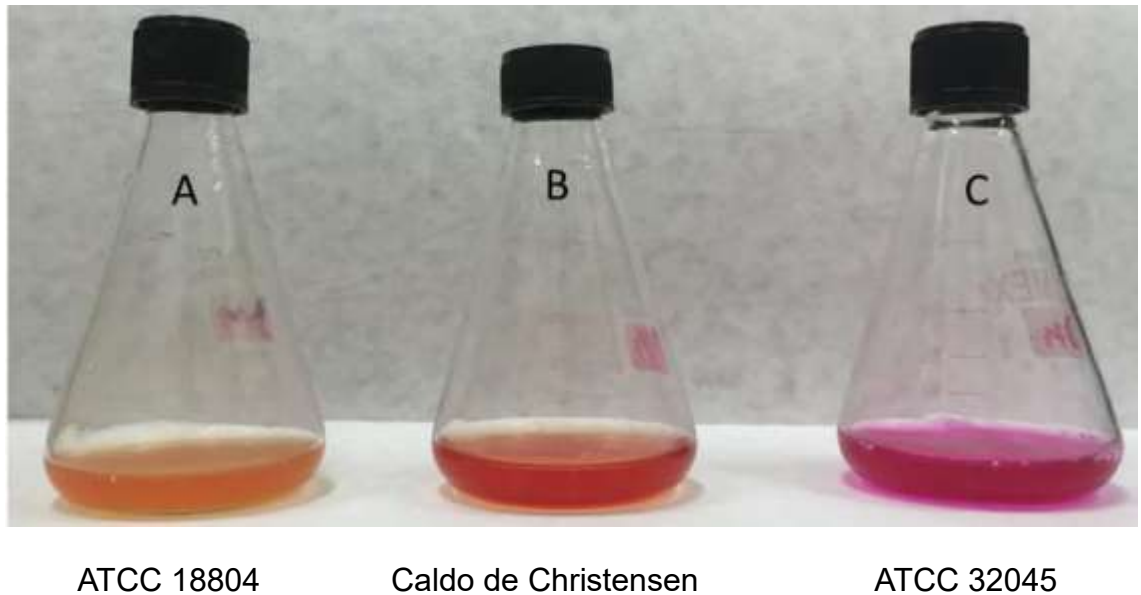
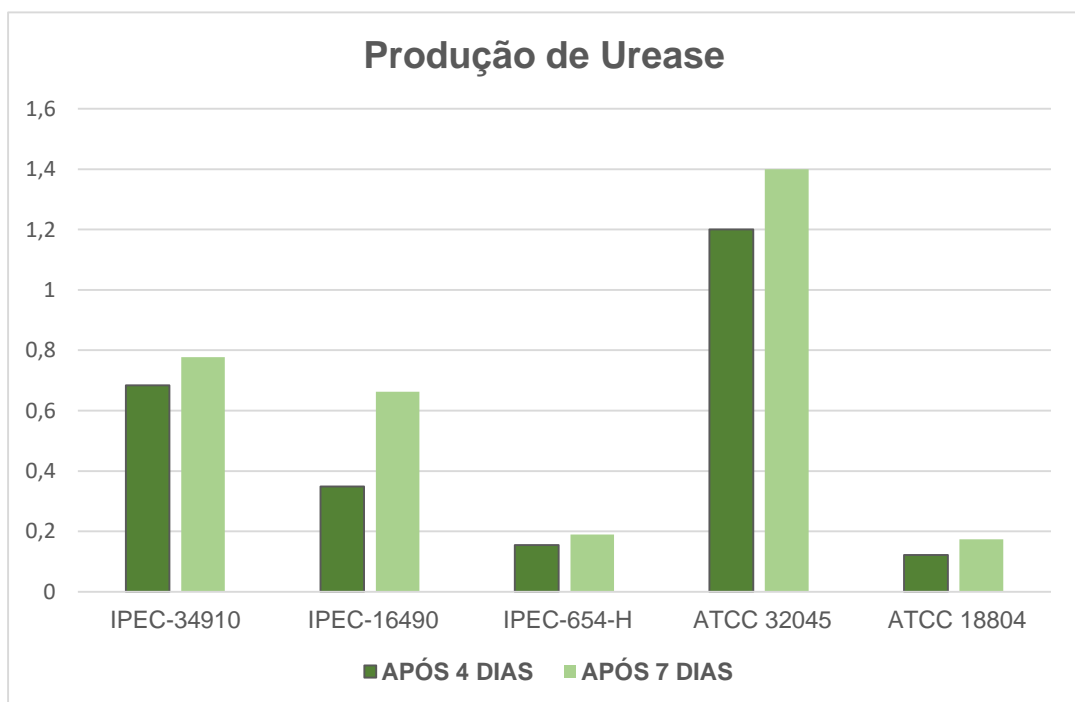


Figura 6 - Densidade óptica da análise fenotípica das cepas de *S. brasiliensis* IPEC-34910, IPEC-16490, IPEC-654-H, *C. neoformans* ATCC 32045 e *C. albicans* ATCC 18804 após 4 e 7 dias de cultivo.



4.2. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE qPCR

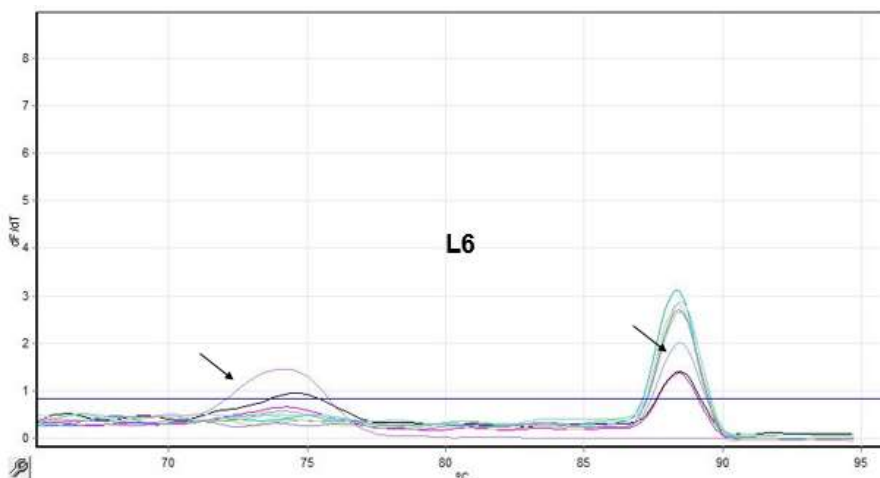
4.2.1. Definição do *primer* constitutivo

Após a realização das reações de qPCR com os *primers* L34, L6, GAPDH e EF1A, foram obtidos dados referentes ao *cycle threshold* (Ct), ciclo em que as reações são consideradas positivas, onde todos os *primers* apresentaram variação entre os Cts (Tabela 2). Além destes, as curvas de *melting*, que indicam a temperatura em que metade das fitas de cDNA estão dissociadas, também foram analisadas (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Tabela 2 - Dados de Ct das reações de qPCR dos *primers* L34, L6, GAPDH e EF1A com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910.

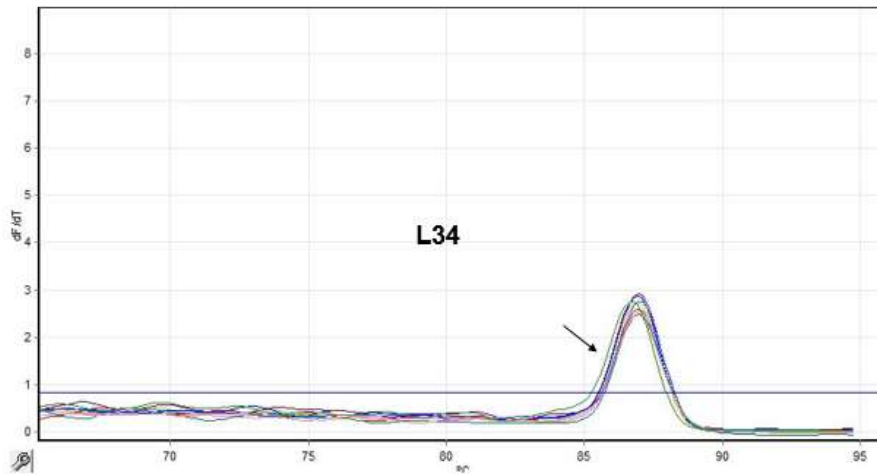
PRIMER	Ct 0h	Ct 3h	Ct 6h	Ct 9h
L6	26,19	20,26	22,55	24,57
L34	24,16	20,1	21,35	22,37
GAPH	24,12	20,39	22,38	19,82
EF1A	25,27	30,47	30,46	19,86

Figura 7 - Curva de *melting* do *primer* L6 com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910.



