

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE BIOMEDICINA**

**GEORGGIA FATIMA SILVA NALIATO**

**MODELO INVERTEBRADO *Tenebrio Molitor* PARA A AVALIAÇÃO  
DA VIRULÊNCIA DE ESPÉCIES CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE FUNGOS  
PATOGENICOS DO GÊNERO *Sporothrix***

Natal  
Fevereiro de 2022

**MODELO INVERTEBRADO *Tenebrio Molitor* PARA A AVALIAÇÃO  
DA VIRULÊNCIA DE ESPÉCIES CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE FUNGOS  
PATOGENICOS DO GÊNERO *Sporothrix***

Por

Georggia Fatima Silva Naliato

Monografia Apresentada à  
Coordenação do Curso de  
Biomedicina da Universidade  
Federal do Rio Grande do Norte,  
como Requisito Parcial à Obtenção  
do Título de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Cordeiro Theodoro.

Co-orientador: Prof. Dr. Thales Domingos Arantes

Natal

Fevereiro de 2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**

A Monografia “**Modelo invertebrado *Tenebrio Molitor* para a avaliação da virulência de espécies clínicas e ambientais de fungos patogênicos do gênero *Sporothrix***”, elaborada por Georggia Fatima Silva Naliato e aprovada por todos os membros da Banca examinadora foi aceita pelo Curso de Biomedicina e homologada pelos membros da banca, como requisito parcial à obtenção do título de BACHAREL EM BIOMEDICINA.

Natal, 10 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Profª Dra. Raquel Cordeiro Theodoro  
(Departamento de Biologia Celular e Genética - UFRN)

---

Profª Dra. Adriana Ferreira Uchoa  
(Departamento de Biologia Celular e Genética - UFRN)

---

Prof. Dr. Eduardo Bagagli  
(Departamento de Microbiologia e Imunologia – UNESP- Botucatu)

Naliato, Georggia Fatima Silva.

Modelo invertebrado Tenebrio Molitor para avaliação da virulência de espécies clínicas e ambientais de fungos patogênicos do gênero Sporothrix / Georggia Fatima Silva Naliato. - 2022.

42 f.: il.

Monografia (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Curso de Biomedicina. Natal/RN, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Cordeiro Theodoro.

Coorientador: Prof. Dr. Thales Domingos Arantes.

1. Sporothrix - Monografia. 2. Tenebrio molitor - Monografia. 3. Infecção - Monografia. I. Theodoro, Raquel Cordeiro. II. Arantes, Thales Domingos. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 616.992

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Raquel Theodoro, agradeço não só pela confiança e oportunidade de fazer ciência de qualidade, mas também pelo exemplo de mulher, cientista, professora e ser humano extraordinário. Estar sob sua orientação é uma das minhas maiores conquistas, te dedico este trabalho e toda minha admiração.

Ao Prof. Dr. Thales Arantes, agradeço pelo apoio e principalmente pela introdução ao incrível mundo da Micologia Médica. Sua co-orientação foi de fundamental importância para as habilidades laboratoriais que levo comigo hoje. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial.

Aos meus pais, Paula e Marcello, pelo amor e apoio incondicional, por garantirem que eu tivesse a melhor educação e ambiente familiar possível. A vocês dedico esta graduação, toda a minha admiração e amor eterno.

Às minhas tias Maria Helena e Lucinda Maria por todo o amor, suporte familiar e incentivo.

Ao meu incrível grupo de pesquisa (família), por todas as edificantes discussões científicas regadas a café e auxílio incondicional. Destaco um agradecimento especial aos meus amigos Ronald Gomes e Kássia Jéssica, o suporte de vocês foi imprescindível para a minha formação como cientista e biomédica.

Aos colaboradores Prof. Dr. Andersson Rodrigues (UNIFESP) e Dra. Gisleine Fernanda França (UFG) meu muito obrigado, sem a colaboração de vocês esse trabalho não seria possível.

À CNPq, órgão financiador da minha bolsa de iniciação científica e aos processos CNPq 305506/2019-6 e 401513/2016-5, nos quais estive envolvida e possibilitaram a execução deste trabalho.

## RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea zoonótica, cujo principal hospedeiro é o felino. Devido à rápida dispersão via inoculação traumática, esta doença representa um sério problema de saúde pública. Esta micose é causada pelas espécies de fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix*, em especial por 7 espécies que estão divididas em um clado clínico (as que comumente causam a esporotricose) e um clado ambiental (espécies patogênicas acidentais). Devido a essa variação de agentes etiológicos possíveis da esporotricose, a compreensão dos diferentes perfis de virulência e resposta a antifúngicos é essencial para um tratamento rápido e preciso. Assim, modelos alternativos ao murino, mais práticos e de fácil reprodutibilidade, são atrativos para estudos comparativos de perfis de virulência. Neste trabalho, larvas da espécie do coleóptera *Tenebrio molitor*, foram usadas como modelo de inoculação experimental para o clado clínico e ambiental de espécies patogênicas de *Sporothrix*, demonstrando ser um modelo alternativo eficiente e reproduzível. Observou-se maiores taxas de sobrevivências das larvas infectadas com conídios das espécies clínicas e menores das larvas infectadas com conídios das espécies ambientais. Foi possível também, por meio da histopatologia, identificar o dimorfismo do fungo no tecido larval, mesmo fenômeno que ocorre no hospedeiro mamífero. Os resultados das recuperações de UFC's indicam que as espécies do clado clínico estão mais familiarizadas com o ambiente de parasitismo, se propagando melhor no tecido larval e mantendo o hospedeiro vivo por mais tempo.

**Palavras chave:** *Sporothrix*. *Tenebrio molitor*. Infecção. Virulência. Dimorfismo. Recuperação. Clado clínico. Clado ambiental. Modelo invertebrado.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a zoonotic subcutaneous mycosis, which has the feline as the main host. Due to the rapid spread by traumatic inoculation, this disease represents a serious public health problem. This mycosis is caused by thermodimorphic fungal species of the genus *Sporothrix*, in particular by 7 species that are divided into a clinical clade (those that commonly cause sporotrichosis) and an environmental clade (accidental pathogenic species). Due to this range of possible etiologic agents of sporotrichosis, the understanding of the different virulence profiles and response to antifungal agents is essential for a rapid and accurate treatment. Thus, alternative models to the murine, more practical and easily reproducible, are attractive for comparative studies of virulence profiles. In this work, larvae of the Coleoptera species *Tenebrio molitor* were used as an experimental inoculation model for the clinical and environmental clade of pathogenic *Sporothrix* species, proving to be an efficient and reproducible alternative model. Higher survival rates were observed for larvae infected with conidia of clinical species and lower for larvae infected with conidia of environmental species. Through histopathology, it was possible to identify the dimorphism of the fungus in the larval tissue, the same process that occurs in the mammalian host. The results of CFU's recoveries indicate that the species of the clinical clade are more familiar with the parasitic environment, by propagating better in the larval tissue and keeping the host alive for longer.

**Keywords:** *Sporothrix*. *Tenebrio molitor*. Infection. Virulence. Dimorphism. Recovery. Clinical clade. Environmental clade. Invertebrate model.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1. Objetivo geral.....	20
1.2. Objetivos específicos.....	20
<b>2- MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
2.1. Manutenção das cepas e ensaio de termo conversão.....	22
2.2. Cultivo e preparação dos inoculo.....	22
2.3. Manutenções da colônia de <i>T. molitor</i> e infecção das larvas.....	23
2.4. Recuperações de UFC's fúngicas.....	24
2.5. Histopatologia.....	25
<b>3- RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. Termoconversão micélio-levedura.....	25
3.2. Manutenção da colônia de <i>T.molitor</i> .....	25
3.3. Padronização dos inóculos conidiais e curvas de sobrevivência.....	26
3.4. Recuperação de UFC's.....	27
3.5. Histopatologia.....	28
<b>4 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
4.1. Padronização da criação do modelo invertebrado <i>T. Molitor</i> e do preparo do inóculo fúngico .....	29

4.2. Relação patógeno x hospedeiro entre <i>Sporothrix spp.</i> E <i>T. Molitor</i> . Curvas de sobrevivência, recuperação de UFC e histopatologia.....	31
<b>5 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Informações sobre as cepas utilizadas no trabalho.....	22
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Distribuição das espécies.....	14
<b>FIGURA 2.</b> Desenho experimental metodológico.....	21
<b>FIGURA 3.</b> Compartimentalização da colônia de <i>T.molitor</i> .....	25
<b>FIGURA 4.</b> Gráfico das curvas de sobrevivência obtidas a partir da infecção de diferentes espécies de <i>Sporothrix spp.</i> UFC's.....	27
<b>FIGURA 5.</b> Recuperação de UFC's.....	28
<b>FIGURA 6.</b> Análise microscópica dos tecidos infectados.....	29
<b>FIGURA 7.</b> Principais hipóteses.....	36

## 1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença ocasionada pela inoculação traumática das espécies patogênicas dos fungos do gênero *Sporothrix spp.* Trata-se de uma micose subcutânea de distribuição mundial com maior ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, atingindo humanos e animais. É originalmente conhecida como uma sapronose ocupacional, popularmente chamada de doença do jardineiro, representando um sério problema zoonótico cosmopolita, dispersando-se majoritariamente pelo hospedeiro felino (GREMIÃO et al., 2017).

Após semanas, até três meses, da inoculação, a doença, se manifesta gerando lesões cutâneas e, com menor frequência, quadros envolvendo mucosas, ossos, articulações, músculos e sistema nervoso. Estima-se que entre 75% e 90% dos casos clínicos são representados pela forma clínica linfático-cutânea, caracterizada pelo surgimento de nódulos, fístulas e lesões cutâneas no paciente. (BONIFAZ & VÁZQUEZ-GONZÁLES, 2013; ORFINO-COSTA et al., 2017). Em menor frequência, é observada a forma sistêmica da micose, geralmente em associação a fatores como elevada carga fúngica inoculada e quadros de imunossupressão, principalmente envolvendo pacientes HIV/AIDS (PAIXÃO et al., 2015).