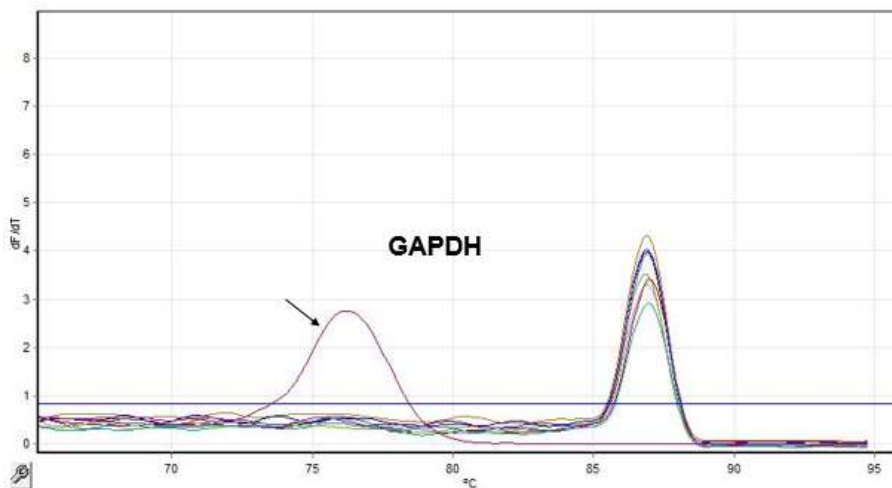
A curva de *melting* do *primer* L6 com cDNA da cepa IPEC-34910 apresentou amplificação inespecífica nas linhas representativas dos tempos 0h e 9h, e também na amostra sem cDNA como indicado pelas setas. Os tempos 3h e 6h representados pelas outras linhas não apresentaram amplificação inespecífica.

Figura 8 - Curva de *melting* do *primer* L34 com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910.



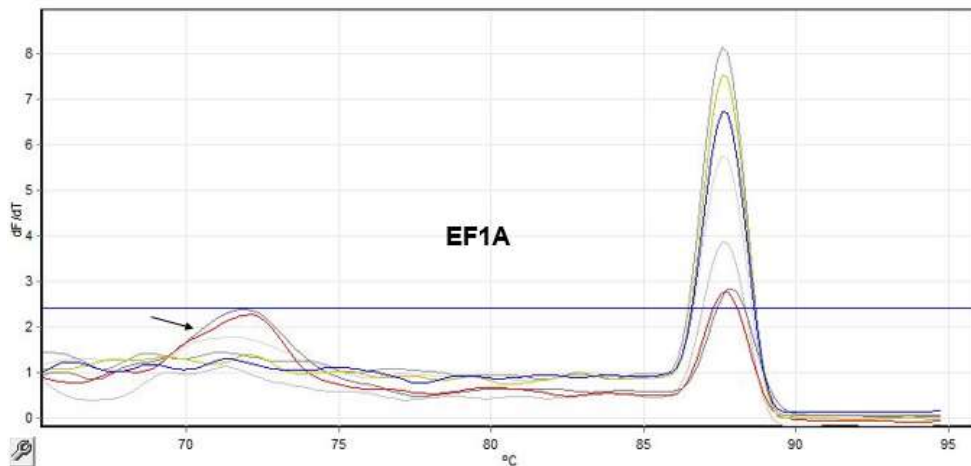
A curva de *melting* do *primer* L34 com cDNA da cepa IPEC-34910 apresentou amplificação inespecífica na linha representativa da amostra sem cDNA como indicado pela seta. Os tempos 0h, 3h, 6h e 9h representados pelas outras linhas não apresentaram amplificação inespecífica.

Figura 9 - Curva de *melting* do *primer* GAPDH com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910.



A curva de *melting* do *primer* GAPH com cDNA da cepa IPEC-34910 também apresentou amplificação inespecífica na linha representativa da amostra sem cDNA como indicado pela seta. Os tempos 0h, 3h, 6h e 9h representados pelas outras linhas não apresentaram amplificação inespecífica.

Figura 10 - Curva de *melting* do *primer* EF1A com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910.



A curva de *melting* do *primer* EF1A com cDNA da cepa IPEC-34910 apresentou dímeros, que podem ser derivados da concentração de 20 μ M utilizada no teste, nas linhas representativas dos tempos 0h, 3h, 6h e 9h como indicado pela seta. A amostra sem cDNA representada por outra linha não apresentou amplificação inespecífica.

Com base na análise das curvas de *melting*, é possível observar que houve ampliações inespecíficas durante as reações, como sinalizado por setas nas figuras, com o uso dos *primers* L6, L34 e GAPH. A alteração indicada por seta na curva de EF1A aponta a presença de dímeros que podem ser derivados da concentração do *primer* utilizada na reação (20 μ M). Sendo assim, por não apresentar amplificação inespecífica na curva de *melting*, o *primer* EF1A foi selecionado para o restante do estudo.

4.2.2. Definição da concentração do *primer* constitutivo

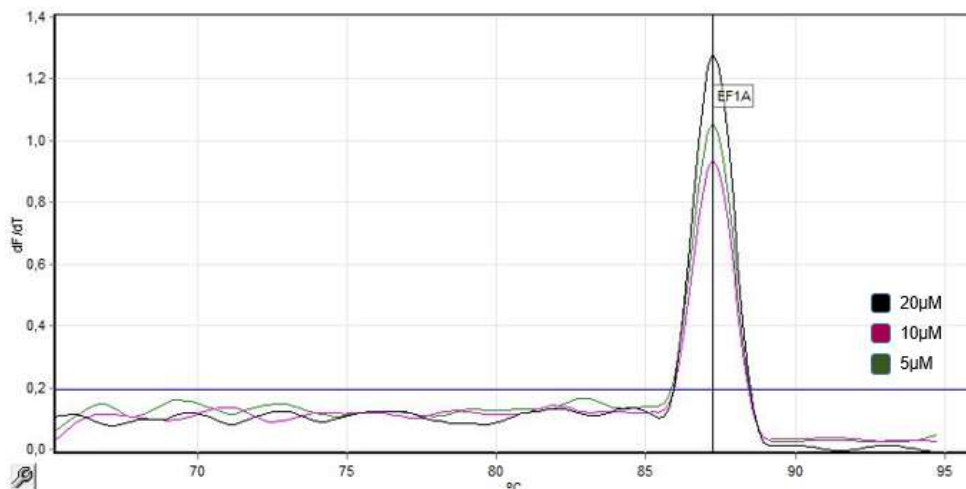
Após a seleção do *primer* EF1A, foram realizadas reações de qPCR para definir a melhor concentração do *primer* para testes futuros, nestas foram testadas as concentrações 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. Por apresentar Ct mais tardio, a concentração de 5 μ M foi descartada. As concentrações 10 μ M e 20 μ M apresentaram Cts semelhantes, apesar disso, 10 μ M foi escolhida para continuação do estudo por ser menor, logo diminui as chances da formação de dímeros na reação e permite a realização de mais reações devido à diluição (100 μ M é a concentração inicial do material). Na Tabela 3,

há a representação dos dados utilizados para tal escolha. A curva de *melting* (Figura 11) permitiu definir a temperatura de *melting* de 87,25°C nas três concentrações.

Tabela 3 - Representação dos Cts para definição da concentração do *primer* EF1A para estudos futuros.

Concentração	Ct
5 μM	21,16
10 μM	17,69
20 μM	16,20

Figura 11 - Curva de *melting* do *primer* EF1A nas concentrações 5 μM , 10 μM e 20 μM .

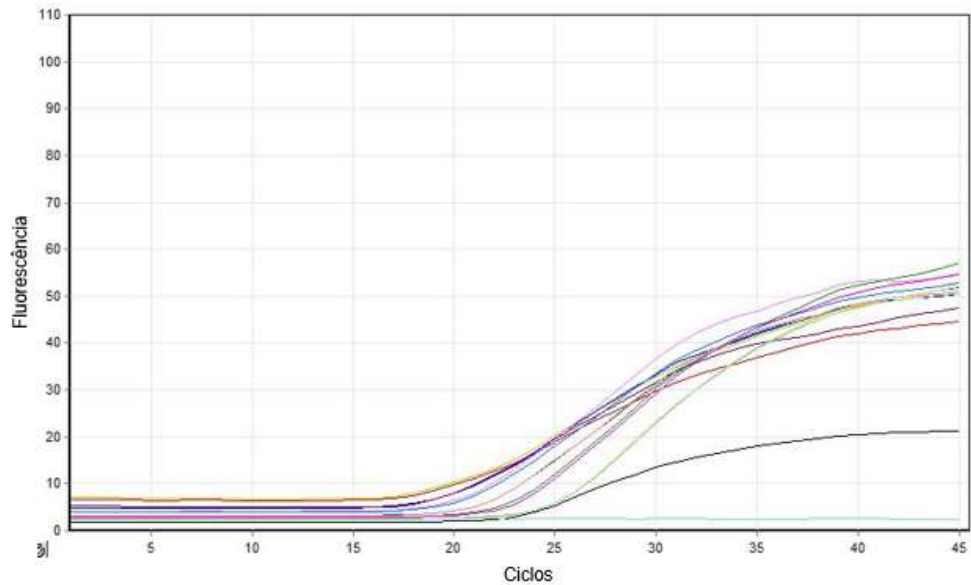


A curva de *melting* do *primer* EF1A representa as concentrações testadas no estudo, sendo elas 20 μM na cor preta, 10 μM na cor violeta e 5 μM na cor verde. A primeira concentração apresentou Ct mais tardio quando comparada as outras duas concentrações.

4.2.3. Eficiência da reação

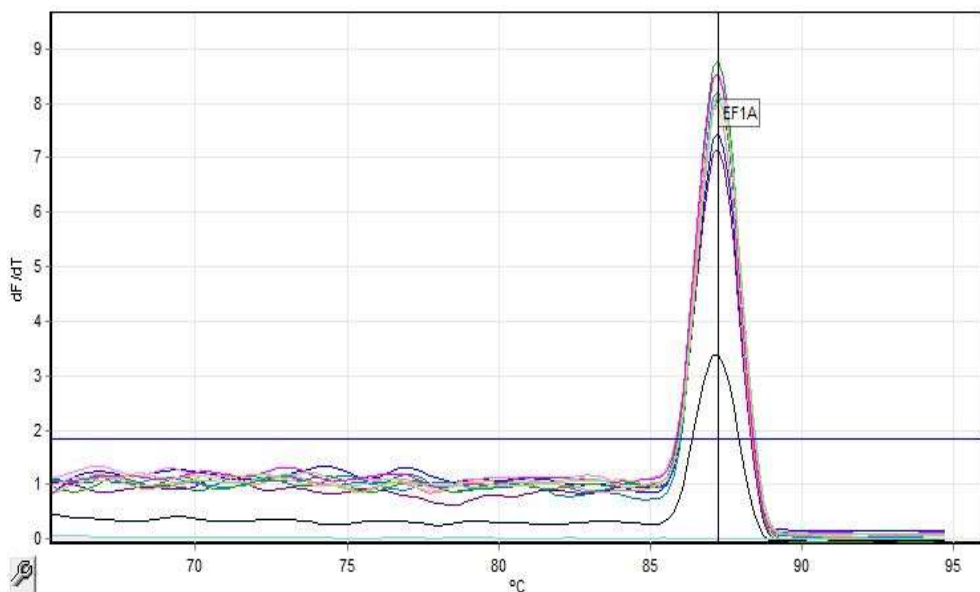
Com os *primers* EF1A e URE na concentração de 10 μM foram realizadas reações de qPCR para estabelecer a eficiência de amplificação destes com o intuito de verificar se a amplificação é exponencial. Nas figuras abaixo é possível observar os ciclos de amplificação e curva de *melting* de EF1A (Figuras 12 e 13) e de URE (Figuras 14 e 15) após reações com cDNA da cepa IPEC-34910 em tempo 0h.

Figura 12 - Curva de amplificação de EF1A a 10 μ M com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910 nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/ μ L.



Curva de amplificação do *primer* EF1A. As linhas representam as concentrações utilizadas no estudo, sendo elas 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/ μ L. O teste foi feito em duplicata, logo para cada concentração há duas linhas representativas.

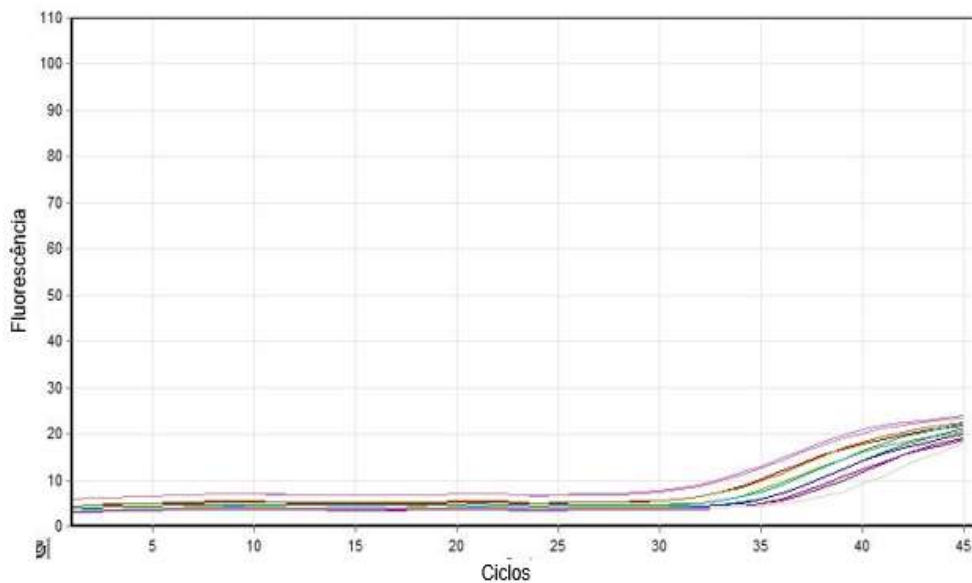
Figura 13 - Curva de *melting* de EF1A a 10 μ M com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910 nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/ μ L. Temperatura:



87,25°C.

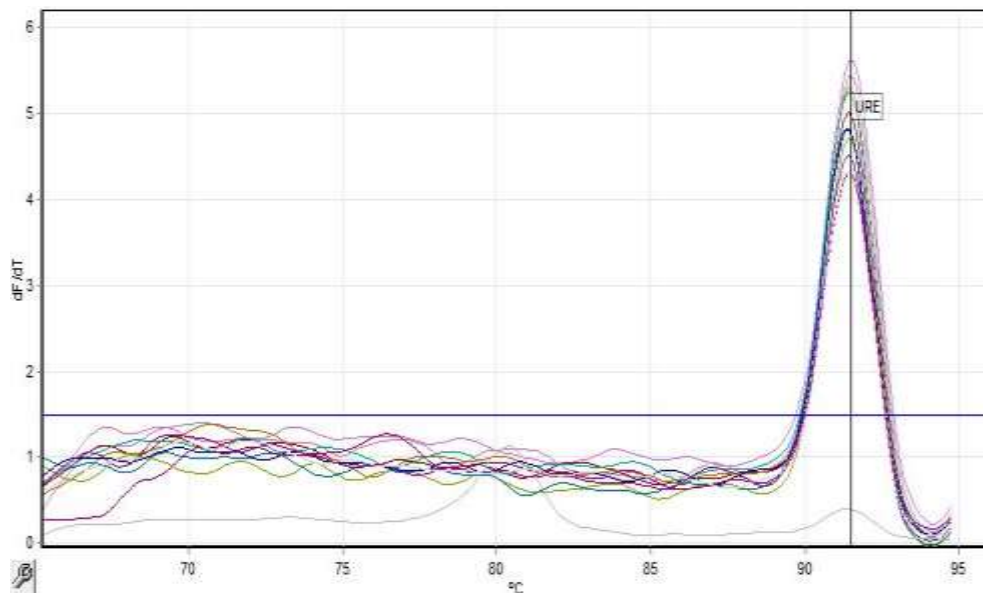
Curva de *melting* do *primer* EF1A. As linhas representam as concentrações utilizadas no estudo, sendo elas 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/ μ L. O teste foi feito em duplicata, logo para cada concentração há duas linhas representativas. Nesta curva foi possível determinar que as amostras apresentaram temperatura de *melting* de 87,25°C.

Figura 14 - Curva de amplificação de URE a $10\mu\text{M}$ com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910 nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/ μL .



Curva de amplificação do *primer* URE. As linhas representam as concentrações utilizadas no estudo, sendo elas 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/ μL . O teste foi feito em duplicata, logo para cada concentração há duas linhas representativas.

Figura 15 - Curva de *melting* de URE a $10\mu\text{M}$ com cDNA da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910 nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/ μL . Temperatura: $91,55^{\circ}\text{C}$.



Curva de *melting* do *primer* URE. As linhas representam as concentrações utilizadas no estudo, sendo elas 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125ng/ μL . O teste foi feito em duplicata, logo para cada concentração há duas linhas representativas. Nesta curva foi possível determinar que as amostras apresentaram temperatura de *melting* de $91,55^{\circ}\text{C}$.

A partir destas reações, o software do equipamento Rotor Gene gerou uma reta que demonstrou a eficiência de amplificação de 115% do *primer* EF1A (Figura 16) e 106% do *primer* URE (Figura 17). Os percentuais encontrados foram considerados satisfatórios para realização das reações de qPCR para análise da cinética de expressão de urease, uma vez que indicam que a cada ciclo de amplificação a quantidade de produto amplificado é, aproximadamente, dobrada.

Figura 16 - Representação da reta obtida para obtenção de 115% de eficiência de EF1A.