Inicialmente, a doença foi descrita em clínica por Benjamin R. Schenck em 1898, a partir do isolamento do agente fúngico de lesões nas mãos de pacientes do hospital John Hopkins, EUA. Na construção do perfil clínico, Schenck descreveu características morfológicas do fungo e a evolução da inoculação desse microrganismo em modelo murino. Esse mesmo isolado, posteriormente foi estudado pelo micologista Erwin F. Smith, do departamento de agricultura em Washington, que classificou o agente como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (Basidiomycota: Polyporales), porém algumas características clássicas da conidiogênese simpodial, durante o estado anamórfico, aparecem em gêneros pertencentes à ordem Ophiostomales (Ascomycota) (SCHENCK et al., 1898). Em 1961, Howard descreve o dimorfismo do fungo, o qual, a 25°C, se encontra na morfologia micelial e, na sua forma parasitária, a 37°C, sofre uma conversão

morfológica para levedura. Alguns anos após o primeiro isolamento, levando em vista estudos morfológicos e fisiológicos do microrganismo, Ludvig Hektoen e C. F. Perkins propõem o gênero *Sporothrix* para se referir ao *Sporothrix schenckii* (Ascomycota: Ophiostomatales) (HEKTOEN e PERKINS et al., 1900).

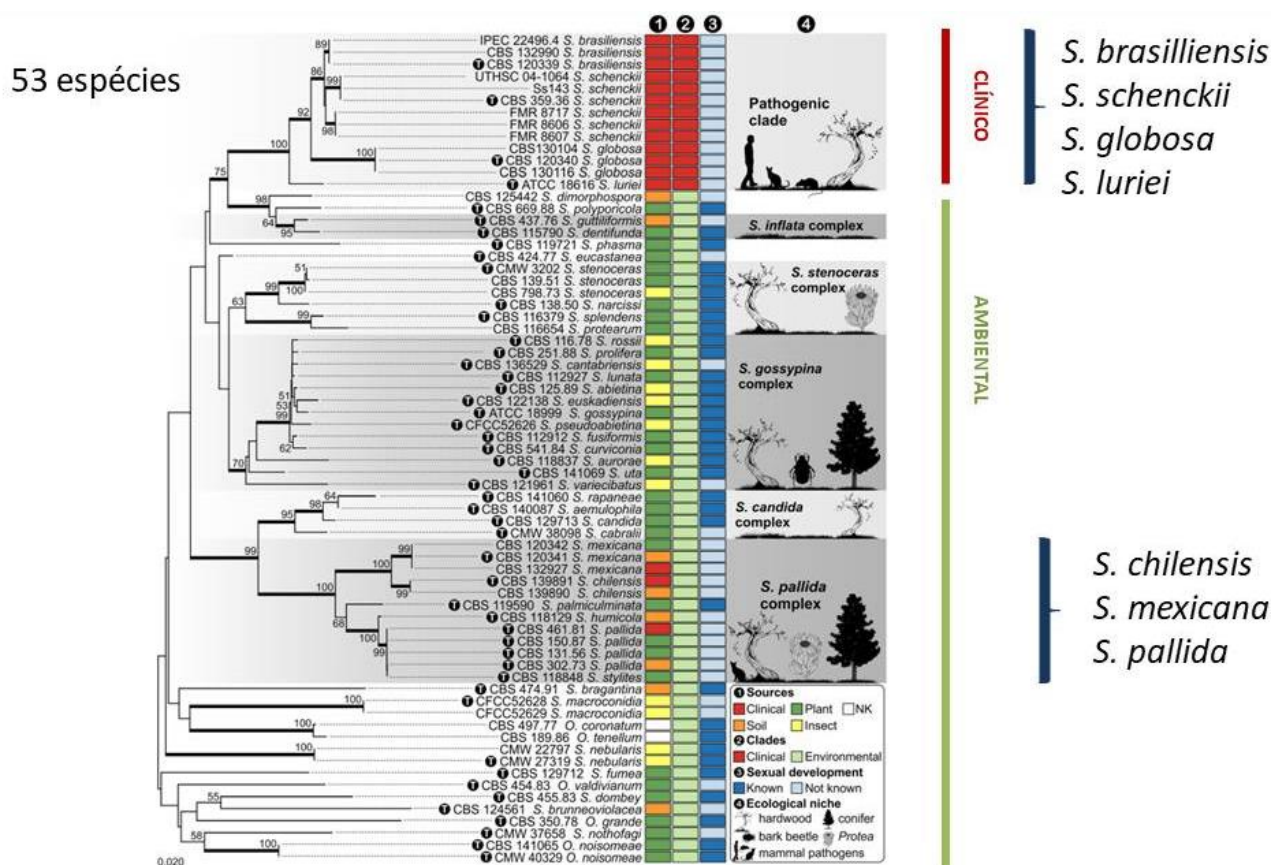
Inicialmente, as espécies patogênicas do gênero *Sporothrix* foram classificadas como o complexo *S. schenckii*, um agrupamento generalista utilizado até recentemente (OLIVEIRA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013). Com o desenvolvimento dos estudos moleculares, foi possível o sequenciamento associado ao estudo filogenético do gênero, que resultou na definição de 53 espécies, incluindo as mais comumente encontradas em amostras clínicas (RODRIGUES et al., 2020). Os principais genes utilizados para identificação do gênero *Sporothrix* são: calmodulina,  $\beta$ -tubulina, EF-1 $\alpha$  e ITS1/ITS2+5.8S (MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2007; ZHOUL et al., 2014; ANDERSSON et al., 2013). Conseqüentemente ocorreu a dissolução do complexo *Schenckii* em *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei*, facilitando também a identificação espécie-específica do agente.

Com o aprimoramento do conhecimento da biologia do fungo e o desenvolvimento de pesquisas clínicas, foi possível notar consideráveis diferenças morfológicas, fisiológicas, genéticas, epidemiológicas e de virulência entre as espécies. Atualmente, as espécies patogênicas *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*, são definidas como um clado monofilético de relevância clínica similar, primariamente isolados de casos animais e humanos, denominado então de clado clínico (de BEER et al., 2016; de HOOG et al., 2015).

Já as demais espécies de *Sporothrix* estão agrupadas em um extenso clado ambiental, no qual a maioria está associada à vida saprofítica em substratos no solo e matéria orgânica em decomposição. De modo geral, muitas espécies da ordem Ophiostomales são considerados fitopatógenos e possuem uma relação muito próxima com a vida saprofítica, inclusive existe uma relação ecológica muito interessante entre os fungos dessa ordem com besouros (Coleoptera: Scolytine). Já foram identificadas relações de comensalismo, parasitismo e mutualismo entre espécies do gênero *Sporothrix* e esses animais, que aparentemente são importantes para a dispersão ambiental não só de *Sporothrix* spp., como também de fungos

*Ophiostoma*, um gênero muito próximo filogeneticamente ao *Sporothrix* (RODRIGUES et al., 2013; de BEER et al., 2016). Mesmo se estabelecendo esse paralelo ecológico, nunca foram identificadas espécies patogênicas, que costumam infectar mamíferos, nesse sistema.

Algumas das espécies ambientais podem ser consideradas patogênicas ocasionais do hospedeiro humano e animal, devido a raros casos descritos em mamíferos, sendo essas espécies distribuídas nos complexos *S. pallida* (e.g., *S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. humicola* e *S. pallida*) e *S. stenoceras*, porém suas relações ecológicas e clínicas ainda não se encontram totalmente elucidadas, a figura 1 apresenta filogeneticamente a distribuição das espécies (RODRIGUES et al., 2020).



**Figura 1 (adaptada de Rodrigues et al., 2020). Distribuição das espécies.** Distribuição filogenética das espécies do gênero *Sporothrix* em um clado clínico e outro ambiental, ressaltando as espécies de importância clínica em ambos.

Devido às espécies de *Sporothrix* ocorrerem no ambiente (materiais vegetais ou solo), a esporotricose tem um importante perfil saprofítico, sendo que muitas infecções se dão a partir da inoculação traumática do material ambiental contaminado por hifas ou esporos fúngicos. Além do perfil saprofítico, a esporotricose se caracteriza como uma zoonose de fácil dispersão e difícil controle devido à forma de infecção traumática, via mordeduras ou arranhaduras, estabelecendo-se facilmente em vias de infecção animal-animal e animal-humano (RODRIGUES et al 2020). O primeiro caso envolvendo a transmissão de um felino para um humano foi relatado em 1952, Nova York, enquanto no Brasil, em 1907, Adolfo Lutz e Alfonso Splendore já tinham descrito o primeiro caso da doença em ratos que habitavam o sistema de esgoto de São Paulo, constatando a via de infecção rato-rato por meio de mordidas (SINGER et al., 1952; LUTZ e SPLENDORE et al., 1907). Anteriormente já existiam relatos de equinos infectados no Brasil que transmitiam a doença também pela mordida (LARSSON et al., 1898; LEÃO et al., 1934). Por volta dos anos de 1950, um grande número de casos começou a ser relatado na capital paulista, quando Floriano de Almeida e colaboradores, durante o mapeamento de 344 casos, descrevem a predominância do perfil zoonótico da esporotricose junto com o primeiro relato da zoonose transmitida pela via de infecção felino-humano no país (ALMEIDA et al., 1955).

No Rio de Janeiro, a partir da metade dos anos 90, ocorreu um aumento substancial de casos em felinos, se isolando frequentemente *S. schenckii* da cavidade oral de animais infectados (SCHUBACH et al., 2001). Ainda hoje, a esporotricose é um sério problema de saúde pública no Brasil, já que sua dispersão se encontra fora de controle. O hospedeiro felino é o mais afetado pela doença, possuindo uma relação direta com a espécie *S. brasiliensis* que predomina no país, tendo sido descrita em diversos estados do sudeste brasileiro como Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e mais recentemente em regiões metropolitanas do Nordeste (RODRIGUES et al., 2020).

Pelo mundo, mais de 80% dos casos são causados por uma única espécie, de prevalência geográfica específica, esse fato muito provavelmente, relaciona-se a um perfil clonal de reprodução, se traduzindo em um surto local. Por exemplo, na Ásia 99,3% dos casos são causados pelo *S. globosa*, enquanto na Austrália e na África do Sul o *S. schenckii* é responsável por 94% dos casos. Já no sudeste da

América do Sul o *S. brasiliensis* aparece em 88% dos casos enquanto na América Central e do Norte o *S. schenckii* se mantém predominante em 89% dos casos. (ZHANG et al., 2015).