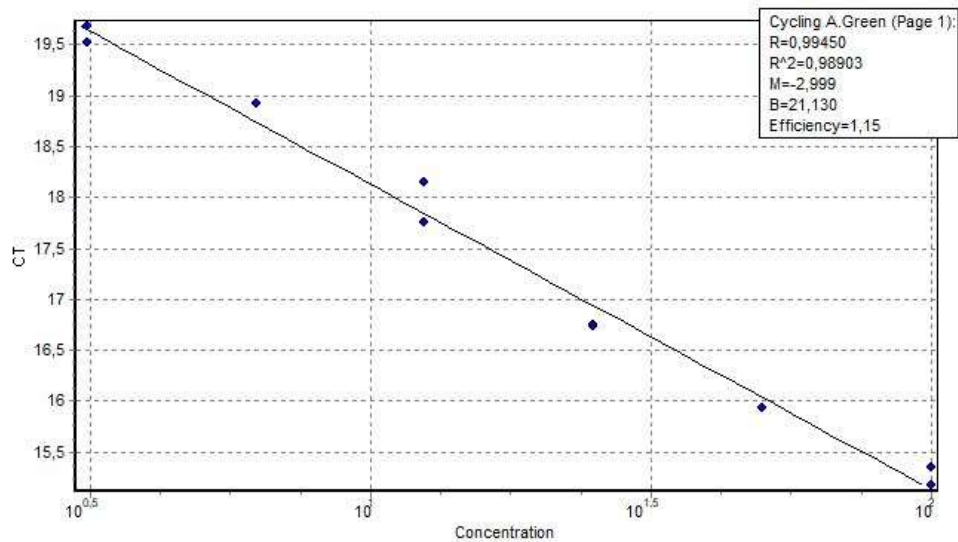
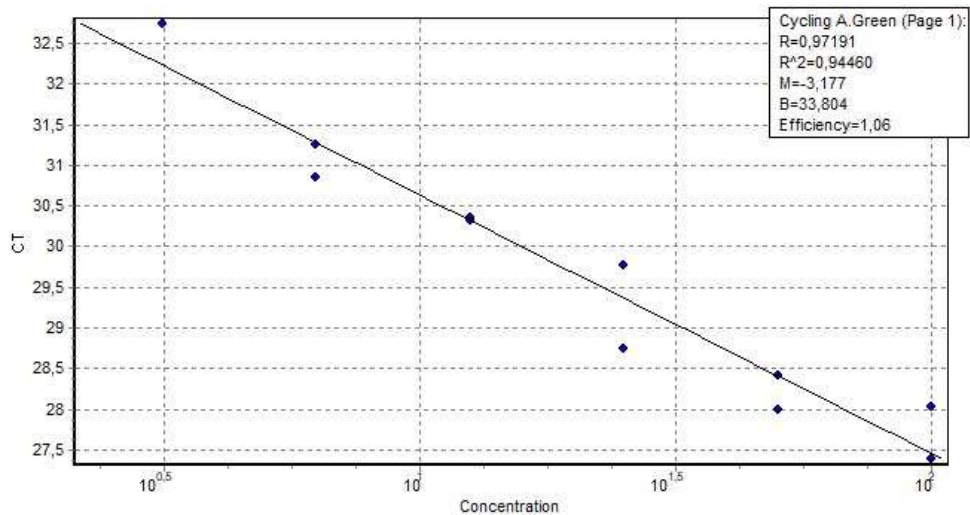


Figura 17 - Representação da reta obtida para obtenção de 106% de eficiência de URE.



4.3. CINÉTICA DE EXPRESSÃO GÊNICA

Realizada a padronização da reação de qPCR, as reações com amostras de cDNA dos tempos 0h, 3h, 6h e 9h de crescimento em YCB + Ureia das cepas IPEC-34910, IPEC-16490 e IPEC-654-H foram realizadas. Os dados obtidos nas reações de cada cepa foram resumidos nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Dados das reações de qPCR referentes aos tempos 0h, 3h, 6h e 9h de crescimento da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910.

Cepa 34910				
TEMPO	TEMPERATURA DE MELTING URE	Ct URE	TEMPERATURA DE MELTING EF1A	Ct EF1A
0h	91,55	27,89	87,75	18,58
3h	91,55	26,2	87,75	18,03
6h	91,55	26,91	87,75	18,40
9h	91,55	28,75	87,75	21,77

Tabela 5 - Dados das reações de qPCR referentes aos tempos 0h, 3h, 6h e 9h de crescimento da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-16490.

Cepa 16490				
TEMPO	TEMPERATURA DE MELTING URE	Ct URE	TEMPERATURA DE MELTING EF1A	Ct EF1A
0h	90,85	41,01	87,12	33,53
3h	90,75	36,58	87,00	28,77
6h	90,75	38,21	87,00	30,26
9h	90,75	38,84	87,10	35,65

Tabela 6 - Dados das reações de qPCR referentes aos tempos 0h, 3h, 6h e 9h de crescimento da cepa de *S. brasiliensis* IPEC-654-H.

Cepa 654-H				
TEMPO	TEMPERATURA DE MELTING URE	Ct URE	TEMPERATURA DE MELTING EF1A	Ct EF1A
0h	91,12	28,7	87,45	24,69
3h	91,15	30,01	87,45	25,27
6h	91,10	25,61	87,35	20,01
9h	91,25	32,41	87,60	31,36

Após a obtenção destes dados, foi calculada a expressão gênica de urease em função do gene constitutivo através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e, em seguida, foi elaborado o gráfico do resultado do cálculo referente às cepas IPEC-34910, IPEC-16490 e IPEC-654-H. A cepa IPEC-34910 demonstrou cinética crescente de produção de urease através do tempo, apesar de uma diminuição após 6h de crescimento, a produção volta a aumentar após 9h (Figura 18). As cepas IPEC-16490 e IPEC-654-H demonstraram cinética decrescente de produção de urease até 6h de crescimento, entretanto, após 9h de crescimento foi observado grande aumento da produção de urease em ambas, como representado nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

Figura 18 - $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de urease em função de EF1A, demonstrando a cinética de expressão gênica nos tempos de produção de cDNA (0h, 3h, 6h e 9h) referente à cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910.

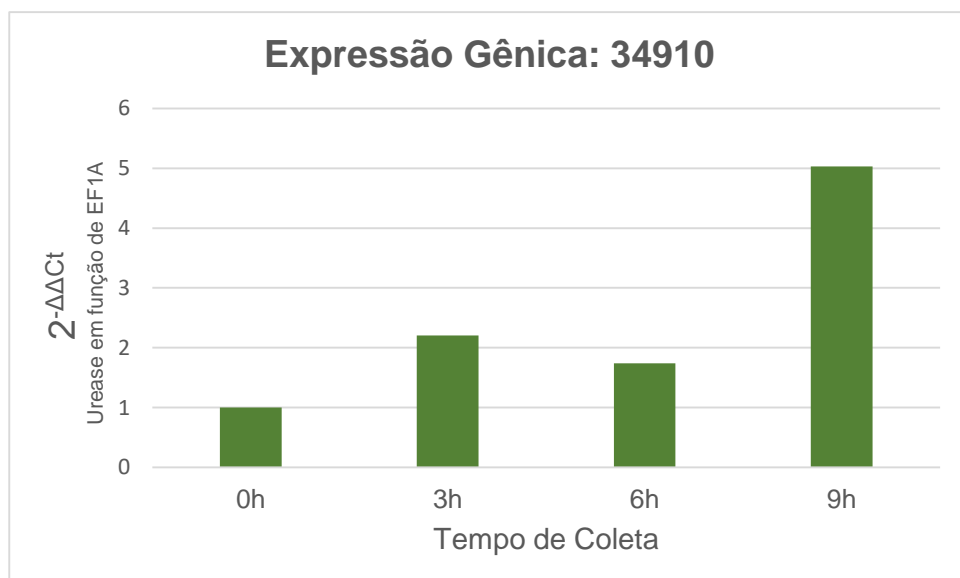


Figura 19 - $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de urease em função de EF1A, demonstrando a cinética de expressão gênica nos tempos de produção de cDNA (0h, 3h, 6h e 9h) referente à cepa de *S. brasiliensis* IPEC-16490.

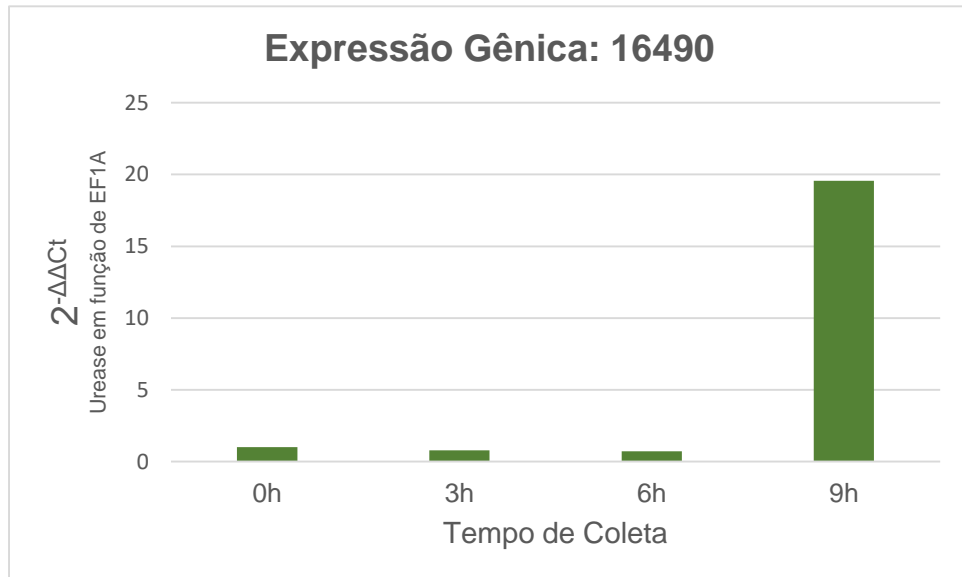
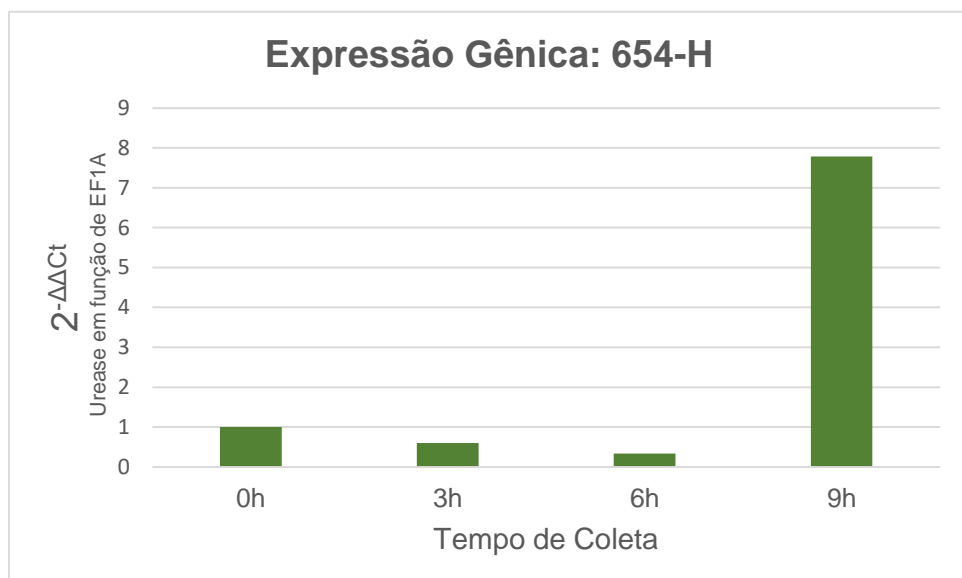