O diagnóstico laboratorial da esporotricose, é, predominantemente, realizado pela coleta de espécimes biológicas como tecido, pus e exsudato das lesões cutâneas, escarro e líquido sinovial, seguido de visualização microscópica direta ou da histopatologia (resultado sugestivo de esporotricose) e cultura microbiológica (padrão ouro de diagnóstico) (ORFINO-COSTA et al., 2017).

De um modo geral, as leveduras do *Sporothrix* são complicadas de identificar diretamente nas amostras clínicas, para facilitar a análise normalmente se é adicionado hidróxido de potássio (KOH) que degrada resíduos celulares que possam atrapalhar a visualização, sendo assim possível observar leveduras de 2-6 µm de diâmetro. Já pelo método de Gram é possível observar leveduras Gram positivas próximas a grandes células polimorfonucleadas (ORFINO-COSTA et al., 2017). Devido à dificuldade de identificação direta no tecido, o isolamento do fungo em cultura ainda é o padrão ouro de diagnóstico para a esporotricose. Primeiramente, o espécime clínico é semeado em ágar Sabouraud a 28°C e após 5 a 8 dias é possível observar colônias esbranquiçadas mucoides, que com o passar do tempo em cultura vão mudando para um crescimento membranoso e com pigmento, de rápido alastramento radial (DE HOOG et al., 1995). Esta é a morfologia micelial do *Sporothrix* spp., na qual é possível visualizar hifas finas, septadas e ramificadas (1–2 µm de diâmetro) com simpodulósporos ou radulósporos que caracterizam a estrutura de “margarida” clássica para a identificação do gênero.

Esse dimorfismo caracteriza a dualidade morfológica do fungo em ambiente saprofítico e parasitário, a diminuição de 37°C (parasitismo) para uma temperatura ambiente, atrelada a ausência do estímulo do sistema imune do organismo hospedeiro, faz com que o patógeno de levedura mude para a morfologia micelial, em cultura (HOWARD et al., 1961). Em conjunto à cultura, pode-se fazer também a histopatologia do tecido obtido por biópsia da lesão, na qual se pode ver uma estrutura clássica da esporotricose em mamíferos, os corpos asteroides ou fenômeno Splendore-Hoeppli, caracterizados por um aglomerado de imunoglobulinas em volta das leveduras. (ORFINO-COSTA et al., 2017).

Como a esporotricose pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Sporothrix*, a identificação molecular espécie-específica se tornou chave fundamental para a escolha do antifúngico, uma vez que trabalhos em modelo murino revelaram diferentes perfis de susceptibilidade entre diferentes espécies (de BEER et al., 2003; MARIMON et al., 2006). Uma avaliação mais recente, realizada em 2014 por Rodrigues e colaboradores, mostra que cepas de diferentes genótipos possuem os mais variados fenótipos de resistência a antifúngicos e que diferentes espécies possuem diferentes susceptibilidades a fármacos antifúngicos. Logo, foi constatado que *S. brasiliensis* e *S. schenckii* possuem susceptibilidade moderada a ITC (Itraconazol) e PCZ (posoconazol), entretando *S. schenckii* necessita de maiores MIC's de ITC do que o *S. brasiliensis* para sua efetividade. O PCZ apresenta MICs de valores mais baixos para *S. schenckii* e *S. mexicana*, quando comparado ao o ITC. 5FC, CAS e FLC apresentam atividade antifúngica contra todas as espécies de *Sporothrix* (RODRIGUES et al., 2014).

Atualmente, no Brasil, o tratamento da esporotricose se baseia na administração de itraconazol. A terbinafina pode ser usada como alternativa em casos de pacientes saudáveis com lesões limitadas e imunossuprimidos, apresentando casos disseminados, exceto aqueles com sepse. Ambos os fármacos atuam inibindo a síntese de ergosterol da parede celular fúngica (ANTUNES et al., 2009). Já o iodeto de potássio (KI) tem sido utilizado para esporotricose desde 1903, esse composto atua na quimiotaxia neutrófila e na fagocitose das células de *Sporothrix*, sendo comumente usado para esporotricose localizada (XUE et al., 2009). Por último, em casos mais extremos, nos quais é necessário um tratamento vitalício, normalmente se utiliza a anfotericina B lipossomal, que atua na permeabilidade da membrana celular (MARIO et al., 2016).

Estudos realizados com modelo de infecção animal se tornaram necessários para caracterizar a patogenia e correlaciona-la as variações genóticas entre as espécies, visando aperfeiçoar as demandas prognósticas, clínicas e terapêuticas, mostrando que além da manifestação clínica, a espécie envolvida se tornou fator determinante para a escolha do fármaco no tratamento. Foi observado, por exemplo, que o *S. brasiliensis* possui menor susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* a antifúngicos enquanto o *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. mexicana* são mais susceptíveis (RODRIGUES et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2014).

Em um primeiro estudo realizado em 1992, por Dixon e colaboradores, foram infectados murinos NYLAR com uma concentração conhecida de conídios de cepas clínicas e ambientais. Foi observado que apenas os isolados clínicos e apenas 8 dentro das 64 cepas ambientais testadas geraram 100% de mortalidade, entre 12 e 24 dias após a inoculação, sendo esses recuperados posteriormente dos órgãos dos animais testados, em contraste com os isolados não virulentos que foram eliminados do organismo dos animais (DIXON et al., 1992). Em outro trabalho, também com infecção experimental com conídios em modelo murino, Arrillaga-Moncrieffe e colaboradores (2009) acharam diferenças importantes em relação ao grau de virulência entre as espécies: *S. brasiliensis* mostrou maior tropismo pelo tecido nervoso sendo o mais virulento em termos de mortalidade e comprometimento do tecido infectado, seguido em ordem decrescente por *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. mexicana*. Em concordância com este estudo, mas com infecção de leveduras (e não conídios) em murino BALB/c, Fernandes e colaboradores (2003) caracterizaram o perfil de virulência, secreção proteica e imunogenicidade de diferentes espécies do gênero *Sporothrix*, mostrando que *S. brasiliensis* é a espécie mais virulenta, com a maior mortalidade, além de possuir a maior taxa de recuperação de colônias nos órgãos avaliados, enquanto a cepa de *S. globosa* foi considerada não virulenta (FERNANDES et al., 2013).

Para a esporotricose, como visto acima, o modelo murino é de extrema importância para a elucidação dos perfis de virulência e comportamento da doença, sendo considerado o principal modelo utilizado pelas semelhanças fisiológicas com o hospedeiro humano. Entretanto, a logística e infraestrutura requerida é mais elaborada dificultando experimentos que exigem um grande número de animais, sem contar com a burocracia ética envolvida na utilização de modelos vertebrados. Essas desvantagens são incompatíveis com a demanda de novas informações sobre a patogênese de agentes fúngicos, que cada vez mais se tornam mais resistentes a compostos antimicrobianos e oportunisticamente agravam outras condições clínicas (ARVANITIS et al. 2013). Nesse âmbito, surge uma nova possibilidade, a utilização de modelos invertebrados. Essa nova proposta, está cada vez mais ganhando espaço pela facilidade logística, burocrática e resultados próximos aos obtidos pelo modelo murino, além do mais, muitos organismos já foram padronizados para estudo de patogenias fúngicas como: ameboides,

*Caenorhabditis elegans*, *Tenebrio molitor*, *Drosophila melanogaster* e *Bombyx mori* e *Galleria mellonella* (TORRES et al., 2020).

Os modelos *Galleria mellonella* e *T. molitor* destacam-se por possuírem uma maior facilidade de manutenção, permitindo a inclusão de um grande número de insetos no experimento e proporcionando também a inclusão de fungos dimórficos nos ensaios, já que suportam temperaturas mais elevadas. A avaliação da virulência do gênero *Sporothrix* em *Galleria* já foi realizada em trabalhos recentes para o estudo de espécies clínicas, configurando o modelo como eficiente para as espécies do clado clínico. Em um estudo realizado em 2016, Clavijo-Giraldo e colaboradores inocularam conídios e leveduras de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* em diferentes concentrações no modelo *G. mellonella*. Logo, foi observado que concentrações de inóculo acima de  $10^5$  sobrecarregam o sistema imunológico do inseto, causando acúmulo de células fúngicas nos tecidos e desencadeando uma consequente falha sistêmica. Outro dado observado, foi o fato de que os ensaios realizados com a inoculação de conídios não resultaram em curvas estatisticamente diferentes entre ambas as espécies do clado clínico, apenas os ensaios realizados com leveduras evidenciaram uma maior mortalidade causada pelas cepas de *S. brasiliensis*. (CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016).

Recentemente *T. molitor* também foi utilizado, por Lozoya-Pérez e colaboradores (2021), para avaliar o seu desempenho como modelo de infecção para as espécies de *Sporothrix* do clado clínico: *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*. Os autores também caracterizaram parâmetros imunológicos importantes para compreensão dessa interação. Nesse trabalho, foi demonstrada a distinção entre a virulência das espécies quando inoculadas na fase leveduriforme, corroborando com os resultados previamente obtidos em *Galleria* (CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016). Os resultados obtidos em ambos modelos vertebrados corroboram com aqueles observados para o modelo murino nos quais, na fase leveduriforme, *S. brasiliensis* é considerada a espécie mais virulenta e o *S. globosa* a menos letal, enquanto os resultados obtidos com a fase micelial não destacaram diferenças significativas entre as curvas, apenas convergem em uma menor virulência em comparação a fase leveduriforme. (LOZOYA-PÉREZ et al., 2021).

Os trabalhos apresentados acima trazem uma nova perspectiva sobre o estudo de virulência do gênero *Sporothrix* em modelo invertebrado, entretanto a correlação entre as duas formas morfológicas (conidial e leveduriforme) não foi histopatologicamente analisada, restando muitas dúvidas sobre a morfologia que o patógeno assume no tecido invertebrado. Abrem-se também, questionamentos sobre o desempenho das demais espécies patogênicas do gênero, que, apesar de estarem em um clado ambiental, são ocasionais patógenos do hospedeiro vertebrado e podem auxiliar na compreensão das distinções interespecíficas dentro do gênero, além de elucidar sobre sua relação evolutiva com o hospedeiro invertebrado da ordem Coleoptera.

### **1.1. Objetivo Geral**

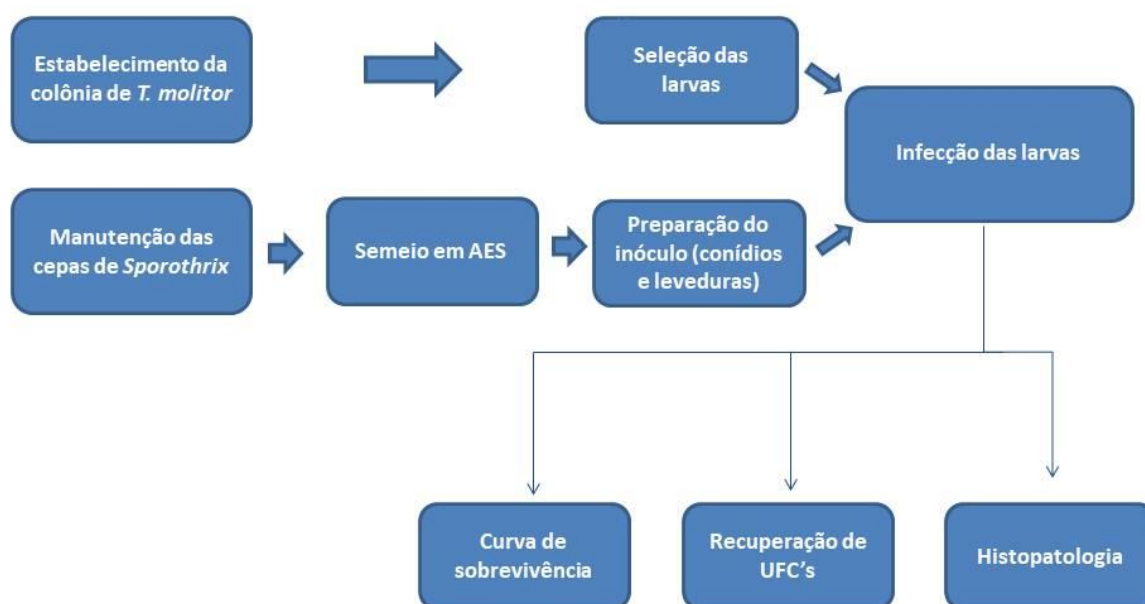
- Validar o modelo de infecção invertebrado *T. molitor* para avaliação da virulência das espécies patogênicas dos clados clínico e ambiental do gênero *Sporothrix*.

### **1.2. Objetivos específicos**

- Estabelecer e padronizar a criação de *T. molitor*.
- Padronizar o modelo invertebrado *T. molitor* para a infecção de patógenos fúngicos do gênero *Sporothrix*.
- Avaliar e comparar a virulência, pela curva de sobrevivência, em modelo invertebrado *T. molitor* infectado com as diferentes espécies do clado clínico e ambiental do gênero *Sporothrix*.
- Avaliar a virulência a partir da recuperação de colônias do modelo *T. molitor*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenho experimental da metodologia realizada neste trabalho está representado pela figura 2. Segue abaixo o detalhamento metodológico.



**Figura 2. Desenho experimental metodológico:** A partir da colônia estabelecida de *T. molitor* foram selecionadas larvas para serem infectadas com as cepas de diferentes espécies de *Sporothrix*. As cepas foram semeadas em AES a 25°C para a produção do inóculo de conídios. Após o processo de infecção, as larvas foram subdivididas para o ensaio de sobrevivência, recuperação de UFC's e histopatologia.

### 2.1. Manutenção das cepas e ensaio de termo conversão

As cepas utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Professor Dr. Anderson M. Rodrigues (UNIFESP) e pelo Professor Dr. Thales Domingos Arantes (UFG), listadas na tabela 1. As diferentes espécies são mantidas como micélio na micoteca do Laboratório de Micologia Médica e Proteômica do Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT/UFRN) em ágar Sabouraud a 25°C, e semeadas em um novo meio de cultura a cada dois meses. Para a obtenção da morfologia leveduriforme das espécies foi desempenhado o ensaio de termoconversão. Inicialmente se estabeleceu um cultivo em BHI líquido a 37°C com agitação a 100 rpm por 92 horas, após o final de cada período de incubação, 200 µl da cultura era

passado para uma placa de BHI ágar incubada a 37°C e 20 µl para um novo meio líquido que era incubado novamente em mesmas condições, criando assim, uma rotina semanal de constante avaliação da evolução morfológica dos organismos por macro e microscopia. A partir desse cenário, foram testados outros meios de cultura nutritivos não-seletivos, como ágar sangue e ágar Sabouraud, além de alternadas condições de incubação com variação da temperatura em escala entre 34°C-37°C, e distintos períodos de incubação em meio líquido e sólido.

**Tabela 1:** Informações sobre as cepas utilizadas no trabalho.

Isolado	Código CBS	Espécie	Origem	País	Referência
Ss54	CBS 132990	<i>S. brasiliensis</i>	Felino	Brasil	doi: 10.4161/viru.23112
1408	-	<i>S. schenckii</i>	-	-	-
Ss180	CBS 130104	<i>S. globosa</i>	Humano	Espanha	doi: 10.1038/emi.2014.33
Ss182	CBS 120341	<i>S. mexicana</i>	Solo	Mexico	doi: 10.1128/JCM.00808-07
Ss183	CBS 302.73	<i>S. pallida</i>	Solo	UK	doi: 10.1038/emi.2014.33
Ss187	CBS 93772	<i>S. luriei</i>	Humano	África do Sul	doi: 10.1038/emi.2014.33
Ss470	CBS 139890	<i>S. chilensis</i>	Solo	Chile	doi: 10.1016/j.funbio.2015.05.006
Sporo 17	-	<i>S. brasilliensis</i>	Felino	Brasil	-

## 2.2 Cultivo e preparação dos inóculos

Para a confecção do inóculo de conídios a partir da morfologia micelial, inicialmente foram testados cultivo em ágar extrato de solo (0,2% de dextrose w/v, 0,1% de extrato de levedura w/v, 1,5% de ágar w/v e 50% de extrato de solo w/v), ágar sabouraud e YPD (1% extrato de levedura(w/v), 2% peptona(w/v), 3% dextrose (w/v) e 2% de ágar(w/v)). As espécies foram incubadas a 25°C por sete a quatorze dias a depender da taxa de esporulação. Após o período de crescimento, cada placa teve suas células coletadas pela adição de 2 mL de salina (NaCl 0,85%) seguida de

perturbação suave da colônia com uma alça de Drigalskii estéril ou alça bacteriológica descartável, e então transferidas para um microtubo. Em seguida, as células foram centrifugadas a 6000 xg, 4 °C por 5 minutos, e lavadas três vezes com PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), repetindo assim a centrifugação ao final de cada lavagem. Para o preparo do inóculo com levedura, foi testada apenas uma cepa de *S. brasiliensis* (Sporo 17), oriunda do CCZ/Natal (Centro de controle de zoonoses) que já era mantida em tal morfologia. Primeiro foi realizado um estriamento por esgotamento da cepa em uma placa de Petri com BHI ágar, incubando por 48hrs a 37°C. Posteriormente, uma colônia da cultura foi semeada em 5ml de BHI líquido a 37°C, em agitação de 100 rpm por 16 horas (overnight). Após o período de incubação, 2ml da cultura líquida foram transferidos para um microtubo e em seguida as células foram centrifugadas a 6000 xg, 4°C por 5 minutos, sendo lavadas três vezes com PBS e se repetindo a centrifugação ao final de cada lavagem. As células conidiais e leveduriformes, após lavadas e concentradas, foram ressuspendidas com PBS. A viabilidade fúngica dos inoculo foi aferida com lactofenol azul algodão e apenas o inóculo com conídios viáveis e livre de hifas foram selecionados para o experimento. O inóculo obtido foi ajustado para a concentração celular de 2x10<sup>5</sup> células/μl com o auxílio de um hemocítômetro (Câmara de Neubauer).

### **2.3 Manutenções da colônia de *T. molitor* e infecção das larvas**

A colônia de *T. molitor* foi estabelecida em caixas de madeira, ou plástico, a temperatura ambiente (entre 25°C-29°C) na ausência de claridade incidente. Cada fase do ciclo de vida foi compartimentalizada (larva, pupa, besouro) para otimizar o desenvolvimento da colônia. Foram testadas várias composições de substrato como ração de aves a base de farelo de milho e uma ração composta por (36,36% de farelo de trigo, 18,18% de germe de trigo, 18,18% de farinha de trigo, 16,36% de aveia em flocos, 10,9% de extrato de soja e 0,04% de cloranfenicol), segundo de Souza e colaboradores, 2015.

Para o experimento, foram selecionadas as larvas adultas com peso entre 110-200 mg, sem traços de injúria ou melanização. O grupo teste foi inoculado com 5 μL de uma suspensão contendo 2x10<sup>5</sup> células/μL, utilizando uma Seringa Hamilton

(701 N, 26's gauge, 10 µL), na porção ventral da hemocele do animal, no segundo ou terceiro esternito posterior ao último par de pernas. Para cada inoculação 30 larvas eram selecionadas e divididas em grupos de 10 em placas de Petri com o substrato a 36°C. A mortalidade das larvas foi verificada em intervalos de 24hrs por 15 dias. A determinação da morte foi realizada a partir da ausência de movimento na presença de estímulo físico, junto com a presença da melanização cuticular. Além dos grupos teste, correspondentes a inoculação de cada espécie utilizada, foram utilizados dois controles não injuriados, um incubado a 25°C e outro a 36°C, além de um terceiro controle inoculado com PBS e incubado a 36°C.

#### **2.4 Recuperação de UFC's fúngicas**

Para realização da recuperação fúngica, foram infectadas 3 larvas por espécie com  $10^6$  células/5µl, e incubadas por 72hrs a 36°C. Após o período de incubação, as larvas foram lavadas com álcool 70% e em seguida com salina (0,85%), decapitadas e tiveram seu conteúdo extraído e diluído seriadamente (1:10 e 1:100) em PBS. As diluições foram semeadas em placas de Petri com Mycosel ágar e incubadas a 25°C. Durante 14 dias, qualquer crescimento micelial sugestivo macroscopicamente e confirmado microscopicamente de *Sporothrix spp.* foi contabilizado por unidade formadora de colônia.