Figura 20 - $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de urease em função de EF1A, demonstrando a cinética de expressão gênica nos tempos de produção de cDNA (0h, 3h, 6h e 9h) referente a cepa de *S. brasiliensis* IPEC-654-H.



5. DISCUSSÃO

O gênero *Sporothrix* é composto por fungos dimórficos que podem causar infecção de pele, conhecida por esporotricose. O primeiro caso desta infecção em humanos foi descrito por Schenck no fim do século XIX (SCHENCK, B., 1898 apud OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). A esporotricose é uma infecção comumente transmitida entre gatos e humanos por arranhões e/ou mordidas, por exemplo. Rodrigues e colaboradores (2016) observaram que houve alterações nas divisões das espécies patogênicas e, por isso, dados epidemiológicos, virulência e susceptibilidade adquiriram novas compreensões.

A esporotricose apresenta casos em diferentes regiões do mundo, entretanto, Brasil, China e África do Sul são países considerados como áreas hiperendêmicas. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil há epidemias de esporotricose felina causadas por *S. brasiliensis* que resultaram na emergência em saúde pública (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2016). A hiperendemia de esporotricose causada predominantemente por *S. brasiliensis* é a maior já observada, principalmente no estado do Rio de Janeiro, onde foram diagnosticados milhares de casos de esporotricose humana e felina no INI-Fiocruz (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014; CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

Além disso, a virulência da cepa infectante é um dos fatores que colabora para o desenvolvimento do amplo espectro clínico desta infecção, principalmente de casos mais graves (CARLOS *et al.*, 2009). A virulência de *S. brasiliensis* é associada à transmissão zoonótica e infecções de animais, enquanto que as plantas não são consideradas como fontes de infecção por esta espécie. É importante ressaltar que quando comparada a outras espécies do gênero *Sporothrix*, *S. brasiliensis* é a mais virulenta (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2016).

Sabe-se que a ureia pode ser utilizada como fonte de nitrogênio para uso do fungo e sua liberação se dá pela sua hidrólise. A ação da enzima urease é descrita como fator de virulência em diversas infecções microbianas, como as causadas por *H. pylori* e *C. immitis* (KARPLUS; PEARSON; HAUSINGER, 1997; FOLLMER, 2008; SALAMA; HARTUNG; MULLER, 2013; CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016). Como mencionado anteriormente, as cepas mais virulentas de *S. brasiliensis*, ou seja, as que causam formas mais graves da infecção, também são consideradas as que mais produzem a enzima urease em meio de cultura. Apesar disso, a expressão gênica

desta enzima ainda não foi observada. Dessa forma, é relevante que ensaios sejam realizados para avaliar a presença do gene da urease, por meio das reações de qPCR, a fim de verificar a expressão deste em diferentes estágios da infecção ou do crescimento fúngico (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015; FERNANDES, 2009).

Durante a realização deste trabalho, a expressão fenotípica de urease em meio de cultivo foi analisada para verificar se as cepas selecionadas eram ou não produtoras da enzima. Após a confirmação da expressão fenotípica, a padronização da reação de qPCR foi realizada de acordo com a espécie e condições do estudo. O método de qPCR é considerado muito sensível e específico para o diagnóstico. Além disso, é rápido e apresenta boa repetitividade, sendo importante para a identificação. Sendo assim, este é utilizado para o diagnóstico molecular de diferentes infecções, como as causadas por *Coronavirus*, *Mycobacterium leprae*, *Chlamydia pneumoniae* e HIV (LIN; YE; XIA, 2015; YAMAZAKI *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2017; OPOTA *et al.*, 2017). A realização de reações de qPCR permite que os níveis de expressão de diferentes genes sejam analisados e comparados, após determinação pelo método $\Delta\Delta CT$ (HU; HE; ZHOU, 2015; SAIDI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

A análise fenotípica realizada em caldo ureia de Christensen demonstrou que as cepas de *S. brasiliensis* IPEC-34910 e IPEC-16490 eram produtoras da enzima urease, enquanto que a cepa IPEC-654-H foi considerada não produtora. Este método é semelhante ao realizado por Almeida-Paes e colaboradores (2015), que indicou que *S. brasiliensis* produzia mais esta enzima que *S. schenckii*, atestando que o método é válido e adequado para tal afirmação em meio de cultivo.

Apesar deste resultado fenotípico, ou seja, nem todas as cepas analisadas serem consideradas produtoras da enzima em meio de cultivo, foi observada a expressão gênica da urease em todas as cepas avaliadas neste estudo, incluindo a considerada não produtora no meio de cultivo.

Oliveira (2016), após reação de PCR convencional com cDNA de diferentes isolados de *S. brasiliensis* com sequência parcial do gene codificador de urease, observou que houve a expressão de urease no teste fenotípico em todas as cepas analisadas em seu estudo. Sendo assim, o isolado IPEC-654-H (considerado não produtor de urease em meio de cultivo) também expressou tal sequência.

Em 2020, Oliveira realizou análise por ressonância plasmônica de superfície em uma cepa de *S. brasiliensis* considerada não produtora de urease em meio de cultivo (IPEC-45308) e verificou a presença desta enzima no extrato bruto. Logo, a

cepa considerada como não produtora apresentou a enzima nesta análise. Além disso, foi verificado que os valores de unidades de ressonância foram maiores na cepa considerada produtora em meio de cultivo (IPEC-34910) que na cepa considerada não produtora (IPEC-45308). Dessa forma, é possível detectar a expressão desta enzima por meio de métodos moleculares.

Previamente à cinética de expressão gênica, a padronização da reação de qPCR foi iniciada com uma pesquisa bibliográfica sobre quais *primers* poderiam ser analisados junto ao *primer* L34, que já era utilizado no projeto anteriormente. Então, foram selecionados os *primers* L6, GAPDH e EF1A. Os resultados indicaram que todos os *primers* testados apresentavam variação nos Cts. Entretanto, L6, L34 e GAPDH também apresentaram ampliações inespecíficas na curva de *melting*, enquanto EF1A apresentou apenas dímeros que poderiam ser justificados pela concentração do *primer*.

Segundo Trujillo-Esquivel *et al.* (2017), os genes L6, GAPDH e EF1A apresentaram expressão semelhante nas condições analisadas, mas apenas L6 demonstrou ter uma expressão estável e constitutiva nos meios de cultura avaliados, enquanto GAPDH e EF1A não apresentaram diferenças significativas nos níveis de expressão e também, demonstraram aumento nos valores de Ct.

Cabe destacar que as condições do trabalho desenvolvido por Trujillo-Esquivel *et al.* (2017) foram diferentes das utilizadas neste estudo. Por exemplo, o cultivo das células nas formas leveduriforme e filamentosa foi realizado em meio de cultivo YPD por 3 a 4 dias seguido de repique para outros meios utilizados nos testes por 48 h, enquanto que neste estudo as células na forma leveduriforme foram cultivadas em meio YCB + sulfato de amônio por 15 dias, incluindo as trocas por novo meio de cultivo, seguidos de até 9h de cultivo em meio YCB + ureia. Além disso, as condições das reações de qPCR foram distintas das empregadas neste estudo, visto que tais pesquisadores utilizaram *kit* de reação diferente (SYBR Green PCR Master Mix – Life Technologies). Logo, a amplificação foi realizada com ciclos e tempos distintos.