#### **2.5 Histopatologia**

Para a histopatologia foram destinadas em média 4 larvas infectadas por espécie com  $10^6$  células/5µl, e incubadas por 72hrs a 36°C. Após o período de incubação as larvas foram decapitadas, condicionadas em formol 10% e colocadas em banho maria a 40°C por 40 minutos. Após o período de incubação, as larvas foram armazenadas em microtubos com uma nova solução de formol 10% e enviadas para a Dra. Gisleine Fernanda França (UFG), responsável pelo processamento e confecção das lâminas. O processamento foi realizado por automação e durante o processo de coloração foram realizados diferentes protocolos com Grocott, Ácido Periódico Schiff, hematoxilina e eosina.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Termoconversão micélio – levedura

Durante o ensaio de termoconversão foram testados diferentes meios de cultura não-seletivos como Ágar Sabouraud e Ágar Sangue, com alternadas condições de incubação. Dentre todas as tentativas, nenhum dos métodos otimizou a evolução da conversão morfológica, se mantendo então o protocolo citado primeiramente. Foi obtida a conversão total do *S. brasiliensis* (Ss54) e do *S. schenckii* (1408), e a conversão parcial (ainda se observava hifas e conídios juntamente com leveduras) do *S. mexicana* (Ss182), *S. pallida* (Ss183) e *S. luriei* (Ss187). A conversão do *S. globosa* (Ss180) se mostrou mais complexa e fastidiosa.

#### 3.2 Manutenção da colônia de *T. molitor*

Quanto à padronização da colônia de tenébrios, dos substratos testados, a ração a base de farelo de trigo obteve um melhor resultado na manutenção da colônia. Já relacionado à aclimatação, se observou melhores resultados (larvas mais ativas e com exoesqueleto mais ceroso) com a temperatura de 25°C. Segue na figura 3 fotos da nossa criação de tenébrio, em caixas separadas para as fases de larva, pupa e adulto.

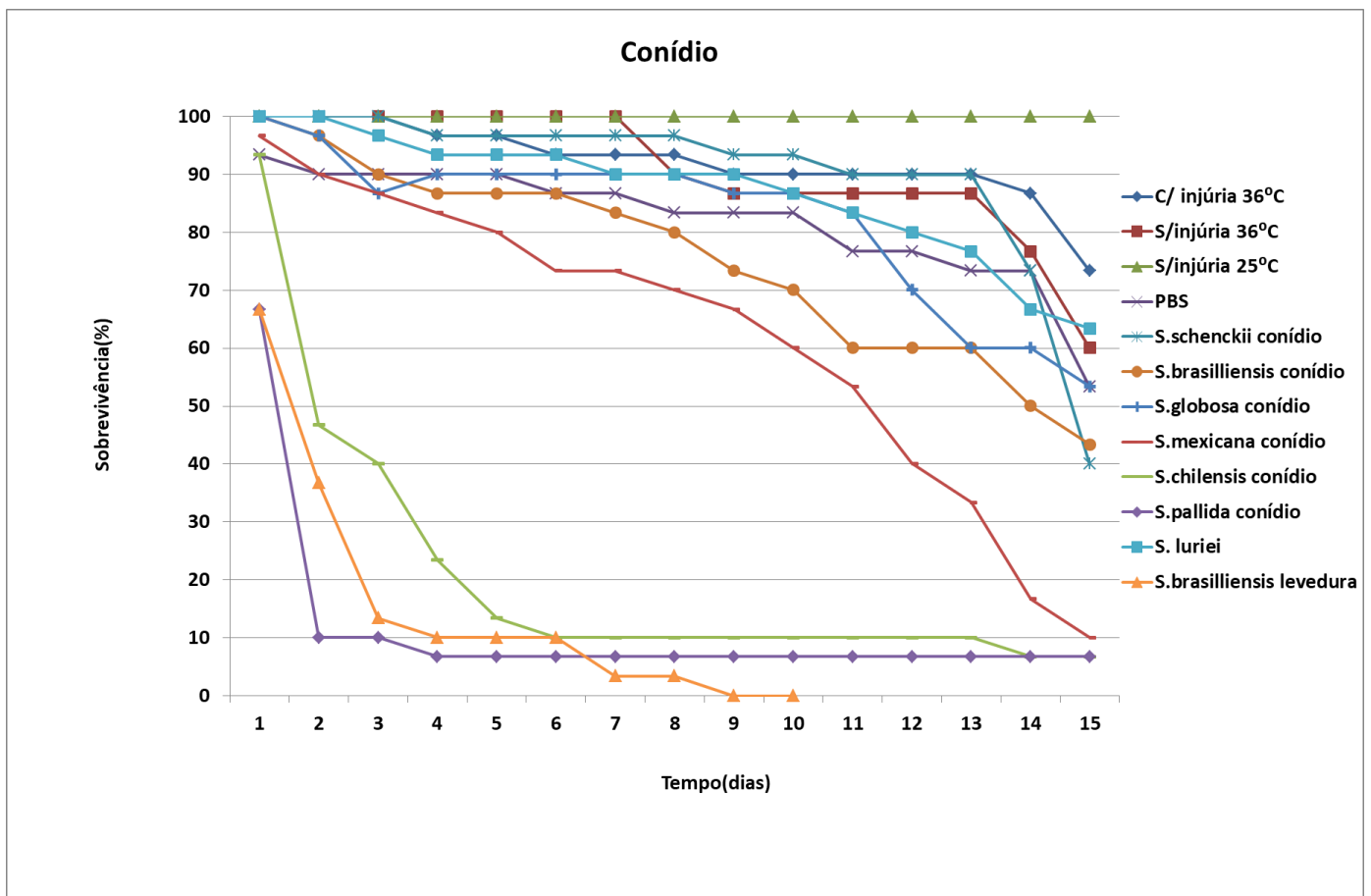


**Figura 3. Compartimentalização da colônia de *T. molitor*.** A colônia foi separada de acordo com as três fases de desenvolvimento do inseto. Da esquerda para a direita: adulto (besouro), pupa e Larva.

### 3.3 Padronização dos inóculos conidiais e curvas de sobrevivência

O cultivo dos fungos para a elaboração dos inóculos foi testado em Ágar Extrato de Solo, Ágar Sabouraud e YPD. Nos dois últimos, foi notado um crescimento mais glabro com menos conídios disponíveis para a coleta, dificultando assim a produção do inóculo. Entretanto, o ágar extrato de solo se mostrou excelente para estímulo da esporulação necessária para a produção do inóculo. Todas as espécies foram incubadas uma semana no ágar solo a 25°C, com exceção do *S. luriei* que mostrou uma taxa de esporulação reduzida, necessitando 14 dias de incubação.

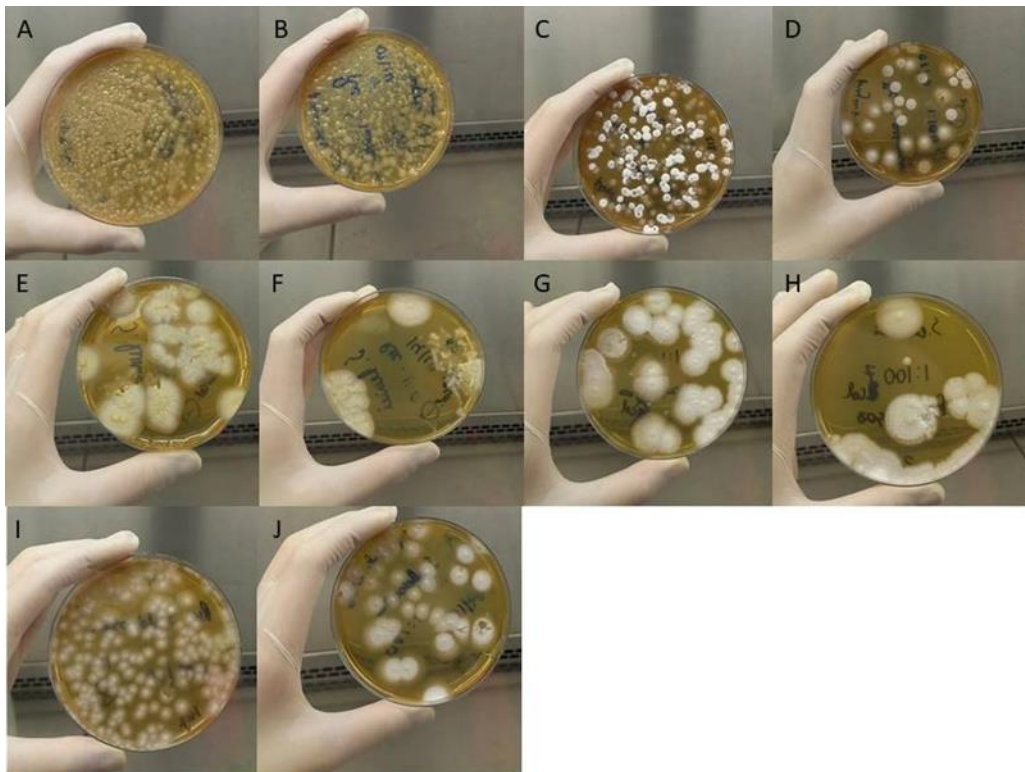
As curvas de sobrevivência das larvas infectadas com conídios das espécies clínicas *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. shenckii* foram semelhantes com o decorrer do tempo, enquanto a curva do *S. luriei*, também do clado clínico, aparentou um padrão semelhante ao do controle PBS. Em comparação às larvas infectadas com *Sporothrix* spp. do clado clínico, com exceção das infectadas com *S. luriei*, as larvas infectadas com conídios das espécies do clado ambiental, *S. mexicana*, *S. chilensis* e *S. pallida*, apresentam uma taxa de sobrevivência significativamente menor. O controle sem injúria incubado a 25°C obteve 100% de sobrevivência em 15 dias, enquanto os controles com e sem injúria incubado a 36°C obtiveram um resultado de sobrevivência inferior ao controle com injúria incubado na mesma temperatura. A única cepa inoculada na morfologia leveduriforme foi o *S. brasilliensis* (Sporo 17) que causou uma maior mortalidade do que a cepa da mesma espécie Ss54 inoculada na morfologia micelial. As curvas de sobrevivência podem ser observadas no gráfico da figura 4.



**Figura 4. Gráfico das curvas de sobrevivência obtidas a partir da infecção de diferentes espécies de *Sporothrix* spp.** No gráfico acima estão representadas as curvas de sobrevivência das lavas inoculadas PBS, com injúria incubadas a 25°C, sem injúria incubadas a 36°C e sem injúria incubadas a 25 °C. Estão representadas também as curvas de sobrevivência das larvas infectadas com conídios de *S. schenckii*, *S. brasilliensis*, *S. globosa*, *S. chilensis*, *S. luriei*, *S. pallida* e *S. mexicana*.

### 3.4 Recuperação de UFC's

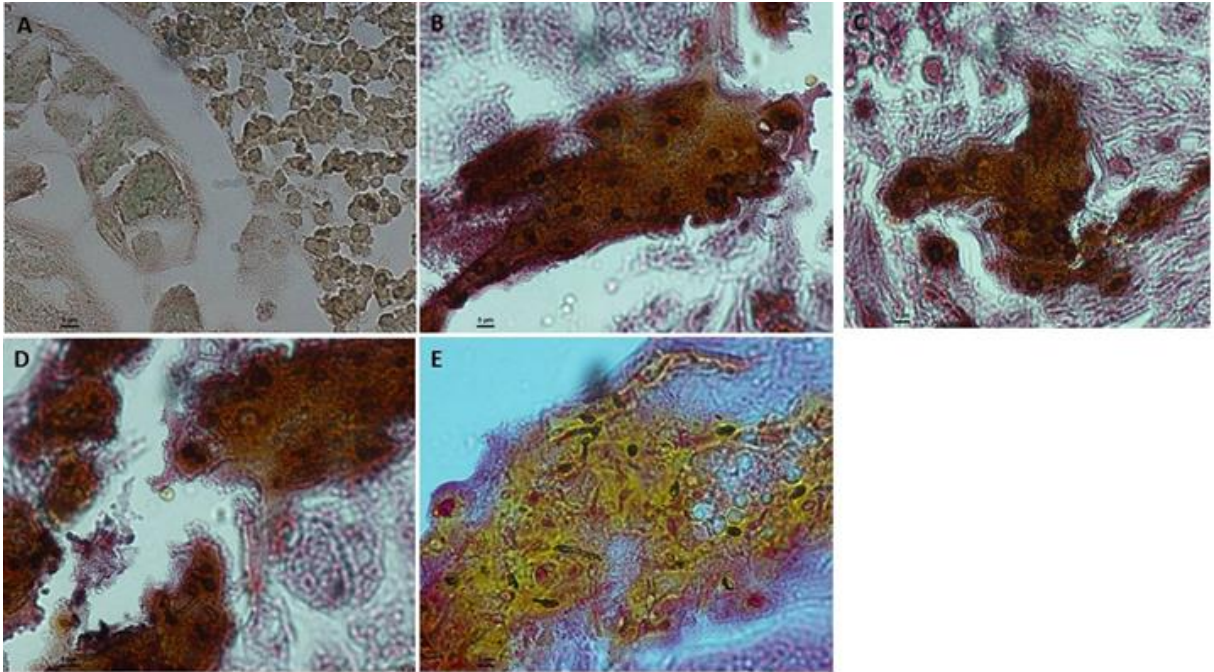
Quanto à recuperação fúngica da inoculação do *S. brasilliensis* não foi possível visualizar colônias isoladas de *Sporothrix* devido ao rápido crescimento concomitante de fungos e bactérias contaminantes. O *Sporothrix* foi recuperado em Mycosel ágar apenas das inoculações com as espécies *S.chilensis*, *S. pallida*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei* sendo observado  $6 \times 10^4$ ,  $3,8 \times 10^3$ ,  $1,3 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^2$  e  $6,7 \times 10^3$  quantidades de unidades formadoras de colônias, respectivamente (figura 5).



**Figura 5. Recuperação de UFC's.** Na imagem acima estão representadas as recuperações de colônia em Mycosel das diferentes espécies nas diluições 1:10 e 1:100, respectivamente. *S. brasiliensis* (A,B), *S.schenckii* (C,D), *S. lurieii* (E,F), *S. chilensis* (G,H) e *S. globosa* (I,J).

### 3.5 Histopatologia

Na histopatologia realizada com as colorações Grocott e PAS para as larvas infectadas com as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. chilensis* e *S. lurieii* foi possível observar regiões teciduais com presença de melanina e leveduras em brotamento dentro dessas regiões. Já na histopatologia das larvas controle, inoculadas com PBS, não foi observada nenhuma alteração morfológica significativa, nem foi detectada melanina tecidual (Figura 6).



**Figura 6. Análise microscópica dos tecidos infectados.** As larvas foram infectadas com  $10^6$  conídios/ $5\mu\text{l}$ /larva, foram incubadas por 72hrs a  $36^\circ\text{C}$  e preparadas para o processamento histológico. Na imagem está o corte histológico da larva inoculada com PBS (A), *S. schenckii* (B), *S. chilensis* (C) e *S. brasiliensis* (D) corados com Grocott. O corte histológico da larva infectada com *S. luriei* (E) foi corado com PAS. Em todas as laminas foi possível observar estruturas leveduriformes agrupadas em regiões com a presença de melanina, com exceção da lâmina que representa histologicamente o controle PBS, na qual não se observou alterações teciduais significativas.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Padronização da criação do modelo invertebrado *T. Molitor* e do preparo do inóculo fúngico

As primeiras larvas foram obtidas em janeiro de 2021 por um fornecedor direcionado à alimentação de pássaros. Inicialmente, as três fases do desenvolvimento (larva, pupa e besouro) foram criadas dentro do mesmo sistema, entretanto não havia crescimento populacional condizente com o esperado. Após essa experiência, foram compartimentalizadas as três fases, e dessa forma o crescimento populacional esperado foi atingido, pois a larva e o besouro se alimentam da pupa quando coexistentes dentro de um mesmo sistema. Mesmo com essas adaptações ainda era notável que as larvas não estavam totalmente saudáveis, o que posteriormente se mostrou atrelado a nutrição. Inicialmente, o

substrato era constituído de ração para aves a base de farinha de milho, o que não é ideal para saúde da larva, já que estudos mostram que uma alimentação a base de trigo e derivados aumenta o desenvolvimento saudável desses animais (OCHOA et al., 2019; MORALES-RAMOS et al., 2020). Logo, foi implementada uma ração, cuja receita foi cedida pela autora de um estudo pioneiro com o modelo *Tenebrio* (de Souza et al., 2015). Outro parâmetro considerado na padronização foi a temperatura com a qual as larvas foram armazenadas, aparentemente esse é um elemento chave para a saúde dos insetos. Nos meses de maior temperatura, quando iniciamos os ensaios, a temperatura ambiente variava em torno de 27°C/30°C, observamos assim uma menor motilidade e menor turgidez das larvas. Nos meses de finalização dos experimentos a temperatura estava mais amena e girava em torno dos 25 °C, o que pela literatura consiste na temperatura ideal para a sobrevivência de 100% da população, observamos assim uma maior motilidade e rigidez do corpo larval (RIBEIRO et al., 2018).

Durante as tentativas de semeio para a produção do inóculo vimos que os meios ágar Sabouraud e YPD estimulavam um crescimento glabro, e após o processo de coleta, forneciam uma menor quantidade de conídios e uma maior quantidade de hifas, prejudicando a contagem das células coletadas. Em contrapartida, o meio a base de extrato de solo aumentou a taxa de esporulação, sendo possível perceber, na lâmina de viabilidade, uma maior concentração de conídios e menor presença de hifas, contribuindo assim para melhor precisão do inóculo. Essa diferença pode estar associada à natureza saprofítica do fungo, principalmente na sua morfologia micelial, como se apresenta no ambiente, e também na menor oferta de nutrientes existentes no AES quando comparado aos demais meios citados, o que estimula uma maior esporulação. A única espécie que demandou maior tempo de incubação para se coletar a quantidade necessária de conídios foi a *S. luriei*, devido ao seu caráter mais fastidioso de crescimento, se estendendo assim a quinze dias de incubação.

Outro desafio enfrentado foi à precisão da inoculação, que por sua vez foi realizada com duas pessoas, uma segurando a larva na posição ventral e outra inoculando com a seringa. Muitas vezes, ao inocular em um ângulo mais aberto a larva paralisava o movimento ou vazava conteúdo da larva pela injúria efetuada, sendo necessário ajustar o ângulo de inoculação para aproximadamente 45°C entre

a agulha e a larva. Mesmo com o ajuste, muitas larvas são perdidas no processo, sendo necessário observar com cautela a reação de cada uma após a injúria, para garantir que esta não comprometeu a viabilidade larval.

#### **4.2 Relação patógeno x hospedeiro entre *Sporothrix* spp. E *T. Molitor*: Curvas de sobrevivência, recuperação de UFC e histopatologia**

Devido à dificuldade em converter as cepas da morfologia micelial para a morfologia leveduriforme, os ensaios de sobrevivência foram realizados com o inóculo de conídios das espécies referentes aos clados clínico e ambiental e o inóculo de levedura de apenas uma cepa de *S. brasiliensis*, a qual já se encontrava na fase leveduriforme em nosso laboratório. Curiosamente, foi possível notar que as curvas de sobrevivência das larvas infectadas com conídios das espécies ambientais *S. mexicana*, *S. chilensis* e *S. pallida* foram drasticamente inferiores as das infectadas com conídios das espécies clínicas *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, mas semelhantes à curva de sobrevivência das larvas infectadas com *S. brasiliensis* leveduriforme. Para a confirmação deste resultado, os ensaios de sobrevivência foram repetidos, em um segundo momento, a fim de se descartar a possibilidade de que a diferença entre as curvas de sobrevivência estivesse relacionada à viabilidade das larvas e não a virulência fúngica em si. Os resultados obtidos foram similares, nos mostrando uma excelente reprodutibilidade do modelo invertebrado *T. Molitor* para a avaliação da mortalidade causada por cada espécie patogênica avaliada do gênero *Sporothrix*.