Nesse sentido, foi possível observar que os resultados observados no presente estudo foram diferentes dos encontrados por Trujillo-Esquivel *et al.* (2017), uma vez que L6 apresentou ampliações inespecíficas, não sendo considerado como o melhor gene constitutivo avaliado. Isto pode indicar também que as condições utilizadas neste trabalho favoreceram EF1A, pois o mesmo não demonstrou

amplificações inespecíficas e pôde ser utilizado para a etapa seguinte da padronização.

A fim de determinar a melhor concentração de EF1A para a realização do estudo, o *primer* foi avaliado nas concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. A diminuição no valor do Ct e a ausência da formação de dímeros foram consideradas como fatores importantes para a decisão. Logo, a concentração de 5 μ M foi a primeira a ser descartada, por apresentar um valor de Ct maior, apesar de apresentar a mesma temperatura de *melting* das outras concentrações analisadas. As concentrações de 10 μ M e 20 μ M demonstraram resultados semelhantes. Com isso, 10 μ M foi escolhida para a continuação deste estudo, pois é esperado que uma concentração menor de *primer* proporcione menor chance de formação de dímeros, além de permitir maior aproveitamento do material.

A última etapa da padronização foi constituída por testes que avaliaram a eficiência da reação com os *primers* EF1A, representante do gene constitutivo, e URE, representante do gene avaliado no estudo. Sabe-se que para considerar a eficiência como adequada, esta deve apresentar valores em um intervalo de 90 a 110%. Além disso, o coeficiente de correlação (R^2) deve ser maior ou igual a 0,98 (KENNEDY; OSWALD, 2011; TAYLOR *et al.*, 2010 *apud* BARS-CORTINA, 2019).

No presente estudo, a eficiência encontrada para EF1A foi de 115%, apesar de o valor estar um pouco além do limite estabelecido pelo intervalo, seu valor de R^2 foi de 0,98903, enquanto que a eficiência encontrada para URE foi de 106%, ou seja, dentro do intervalo estabelecido. Contudo, o valor de R^2 encontrado para URE foi de 0,94460.

Trujillo-Esquivel *et al.* (2017) também analisaram o *primer* EF1A e encontraram eficiência de 94,3% com R^2 de 0,9863, indicando que este *primer* pode ser considerado adequado para a reação. Liu *et al.* (2016) avaliaram o *primer* EF1A e observaram eficiência de 106,8% com R^2 de 0,999, indicando que o *primer* pode ser considerado adequado para a reação, uma vez que está dentro do intervalo de eficiência e com R^2 satisfatório.

Apesar destas divergências, as eficiências foram consideradas satisfatórias para a continuação do estudo, por apresentarem valores dentro do aceitável e por haver pouco material bibliográfico sobre aspectos relacionados à reação de qPCR com isolados de *S. brasiliensis*.

Outros estudos também abordaram a eficiência de reação de qPCR, como o realizado por Nunes *et al.* (2019), onde foi avaliada a eficiência da reação *singleplex* e *multiplex* de hantavírus visando ao diagnóstico da síndrome pulmonar. Neste estudo, a eficiência da reação *singleplex* foi de 97,6%, logo está dentro do limite preconizado, assim como o observado como o *primer* de URE no presente estudo. Em 2017, Walker *et al.* pesquisaram a eficiência da reação qPCR para a detecção de *Escherichia coli* em águas ambientais, visando à redução do tempo de diagnóstico. Os autores encontraram o valor de 94%, sendo este também considerado adequado e satisfatório.

A expressão gênica de URE foi avaliada através do tempo formando uma cinética de expressão. Nesse sentido, os tempos de 0h, 3h, 6h e 9h foram escolhidos para o estudo, uma vez que representam o início do cultivo no meio de cultura YCB + Ureia e o tempo necessário para que a expressão do gene tendesse ao aumento até alcançar a fase estacionária.

Landolfo *et al.* (2018) avaliaram a cinética de crescimento e produção de carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* após o cultivo em meio YEPGLY. Os autores observaram que a fase estacionária de crescimento foi alcançada após 40h de crescimento. Contudo, o pico da taxa de produção foi alcançado em 48h, ou seja, já na fase estacionária. Os pesquisadores decidiram, então, avaliar os genes que participam da biossíntese de carotenóides e da resposta a antioxidantes em diferentes períodos de tempo (fase exponencial, início da fase estacionária e início da fase estacionária tardia). Dessa forma, estes autores também demonstraram a cinética de expressão através do tempo e a decisão pelas etapas que podem ser consideradas como de maior interesse.

Nossos resultados indicaram que as cepas de *S. brasiliensis* IPEC-16490 e IPEC-654-H, expressaram URE no tempo 0h, ou seja, antes de qualquer contato com o meio de cultura YCB + Ureia. Entretanto, esta expressão diminuiu nos tempos de 3h e 6h, o que pode ser justificado pela adaptação do fungo ao novo meio de cultura em poucas horas de crescimento. Já no tempo de 9h, a expressão de URE aumentou consideravelmente quando comparada aos tempos anteriores.

A cepa de *S. brasiliensis* IPEC-34910, considerada forte produtora de urease, também expressou URE no tempo 0h. Entretanto, esta expressão foi considerada ainda maior no tempo de 3h. Apesar disso, a expressão apresentou diminuição no tempo de 6h, assim como nas outras cepas do estudo, sendo também justificada pela

adaptação ao meio de cultura. Por fim, no tempo de 9h, esta cepa também aumentou sua expressão de urease.

Tais resultados podem indicar que em apenas 9h de cultivo no meio de cultura YCB + Ureia, as três cepas de *S. brasiliensis* apresentaram aumento na expressão de urease. É importante ressaltar que, no tempo 0h de cultivo, as três apresentaram a expressão do gene de interesse. Desse modo, é possível sugerir que mesmo na ausência de ureia no meio de cultivo, o fungo expressa o gene codificador de urease durante seu crescimento. Portanto, uma cepa considerada não produtora de urease em meio de cultivo (IPEC-654-H) pode expressar o gene *ure* quando realizada a análise biomolecular, enquanto as cepas consideradas produtoras de urease em meio de cultivo (IPEC-34910 e IPEC-16490) demonstraram a mesma característica após a análise biomolecular, corroborando sua característica de produção da enzima.

6. CONCLUSÃO

Foi possível observar que cepas de *S. brasiliensis* podem ser consideradas não produtoras de urease em meio de cultivo, porém, a expressão do gene *ure* pode ser detectada em nível molecular (cepa IPEC-654-H). Durante a cinética de produção de urease através do tempo houve uma redução da produção da enzima, entretanto, as amostras de 9h dos três isolados apresentaram aumento expressivo de produção, sugerindo que é necessária uma adaptação ao meio de cultivo.

Através dos resultados obtidos durante a padronização da reação de qPCR, o *primer* referente ao gene constitutivo EF1A foi considerado o mais adequado para realização do trabalho por não apresentar ampliações inespecíficas. A concentração de 10 μ M dos *primers* foi considerada como apropriada por apresentar menor probabilidade de formação de dímeros e maior aproveitamento de material, além disso, proporcionou resultados satisfatórios durante a realização dos testes de cinética de expressão gênica com os genes avaliados. As eficiências encontradas para EF1A (115%) e URE (106%) foram consideradas como satisfatórias para continuação dos testes realizados neste estudo.

Com base nos resultados encontrados durante a análise da expressão gênica, é possível presumir que o gene *ure* seja um gene constitutivo em *S. brasiliensis*, uma vez que foi detectada sua expressão em meio de cultivo sem ureia como fonte de nitrogênio. Além disso, é possível sugerir que o gene *ure* atue como possível fator de virulência, pois o mesmo foi detectado tanto nas cepas consideradas produtoras como nas não produtoras desta enzima. Contudo, para confirmar tais hipóteses, é necessário analisar mais cepas tanto em diferentes condições de cultivo, quanto em tempos de crescimento. Por fim, espera-se que este trabalho seja importante como ponto de partida para o desenvolvimento de novos estudos sobre *S. brasiliensis*, bem como sobre a sua patogênese e virulência uma vez que esta é a espécie predominante no Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

AJELLO, L.; KAPLAN, W. A new variant of *Sporothrix schenckii*. **Mykosen**, v. 12, n.11, p. 633-644, 1969.

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; ARAÚJO, G.S.; DE OLIVEIRA, M.M.; GERFEN, G.J.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n.24, p. 8623-8630, 2012.

ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, L.C.; OLIVEIRA, M.M.E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M.M.E.; FREITAS, D.F.S.; VALLE, A.C.F.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.9, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4169245/>>. Acesso em: 03 out. 2019.

APPLIED BIOSYSTEMS. High-Capacity RNA-to-cDNA Kit. Applied Biosystems, 2018. Manual e protocolo. Disponível em:< https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4387949_RNAtoCDNA_PI.pdf>. Acesso em: 25 out. 2019.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n.7, p. 651-655,2009.

AZEVEDO, M. C. S.; RAMUNO, N. M.; FACHIN, L. R. V.; TASSA, M.; ROSA, P. S.; BELONE, A. F. F.; DIÓRIO, S. M.; SOARES, C. T.; GARLET, G. P.; TROMBONE, A. P. F. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.21, n.1, p.71-78, 2017.

BARROS, M.B.L; ALMEIDA-PAES, R.; SCHUBACH, A.O. *Sporothrix sckenckii* and sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n.4, p. 633-654, 2011.