Uma preocupação foi a sobrevivência das larvas inoculadas com PBS (controle inoculado, a 36°C). Este experimento controle foi repetido quinze vezes, ao longo do ano de 2021, e em nenhum ensaio se obteve a porcentagem de 100% de sobrevivência, como enfatizado pela literatura (ALLEN et al., 2012;BJORGE et al., 2018). Contudo, estudos entomológicos, mais direcionados para a fisiologia do inseto, indicam que a temperatura ideal para a obtenção de 100% de sobrevivência é a de 25°C, sendo impossível fisiologicamente para o inseto manter essa taxa de sobrevivência a 36°C, temperatura na qual os ensaios foram realizados. Para confirmar a influência das condições de temperatura na sobrevivência da larva foram feitos outros controles, simulando distintas condições. Ao comparar os controles com

e sem injúria incubados a 36°C observamos que o controle com a injúria teve uma taxa de sobrevivência insignificativamente maior do que o controle sem a injúria, indicando que a ausência da inoculação não aumenta significativamente a viabilidade larval. Por outro lado, a 25°C a taxa de 100% de sobrevivência é atingida, indicando que o fator “temperatura elevada” é decisivo. Assim, apesar deste modelo suportar a temperatura experimental de 36-37°C, não podemos dizer que não haverá perda alguma de animais durante o experimento devido a estas condições.

Quanto às curvas de sobrevivência das larvas infectadas por conídios das diferentes espécies de *Sporothrix*, esperávamos que as espécies do clado clínico (*S. schenkii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei*) fossem mais virulentas que as do clado ambiental, causando menor taxa de sobrevivência nas larvas, como já observado em modelo murino por alguns autores (FERNANDES et al., 2013; ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; ARVANITIS et al., 2013) contudo o resultado foi completamente o inverso.

Nossa primeira hipótese foi a de que apesar da temperatura na qual o ensaio foi realizado (36°C) e do estímulo do sistema imune inato da larva, as cepas clínicas poderiam não estar convertendo para levedura no inseto, e provavelmente as espécies ambientais teriam um desempenho melhor na fase micelial em relação à virulência, já que estas estão mais bem adaptadas a essa morfologia. Enquanto as espécies clínicas, provavelmente, por estarem mais adaptadas a condição de parasitismo animal, na qual os fatores de virulência estão associados a fase leveduriforme, possuiriam uma menor virulência na morfologia micelial. A única espécie em que fizemos um experimento na fase leveduriforme foi a *S. brasiliensis* (Sporo 17), considerada a mais virulenta do clado clínico, e é notória a diferença da mortalidade causada pela levedura em comparação ao micélio, como já observado anteriormente por Lozoya-Pérez ao comparar infecções causadas por ambas morfologias das espécies do clado clínico de *Sporothrix* em *Galleria mellonella*, (Lozoya-Pérez et al., 2021).

Porém esta hipótese inicial não se confirmou, uma vez que nas preparações histopatológicas das larvas infectadas com *S. schenkii*, *S. brasiliensis*, *S. chilensis*, e *S. luriei*, foi possível a visualização da morfologia leveduriforme no tecido larval, confirmando que realmente ocorreu o dimorfismo morfológico, de todas as espécies,

dentro do hospedeiro invertebrado, mesmo fenômeno que ocorre durante o parasitismo do hospedeiro mamífero.

Essa informação, redireciona a atenção para as relações evolutivas de mutualismo, parasitismo e comensalismo existentes entre algumas espécies do gênero *Sporothrix* e a ordem de besouros Coleoptera. Para a realização da histopatologia, diferentes colorações foram testadas como hematoxilina e eosina (HE), Grocott e Ácido Periódico de Schiff (PAS), sendo que a coloração de Grocott foi a que apresentou melhor resultado em evidenciar a presença das leveduras junto à melanina produzida pelo fungo. Histologicamente é possível perceber que há uma presença de melanina a volta das leveduras no tecido de todas as larvas infectadas e sua ausência nas larvas controle, inoculadas com PBS. A produção de melanina é um fator de virulência conhecido do gênero *Sporothrix* durante a infecção do modelo mamífero e ineditamente foi possível ver que há essa produção também no hospedeiro invertebrado (MORRIS-JONES et al., 2003).

Uma vez que todas as espécies inoculadas foram comprovadamente capazes de se converter para levedura no tecido da larva, a maior mortalidade causada pelas espécies ambientais passou a ser um resultado intrigante. As espécies do clado ambiental clinicamente relevantes, utilizadas neste estudo, são pertencentes ao complexo *S. pallida*, dentro do qual não há relatos de interações interespecíficas com insetos, enquanto outros complexos, dentro do clado ambiental, como *S. gossypina* e *S. stenoceras*, aparentam histórico de associação com insetos. Logo, acreditamos que as espécies do clado ambiental (*S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis*), patogênicas acidentais para mamíferos, podem apresentar perfis de virulência diferentes em insetos, desencadeando um padrão de resposta imune celular mais acentuado do que aquele usualmente produzido contra espécies fúngicas comumente associadas aos insetos da ordem Coleoptera. Para avaliar melhor a validade desta hipótese, seria interessante realizarmos os experimentos com espécies de *Sporothrix* sabidamente entomopatogênicas, mutualistas e comensais de insetos.

Já a menor mortalidade causada pela infecção das espécies do clado clínico poderia ser explicada pelo fato de se ter inoculado conídios e não diretamente a levedura. Esse resultado, já foi visto anteriormente por Lozoya-Pérez e

colaboradores, em um estudo recente, no qual foi avaliado o modelo de infecção *T. molitor* para as espécies do clado clínico *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*. Nesse trabalho, foi demonstrada a maior virulência das espécies quando inoculadas na fase leveduriforme, além de corroborar resultados já conhecidos para o modelo murino, nos quais o *S. brasiliensis* é considerada a espécie mais virulenta e o *S. globosa* a menos letal. Entretanto, os resultados obtidos com a fase micelial não destacaram diferenças significativas entre as curvas das diferentes espécies clínicas estudadas pelos autores, apenas foi vista uma menor virulência em comparação a inoculação da fase leveduriforme, convergindo com os resultados obtidos no presente trabalho. Esperamos, assim, que em nossos próximos experimentos, com a fase leveduriforme de todas as espécies este perfil da curva de sobrevivência das larvas se inverta e as espécies do clado clínico apresentem maior virulência em relação às do clado ambiental.

Além disso, do ponto de vista evolutivo, as espécies clínicas são mais próximas das espécies associadas a insetos, pertencentes aos complexos *S. gossypina* e *S. stenoceras*, do que das espécies do complexo *S. pallida* (clado ambiental). Teriam as espécies patogênicas humanas perfis de virulência semelhante às associadas a insetos e diferentes das espécies consideradas “mais saprófitas” (mais comumente associadas a solo e material vegetal)? Estudos ecológicos e de relações fungo-hospedeiro ainda são necessários para uma compreensão mais global do papel dos invertebrados e do ambiente saprofítico na evolução da virulência em fungos do gênero *Sporothrix*.

As recuperações de UFC's foram realizadas para as espécies *S. brasilliensis*, *S. schenckii*, *S. luriei*, *S. globosa* e *S. chilensis*. A espécie *S. brasilliensis* foi a mais difícil de ser recuperada, já que ocorreu a frequente contaminação da placa com crescimento bacteriano se sobrepondo as colônias fúngicas, impedindo a sua quantificação. Já as demais espécies tiveram suas colônias recuperadas a 25°C na morfologia micelial. Interessante notar que, apesar da menor curva de sobrevivência observada, a única espécie ambiental recuperada do tecido larval (*S. chilensis*), apresentou menor número de colônias recuperadas quando comparada às espécies do clado clínico, para as quais as taxas de sobrevivência larvais foram maiores. Como explicar uma baixa recuperação fúngica do isolado fúngico (*S. chilensis*) que “matou” mais larvas?. Esses dados nos direcionam para a hipótese de

que as espécies clínicas tenham uma maior facilidade para se disseminar no hospedeiro invertebrado, entretanto os mecanismos de virulência produzidos por estas não seriam tão nocivos para o modelo invertebrado *T. molitor* quanto os produzidos pelo *S. chilensis* (representante do clado ambiental). Logo, se tratando de uma espécie ambiental não muito eficiente no processo de dimorfismo, o que foi visto *in vitro* durante as tentativas de conversão, é possível associar essa menor recuperação de colônias com a pouca familiaridade da espécie ao processo de parasitismo, reduzindo sua taxa de disseminação no organismo da larva, mas aumentando a virulência da cepa, talvez pela produção de alguma toxina que, para a larva foi letal. Contudo, pouca informação se tem sobre fatores de virulência em cepas ambientais, uma vez que estas são apenas patógenos acidentais Figura 5.

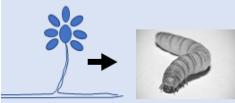

## 5. CONCLUSÃO

A compreensão da virulência das espécies patogênicas do gênero *Sporothrix* é de extrema importância para fins clínicos e terapêuticos, principalmente devido ao impacto zoonótico alcançado pela esporotricose em caráter nacional.

É notório os distintos perfis de virulência observados para os distintos clados do gênero testados. Aparentemente, quando inoculado na morfologia micelial, as espécies do clado clínico apresenta uma menor virulência, já que as curvas de sobrevivências foram maiores. Entretanto, foi possível se obter uma maior taxa de UFC's recuperadas, o que reflete numa maior facilidade de propagação do fungo no organismo invertebrado. Enquanto isso, as espécies do clado ambiental obtiveram uma maior letalidade quando inoculadas na morfologia micelial, mas em contrapartida menos UFC's foram recuperadas, o que leva a hipótese que essas espécies na morfologia micelial talvez não tenham tanta familiaridade e facilidade de propagação durante o processo de parasitismo. Histopatologicamente, em análise preliminar, foram observadas leveduras nos tecidos infectados por espécies representantes de ambos os clados, comprovando que dentro do organismo invertebrado ocorreu com sucesso o processo de dimorfismo, como observado em modelo mamífero. Experimentos adicionais, como a inoculação das espécies de ambos os clados na morfologia leveduriforme e realização da recuperação de UFC's

e histopatologia para algumas espécies ainda necessitam ser feitos para melhor discussão sobre o modelo.

A partir deste trabalho foi possível padronizar o modelo invertebrado *T. molitor* para a infecção experimental das espécies patogênicas do clado clínico e ambiental. Conclui-se que este modelo pode representar um caminho alternativo para a caracterização da virulência do gênero *Sporothrix*, embora ainda seja necessário elucidar as relações evolutivas interespecíficas entre o patógeno e ordem de besouros coleóptera a qual o inseto pertence. Nossos principais achados e hipóteses estão esquematizados na figura 7.

Morfologia inoculada	Clado clínico ( <i>S. schenkii</i> , <i>S. brasiliensis</i> , <i>S. globosa</i> , <i>S. luriei</i> )	X	Clado ambiental ( <i>S. chilensis</i> , <i>S. mexicana</i> , <i>S. pallida</i> )	Hipóteses levantadas
	↓ mortalidade de larvas ↑ recuperação de UFC ✓ Transição M – L		↑ mortalidade de larvas ↓ recuperação de UFC ✓ Transição M – L	<i>Espécies do clado ambiental teriam perfil mais saprofítico do que comensal de insetos.</i> <i>A alta mortalidade estaria mais associada à alguma toxina produzida pelos fungos ambientais do que à sua proliferação tecidual propriamente dita.</i>
	↑ mortalidade de larvas ( <i>S. brasiliensis</i> ) ? recuperação de UFC		?	<i>Uma vez inoculado em sua fase leveduriforme o fungo já estaria expressando fatores de virulência importantes para sua disseminação nos tecidos.</i> <i>? = experimentos ainda pendentes.</i>

**Figura 7. Principais hipóteses.** Hipóteses geradas a partir dos experimentos de infecção das espécies de *Sporothrix* pertencentes aos clados clínico e ambiental, em modelo experimental *Tenebrio molitor*, recuperação de UFC's e histopatologia.

## 6. REFERÊNCIAS

ALLEN, J.L., Clusella-Trullas, S., Chown, S.L., 2012. **The effects of acclimation and rates of temperature change on critical thermal limits in *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) and *Cyrtobagous salviniae* (Curculionidae)**. Journal of insect physiology, v. 58, n. 5, p. 669-678, 2012.

ALMEIDA, F.; SAMPAIO, S. A., LACAZ, C. D. S. **Statistical data on sporotrichosis; analysis of 344 cases**. An. bras. Derm. Sif., v. 30, n. 1, 1955.

ARRILLAGA-MONCRUEF, I., CAPILLA, J., MAYAYO, E., MARIMON, R., MARINÉ, M., GENÉ, 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

ARVANITIS, Marios; GLAVIS-BLOOM, Justin; MYLONAKIS, Eleftherios. **Invertebrate models of fungal infection**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, v. 1832, n. 9, p. 1378-1383, 2013.

BJORGE, J.D., Overgaard, J., Malte, H., Gianotten, N., Heckmann, L.-H. **Role of temperature on growth and metabolic rate in the tenebrionid beetles *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor***. Journal of insect physiology, v. 107, p. 89-96, 2018.

BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; de CAMARGO, Z. P.; ROZENTAL, S. **Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine**. Sabouraudia, v. 53, n. 2, p. 178-188, 2014.

BONIFAZ, A. & VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. **Diagnosis and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: what are the options?**. Current Fungal Infection Reports, v. 7, n. 3, p. 252-259, 2013.

BRITO, M. M., CONCEIÇÃO-SILVA, F., MORGADO, F. N., RAIBOLT, P. S., SCHUBACH, A., SCHUBACH, T. P., BORBA, C. M. **Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model**. Medical mycology, v. 45, n. 8, p. 721-729, 2007.

CLAVIJO-GIRALDO, D. M., MATÍNEZ-ALVAREZI, J. A., LOPES-BEZERRA, L. M., PONCE-NOYOLA, P., FRANCO, B., ALMEIDA, R. S., & MORA-MONTES, H. M. **Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*.** Journal of microbiological methods, v. 122, p. 73-77, 2016.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. **The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship.** Studies in mycology, v. 83, p. 165-191, 2016.

De HOOG, G. S.; CHATURVEDI, V.; DENNING, D. W.; DYER, P. S.; FRISVAD, J. C.; GEISER, D., ... & LACKNER, M. **Commentaries: name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice.** Journal of clinical microbiology, v. 53, n. 4, p. 1056-1062, 2015.

DE BEER, Z. W.; HARRINGTO, T. C.; VISME, H. F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. **Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras*–*Sporothrix schenckii* complex.** Mycologia, v. 95, n. 3, p. 434-441, 2003.

DE HOOG, G. S. Hyphomycetes, p 380–1007. In de Hoog GS, Guarro J.(ed), Atlas of clinical fungi. 1995.

DE SOUZA, P. C., MOREY, A. T., CASTANHEIRA, G. M., BOCATE, K. P., PANAGIO, L. A., ITO, F. A., ALMEIDA, R. S. ***Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections.** Journal of microbiological methods, v. 118, p. 182-186, 2015.

DIXON, D. M.; DUNCAN, R. A.; HURD, N. J. **Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp.*** from the largest US epidemic of sporotrichosis. Journal of clinical microbiology, v. 30, n. 4, p. 951-954, 1992.

FERNANDES, G. F., dos SANTOS, P. O., RODRIGUES, A. M., SASKI, A. A., BURGER, E., & de CAMARGO, Z. P. **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.

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, p. e1006077, 2017.

HOWARD, Dexter H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. Journal of bacteriology, v. 81, n. 3, p. 464-469, 1961.

HEKTOEN, L. & PERKINS, C. F. **Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*.** A new pathogenic fungus. The Journal of experimental medicine, v. 5, n. 1, p. 77, 1900.

LUTZ, A. & SPLENDORE, A. **On a mycosis observed in men and mice: Contribution to the knowledge of the so-called sporotrichosis.** Revista Médica de São Paulo, v. 21, p. 443-50, 1907.

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

LEÃO, A. E. de A.; SILVA JR, O.; PROENÇA, M. **Sur un cas de Sporotrichose à *Sporotrichum beurmann* observe par la premiere fois chez un mulet à Rio de Janeiro.** CR Soc Biol.(Paris), v. 116, p. 1157-1158, 1934.

LOZOYA-PÉREZ, N. E., GARCÍA-CARNEIRO, L. C., MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A., MARTÍNEZ-DUNCKER, I., MORA-MONTES, H. M. ***Tenebrio molitor* as an Alternative Model to Analyze the *Sporothrix* Species Virulence.** Infection and Drug Resistance, v. 14, p. 2059, 2021.

MACEDO, P. M.; LOPEZ-BEZERRA, L. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; ORFINO-COSTA, R. **New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients.** Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 29, n. 4, p. 719-724, 2015.

MARIO, D. A. N.; SANTOS, R. C. V.; DENATDI, L. B.; de ALMEIDA VAUCHER, R.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. **Interference of melanin in the susceptibility**

**profile of *Sporothrix* species to amphotericin B.** Revista iberoamericana de micología, v. 33, n. 1, p. 21-25, 2016.

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

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.

MORALES-RAMOS, J. A., ROJAS, M. G., KELSTRUP, H. C., & EMERY, V. **Self-selection of agricultural by-products and food ingredients by *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) and impact on food utilization and nutrient intake.** Insects, v. 11, n. 12, p. 827, 2020.

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

OLIVEIRA, M. M. E.; MAIFREDE, S. B.; RIBEIRO, M. A.; & ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. **Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, p. 936-938, 2013.

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

PAIXÃO, A. G.; GALHARDO, M. C. G.; ALMEIDA-PAES, R.; NUNES, E. P.; GONÇALVES, M. L. C.; CHEQUER, G. L.; da CRUZ LAMAS, C. **The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS.** AIDS research and therapy, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2015.

RIBEIRO, N., ABELHO, M., COSTA, R. **A review of the scientific literature for optimal conditions for mass rearing *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).** Journal of Entomological Science, v. 53, n. 4, p. 434-454, 2018.

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

RODRIGUES, A. M., de MELO TEIXEIRA, M., de HOOG, G. S., SCHUBACH, T. M. P., PEREIRA, S. A., FERNANDES, G. F., de CAMARGO, Z. P. **Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks.** PLoS neglected tropical diseases, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CÁSSIA P., D.; BRILHANTE, R. S. N.; DA COSTA SIDRIM, J. J.; GADELHA, M. F.; DE CAMARGO, Z. P. **Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis.** BMC infectious diseases, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

SANABRIA, C., HOGAN, N., MADDER, K., GILLIOTT, C., BLAKLEYI, B., REANEY, M., BUCHANAN, F. **Yellow Mealworm Larvae (*Tenebrio molitor*) Fed Mycotoxin-Contaminated Wheat—A Possible Safe, Sustainable Protein Source for Animal Feed?** Toxins, v. 11, n. 5, p. 282, 2019.

SCHENCK, B. R. **On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*.** Bull John Hopkins Hosp, v. 9, p. 286-290, 1898.

SCHUBACH, T. M. P.; VALLE A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO M. C.; MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S., ZANCOPE-OLIVEIRA R. M., et al. **Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*).** Medical mycology, v. 39, n. 1, p. 147-149, 2001.

SINGER, J. I.; & MUNCIE J. E. **Sporotrichosis; etiologic considerations and report of additional cases from New York.** New York state journal of medicine, v. 52, n. 17, 1, 1952.

TORRES, M., De COCK, H., CELIS RAMÍREZ, A. M. **In vitro or in vivo models, the next frontier for unraveling interactions between *Malassezia spp.* and hosts. How much do we know?.** Journal of Fungi, v. 6, n. 3, p. 155, 2020.

XUE, S.; GU, R.; WU, T.; ZHANG, M.; WANG, X. **Oral potassium iodide for the treatment of sporotrichosis.** Cochrane Database of Systematic Reviews, n. 4, 2009.

ZHOU, X., RODRIGUES, A. M., FENG, P.; De HOOG, G. S. **Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex.** Fungal Diversity, v. 66, n. 1, p. 153-165, 2014.