BARROS, M.B.L; PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, A.O.; WANKE, B. Esporotricose. In: COURA, Jr. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2.ed., v. 2, 2013.

BARS-CORTINA, D., RIERA-ESCAMILLA, A., GOU, G., PIÑOL-FELIS, C., MOTILVA, M. J. Design, optimization and validation of genes commonly used in expression studies on DMH/AOM rat colon carcinogenesis model. **PeerJ**, v. 7, n. 6372, 2019.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W.R.; WILSON, K.S.; MILETTI, S.; CIURLI, S.; MANGANI, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. **Structure**, v.7, n.2, p. 205-216, 1999.

BERNARDES-ENGEMANN, A.R.; BARROS, M.B.L.; ZEITUNE, T.; RUSSI, D.C.; OROFINO-COSTA, R.; LOPES-BEZERRA, L.M. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. **Medical Mycology**, v. 53, n.1, p. 28-33, 2015.

BRANDOLT, T.M.; MADRID, I.M.; POESTER, V.R.; SANCHOTENE, K.O.; BASSO, R.P.; KLAFKE, G.B.; RODRIGUES, M.L.; XAVIER, M.O. Human sporotrichosis: a zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012-2017. **Medical Mycology**, v.57, n.5, p.527-533, 2018.

CAMACHO, E.; LEÓN-NAVARRO, I.; RODRÍGUEZ-BRITO, S.; MENDOZA, M.; NIÑO-VEJA, G.A. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n.94, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4348157/> >. Acesso em: 03 out. 2019.

CARLINI, C.R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: a review. **Toxicon**, v.110, p. 90-109, 2016.

CARLOS, I.Z.; SASSÁ, M.F.; DA GRAÇA SGARBI, D.B.; PLACERES, M.C.; MAIA, D.C. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 168, n.1, p.1-10, jul. 2009.

CARMICHAEL, J.W. Chrysosporium and some other aleuriosporic hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, n.8, p. 1137-1173, 1962.

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

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, n.1, p.156-159 1987.

CHRISTENSEN, W.B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal of Bacteriology**, v.52, n.4, p.461-466, 1946.

COLE, G.T. Ammonia production by *Coccidioides immitis* and its possible significance to the host-fungus interplay. In: BOSSCHE, H.; STEVENS, D.A.; ODDS, F.C. **Host fungus interplay**. California: National Foundation for Infectious Diseases, 1997.

CÓRDOBA, S., ISLA, G., SZUSZ, W., VIVOT, W., HEVIA, A., DAVEL, G., CANTEROS, C. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii sensu lato* isolated in Argentina. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 441-448, 2018.

CRUZ, I.L.R.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.G.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA-PAES, R. Evaluation of melanina production by *Sporothrix luriei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n.1, p.68-70, 2018.

DIAS, N.M., OLIVEIRA, M.M.E., PORTELA, M.A., SANTOS, C., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M., LIMA, N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix Mexicana*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n.10, p. 1975-1976, 2011.

DUNSTAN, R.W., REIMANN, K.A., LANGHAM, R.F. Feline sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n.8, p.880-883, 1986.

FALCÃO, E. M. M. **Hospitalizações e mortalidade por esporotricose no Brasil com ênfase no estado do Rio de Janeiro: uma análise de 25 anos**. 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

FEDER, V., KMETZSCH, L., STAATS, C.C., VIDAL-FIGUEIREDO, N., LIGABUE-BRAUN, R., CARLINI, C.R., VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **The FEBS Journal**, v.282, n.8, p.1406-1418, 2015.

FERNANDES, G.F. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v.4, n.3, p. 241-249, 2013.

FERNANDES, M.R.A. **Caracterização molecular e funcional da urease de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto de patologia tropical e saúde pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, v. 69, n.1, p. 18-28, 2008.

FREITAS, D. F. S. **Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos associados à esporotricose**. 2014. 164 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

FU, M.S., COELHO, C., DE LEON-RODRIGUEZ, C.M., ROSSI, D.C.P., CAMACHO, E., JUNG, E.H., KULKARNI, M., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLOS Pathogens**, v.14, n.6, 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. ESPOROTRICOSE HUMANA E ANIMAL: TIRANDO DÚVIDAS E TROCANDO IDEIAS COM ESPECIALISTAS E GESTORES, 2020, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em:

<<https://campusvirtual.fiocruz.br/gestordecursos/hotsite/cvf-node-30225-submission-3938>>. Acesso em 25 nov. 2020.

GOBERT, A.P., MERSEY, B.D., CHENG, Y., BLUMBERG, D.R., NEWTON, J.C., WILSON, K.T. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. **Journal of immunology**, v.168, n.12, p. 6002-6006, 2002.

GREMIÃO, I. D.F., MIRANDA, L. H. M., REIS, E. G., RODRIGUES, A. M., PEREIRA, S. A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, 2017.

GREMIÃO, I. D.F., OLIVEIRA, M. M. E., MIRANDA, L. H. M., FREITAS, D. F. S., PEREIRA, S. A. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 621-624, 2020.

HEKTOEN, L., PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii* a new pathogenic fungus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n.1, p. 77-89, 1900.

HU, Q.B., HE, Y.U., ZHOU, X. Construction and analysis of the cDNA subtraction library of yeast and mycelial phases of *Sporothrix globosa* isolated in China: identification of differentially expressed genes. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.16, n.2, p.991-997, 2015.

KANE, J., FISCHER, J.B. The differentiation of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by use of Christensen's urea broth. **Canadian Journal of Microbiology**, v.17, n.7, p.911-913, 1971.

KANO, R., ANZAWA, K., MOCHIZUKI, T., NISHIMOTO, K., HIRUMA, M., KAMATA, H., HASEGAWA, A. *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto* *S. globosa*) mating type 1-2 (MAT1-2) gene. **The Journal of Dermatology**, v. 40, n.9, p. 726-730, 2013.

KARPLUS, P.A., PEARSON, M.A., HAUSINGER, R.P. 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned? **Accounts of Chemical Research**, v.30, n.8, p. 330-337, 1997.

KAUFFMAN, C.A., BUSTAMANTE, B., CHAPMAN, S.W., PAPPAS, P.G., INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n.10, p. 1255-1265, 2007.

KOSIKOWSKA, P., BERLICKI, L. Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 21, n.6, p. 945-957, 2011.

KWON-CHUNG, K.J., BENNETT, J.E. Sporotrichosis. In: RIPPON, J.W. **Medical mycology**. Philadelphia: Lea & Fibeger, 1992, p.707-729.

LACAZ, C.S., PORTO, E., HEINS-VACCARI, E.M., MELO, N.T. **Guia para identificação: fungos actinomicetos algas de interesse médico.** São Paulo: Sarvier, 2002.

LANDOLFO, S., IANIRI, G., CAMIOLO, S., PORCEDDU, A., MULAS, G., CHESSA, R., ZARA, G., MANNAZZU, I. CAR gene cluster and transcript levels of carotenogenic genes in *Rhodotorula mucilaginosa*. **Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 78-87, 2018.

LARSSON, C.E., GONÇALVES, M.A., ARAUJO, V.C., DAGLI, M.L.Z., CORREA, B., NETO, C.F. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n.5, p. 351-358, 1989.

LIMA, O.C., FIGUEIREDO, C.C., PEREIRA, B.A.S., COELHO, M.G.P., MORANDI, V., LOPES-BEZERRA, L.M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.5, p.651-657, 1999.

LIN, C.; YE, R.; XIA, Y. L. A meta-analysis to evaluate the effectiveness of real-time PCR for diagnosing novel coronavirus infections. **Genetics and molecular research**, v. 14, n. 4, p. 15634-15641, 2015.

LIU, T., ZHANG, K., ZHOU, X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 15, n.1, p.100-108, 2014.

LIU, W., DENG, Y., ZHOU, Y., CHEN, H., DONG, Y., WANG, N., LI, X., JAMEEL, A., YANG, H., ZHANG, M., CHEN, K., WANG, F., LI, H. Normalization for relative quantification of mRNA and microRNA in Soybean exposed to various abiotic stresses. **PLOS One**, v. 11, n. 5, 2016.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, n.4, p. 402-408, 2001.

LUTZ, D.A., SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. In: BENCHIMOL, J.L., SÁ, M.R. (org). **Adolpho Lutz: Primeiros trabalhos: Alemanha, Suíça e Brasil (1878-1883)**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, v.1, n.I.3, 2004.

MADRID, H., CANO, J., GENÉ, J., BONIFAZ, A., TORIELLO, C., GUARRO, J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n.3, p. 218-222, 2009.

MARIMON, R., CANO, J., GENÉ, 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**, v. 45, n.10, p. 3198-3206, 2007.

MARIMON, R., GENÉ, J., CANO, J., TRILLES, L., LAZÉRA, M.S., GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of clinical microbiology*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n.9, p. 3251-3256, 2006.

MCCARTY, G.W., BREMNER, J.M. Production of urease by microbial activity in soils under aerobic and anaerobic conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, n.3, p.228-230, 1991.

MIRBOD-DONOVAN, F., SCHALLER, R., HUNG, C., XUE, J., UTZ, R., COLE, G.T. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. **Infection and immunity**, v.74, n.1, 2006.

MOBLEY, H.L., ISLAND, M.D., HAUSINGER, R.P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, v. 59, n.3, p. 451-480, 1995.

MORRISON, A.S., LOCKHART, S.R., BROMLEY, J.G., KIM, J.Y., BURD, E.M. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. **Medical Mycology Case Reports**, v.2, p.88-90, 2013.

NUNES, B. T. D.; MENDONÇA, M. H. R.; SIMITH, D. B.; MORAES, A. F.; CARDOSO, C. C.; PRAZERES, I. T. E.; AQUINO, A. A.; SANTOS, A. C. M.; QUEIROZ, A. L. N.; RODRIGUES, D. S. G.; ANDRIOLO, R. B.; ROSA, E. S. T.; MARTINS, L. C.; VASCONCELOS, P. F. C.; MEDEIROS, D. B. A. Development of RT-qPCR and semi-nested RT-PCR assays for molecular diagnosis of hantavirus pulmonar syndrome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 12, 2019.

OLIVEIRA, L.C. **Caracterização molecular e expressão fenotípica da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis***. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

OLIVEIRA, L.C. **Caracterização molecular e funcional da enzima urease (URE) de *Sporothrix brasiliensis***. 2020. 109 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

OPOTA, O.; BROUILLET, R.; GREUB, G.; JATON, K. Methods for real-time PCR – Based diagnosis of *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, and *Chlamydia abortus* infections in an opened molecular diagnostic platform. **Methods in molecular biology**, v. 1616, p.171-181, 2017.

OROFINO-COSTA, R.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R.; MACEDO, P.M.; RODRIGUES, A.M. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p.606-620, 2017.

PADHYE, A.A., KAUFMAN, L., DURRY, E., BANERJEE, C.K., JINDAL, S.K., TALWAR, P., CHAKRABARTI, A. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n.9, p.2492-2494, 1992.

PEREIRA, S. A., GREMIÃO, I. D. F., KITADA, A. A. B., BOECHAT, J. S., VIANA, P. G., SCHUBACH, T. M. P. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio

de Janeiro, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392-393, 2014.

QIAGEN. Type-it HRM PCR. QIAGEN, 2009. Manual e protocolo. Disponível em: <<https://www.researchcart360.com/webshaper/pcm/files/Qiagen/EN-Type-it-HRM-PCR-Handbook.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2019.

QUEIROZ-TELLES, F., FAHAL, A.H., FALCI, D.R., CACERES, D.H., CHILLER, T., PASQUALOTTO, A.C. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v.17, n.11, p. 367-377, 2017.

QUINTELLA, L.P., PASSOS, S.R.L., VALLE, A. C. F., GUTIERREZ-GALHARDO, M.C., BARROS, M.B.L, CUZZI, T., REIS, R.S., CARVALHO, M.H.G.F., ZAPPA, M.B., SCHUBACH, A.O. **Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases**, v. 38, n. 1, p. 25-32, 2011.

RAMOS-E-SILVA, M., VASCONCELOS, C., CARNEIRO, S., CESTARI, T. Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n.2, p. 181-187, 2007.

REIS, E.G. **Ensaio clínico comparativo entre itraconazol e associação de itraconazol e iodeto de potássio no tratamento da esporotricose felina**. 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

RIPPON, J.W. **Medical mycology**. Philadelphia: WB Saunders Company, p.325-352, 1988.

RODRIGUES, A.M., CRUZ CHOAPPA, R., FERNANDES, G.F., DE HOOG, G.S., DE CAMARGO, Z.P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v 120, n.2, p. 246-264, 2016.

RODRIGUES, A.M., DE HOOG, G.S., CAMARGO, Z.P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n.4, p. 405-12, 2013.

RODRIGUES, A.M., DE HOOG, G.S., CAMARGO, Z.P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n.12, 2015.

RODRIGUES, A.M., DE HOOG, G.S., CAMARGO, Z.P. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **PLOS Pathogens**, v. 12, n.7, 2016.

RODRIGUES, A. M., TERRA, P. P. D., GREMIÃO, I. D. F., PEREIRA, S. A., OROFINO-COSTA, R., CAMARGO, Z. P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32052359/>>. Acesso em: 23 set. 2020.

RUTHERFORD, J.C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **PLOS Pathogens**, v.10, n.5, 2014.

SAIDI, N., OWLIA, P., MARASHI, S.M.A., SADERI, H. Inhibitory effect of probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* on biofilm formation and expression of α -hemolysin and enterotoxin A genes of *Staphylococcus aureus*. **Iranian Journal of Microbiology**, v.11, n.3, p.246-254, 2019.

SALAMA, N.R., HARTUNG, M.L., MULLER, A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature reviews microbiology**, v.11, n.6, p.385-399, 2013.

SCHWARTZ, J.T., ALLEN, L.A. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v.79, n.6, p. 1214-1225, 2006.

SILVA, M. B. T., COSTA, M. M. M., TORRES, C. C. S., GALHARDO-GUTIERREZ, M. C., VALLE, A. C. F., MAGALHÃES, M. A. F. M., SABROZA, P. C., OLIVEIRA, R. M. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 10, p. 1867-1880, 2012.

SIMONI, R.D., HILL, R.H, VAUGHAN, M. Urease, the first crystalline enzyme and the proof that enzymes are proteins: the work of James B. Sumner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.35, 2002.

SINGER, J.I., MUNCIE, J.E. Sporotrichosis; Etiologic considerations and report of additional cases from New York. **New York State Journal of Medicine**, v. 17, n.1, 1952.

THOMPSON, D.W., KAPLAN, W. Laboratory-acquired sporotrichosis. **Sabouraudia**, v. 15, n.2, p. 167-170, 1977.

TRUJILLO-ESQUIVEL, E., MARTÍNEZ-ALVAREZ, J. A., CAVIJO-GIRALDO, D. M., HERNÁNDEZ, N. V., FLORES-MARTÍNEZ, A., PONCE-NOVOLA, P., MORA-MONTES, H. M. The *Sporothrix schenckii* gene encoding for the ribosomal protein L6 has constitutive and stable expression and works as an endogenous control in gene expression analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1676, 2017.

WALKER, D. I.; MCQUILLAN, J.; TAIWO, M.; PARKS, R.; STENTON, C. A.; MORGAN, H.; MOWLEM, M. C.; LESS, D. N. A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental Waters. **Water Research**, v. 126, p. 101-110, 2017.

YAMAZAKI, S.; KONDO, M.; SUDO, K.; UEDA, T.; FUJIWARA, H.; HASEGAWA, N.; KATO, S. Qualitative Real-Time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 69, n. 5, p. 367-372, 2016.

YU, J.J., SMITHSON, S.L., THOMAS, P.W., KIRKLAND, T.N., COLE, G.T. Isolation and characterization of the urease gene (URE) from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. **Gene**, v.198, n.1-2, p.387-391, 1997.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M., ALMEIDA-PAES, R., OLIVEIRA, M.M.E., FREITAS, D.F.S, GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. New Diagnostic Applications in Sporotrichosis. In: KHOPKAR, U. **Skin Biopsy – Perspectives**. IntechOpen, 2011. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/skin-biopsy-perspectives/new-diagnostic-applications-in-sporotrichosis>>. Acesso em: 03 out. 2019.

ZHANG, M., LI, F., GONG, J., YANG, X., ZHANG, J., ZHAO, F. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction for fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*. **Medical Mycology**, 2019. Disponível em:< <https://academic.oup.com/mmy/advance-article-abstract/doi/10.1093/mmy/myz029/5423919?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 03 out. 2019.

ANEXO A – Produção Acadêmica

1. Apresentação Oral: “Expressão gênica da enzima urease em diferentes cepas de *Sporothrix brasiliensis*”. Evento: 27^a Reunião Anual de Iniciação Científica, INI-Fiocruz, 2018.
2. Apresentação Oral: Expressão gênica da enzima urease em diferentes cepas de *Sporothrix brasiliensis*. Evento: 28^a Reunião Anual de Iniciação Científica, INI-Fiocruz, 2019.
3. Palestra: PCR quantitativo em tempo real e apresentação da padronização de reação do projeto de Iniciação Científica. Disciplina de Microbiologia e Imunologia Clínica, Bacharelado em Farmácia, IFRJ – Campus Realengo, 2019.
4. Apresentação Oral (virtual): Expressão gênica da enzima urease em diferentes cepas de *Sporothrix brasiliensis*. Evento: 29^a Reunião Anual de Iniciação Científica, INI-Fiocruz, 2020.
5. Palestra (virtual): Esporotricose. Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Bacharelado em Farmácia, IFRJ – Campus Realengo.

ANEXO B – Premiação




MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
VICE-DIREÇÃO PESQUISA CLÍNICA

CERTIFICADO

Certificamos que **Beatriz da Silva Motta**

Participou da **27ª Reunião Anual de Iniciação Científica/INI-FIOCRUZ - 2019**

Prêmio **1º Colocado como Melhor Trabalho**

Em **19 de julho de 2019**

Rio de Janeiro, 19 de julho de 2019.



Rosely Maria Zancopé Oliveira
Vice-diretora de Pesquisa Clínica
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
INI / FIOCRUZ