

Análise morfológica e termotolerância de isolados clínicos e do ambiente de *Sporothrix schenckii* do sul do Brasil

Morphological pattern and thermotolerance of clinical and from environment isolates of *Sporothrix schenckii* from the south of Brazil

Isabel Martins Madrid,* Rosema Santin,** Luis Filipe Damé Schuch,* Angelita Reis Gomes,* Márcia de Oliveira Nobre,*** Mário Carlos Araújo Meireles*

Resumo

A esporotricose é causada pelo fungo *Sporothrix schenckii* sendo considerada uma micose de grande importância em saúde pública. Devido às diferenças clínicas, epidemiológicas e moleculares descritas em vários estudos, este estudo avaliou as características fenotípicas e termotolerância de 36 isolados clínicos de *S. schenckii* provenientes de casos clínicos de esporotricose felina, canina e humana, quatro isolados do ambiente e duas cepas de referência. Os 42 isolados de *S. schenckii* originados de cinco cidades da região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) foram utilizados para análise fenotípica, termotolerância e conversão para a fase leveduriforme. Os cultivos em agar lactrimel, agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e agar batata a 25 e 35°C demonstraram diferenças na morfologia das colônias e na velocidade de crescimento ($p=0,026$) entre as cepas de referência e os isolados clínicos e do ambiente. Na avaliação da termotolerância, 26,2% dos isolados foram capazes de crescer a 41°C. Todos os isolados foram convertidos para a fase leveduriforme. O estudo da micromorfologia demonstrou diferenças estatísticas ($p<0,01$) entre isolados clínicos de felinos e o restante dos isolados em relação a conídios pigmentados e formas de "margaridas". Nossos resultados demonstraram diferenças morfológicas entre isolados clínicos e do ambiente de *S. schenckii* provenientes de uma mesma região e uma maior probabilidade de desenvolvimento de formas clínicas disseminadas e sistêmicas por isolados de casos clínicos de esporotricose felina devido à termotolerância.

Palavras-chave: esporotricose, fungo dimórfico, morfologia, crescimento.

Abstract

Sporothrix schenckii is the etiological agent of the sporotrichosis in animals and humans being this mycosis of great importance in public health. Due to clinical, epidemiological and molecular differences described in other studies, this study evaluated phenotypic and thermotolerance characteristics of 36 *S. schenckii* isolates from clinical cases of feline, canine and human sporotrichosis, four environmental isolates and two reference strains. Forty-two *S. schenckii* isolates from five towns of the south region of the Rio Grande do Sul, Brazil were utilized to phenotypic analyses, thermotolerance and conversion to the yeast phase. Cultured isolates on lactrimel agar, Sabouraud dextrose agar added chloramphenicol and potato dextrose agar at 25 and 35°C showed differences in the colonies morphology and growth time ($p=0,026$) among reference strains and, clinical and environmental isolates. In the thermotolerance evaluation 26.2 % isolates were capable of growth at 41°C. All isolates presented conversion to the yeast phase. Microscopic morphologies study showed statistical differences ($p<0,01$) among clinical isolates of felines and other species in relation to sessile pigmented and sympodial conidia. Our results demonstrated morphological differences among *S. schenckii* clinical and environmental isolates of a same region and an great probability of development of clinical forms disseminated and systemic by sporotrichosis feline isolates due to thermotolerance.

Keywords: Sporotrichosis, dimorphic fungus, morphology, growth.

* Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, RS, Rua Gonçalves Chaves 3435, CEP 96015-560, Pelotas-RS, Brasil; +55 53 9911.2744, Fax +55 53 3275.7644.

** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS.

*** Departamento de Clínicas Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS.

Autor para correspondência: Isabel Martins Madrid. E-mail: imadrid_rs@yahoo.com.br.

Introdução

Sporothrix schenckii é um fungo geofílico e dimórfico, encontrado na forma micelial no meio ambiente e *in vitro* em temperatura ao redor de 25°C, e na forma de levedura quando em parasitismo e *in vitro* a 37°C. Este fungo é encontrado em cascas de árvores, musgos, plantas, palha, madeira e material orgânico em decomposição, podendo permanecer por períodos prolongados nestes locais (Barros et al., 2008; Nobre et al., 2008). Possui fatores de patogenicidade como enzimas extracelulares, cepas termotolerantes, diferentes constituintes da parede celular e presença de grânulos de melanina que aumentam suas chances de sobrevivência no ambiente e no hospedeiro (Lopes-Bezerra et al., 2006; Madrid et al., 2010a).

O fungo *S. schenckii* é o agente etiológico da esporotricose em animais e humanos. Esta doença é considerada a micose subcutânea de maior ocorrência na América do Sul e com grande importância em saúde pública (Barros et al., 2008; Madrid et al., 2010b). Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos com relação a fatores de patogenicidade do *S. schenckii* visando compreender as variações clínicas e de suscetibilidade antifúngica do agente (Kong et al., 2006; Nobre et al., 2008). Assim, várias pesquisas foram realizadas comparando aspectos moleculares e virulência de isolados de *S. schenckii* em diferentes países (Dixon et al., 1991; Mesa-Arango et al., 2002; Holechek et al., 2004; Kong et al., 2006; Fernandes et al., 2009). Estes estudos demonstraram grande variabilidade genética entre isolados de uma mesma região geográfica, assim como entre regiões. Recentemente, a espécie *S. schenckii* foi dividida em três novas espécies de acordo com características morfofisiológicas e geográficas, sendo denominadas *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* (Marimon et al., 2007). Tendo em vista os diferentes achados moleculares a respeito do *S. schenckii* e a escassez de estudos morfológicos visando a comparação de isolados clínicos e do ambiente, este estudo objetivou avaliar as características fenotípicas e a termotolerância de isolados de *S. schenckii* provenientes de casos clínicos de esporotricose humana, felina e canina, e de isolados do ambiente.

Material e métodos

Foram utilizados 36 isolados de *S. schenckii* provenientes de casos clínicos de esporotricose em gatos (22), cães (7) e humanos (7), quatro isolados do ambiente e duas cepas de referência (IOC1226 e IOC1113) obtidas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) totalizando 42 isolados. Para reativação dos isolados, estes foram repicados em agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, sendo as placas incubadas a 25°C por sete dias. Posteriormente, as colônias obtidas foram subcultivadas para o estudo fenotípico e de termotolerância.

Para o estudo fenotípico, os isolados foram semeados, em duplicata, em placas de Petri contendo agar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol (SDA), agar batata (PDA) e agar lactrimel (LCA) (20g farinha de trigo, 7g mel, 20g leite em pó integral, 20g agar-agar, 1000 mL de água destilada). As placas foram incubadas a 25°C e 35°C durante 21 dias, sendo as colônias avaliadas a cada sete dias quanto à velocidade de crescimento e às características macroscó-

picas das colônias como coloração, aspecto, topografia e pigmentação. A avaliação microscópica dos isolados de *S. schenckii* foi realizada através de microcultivo em lâmina contendo PDA, incubado a 25°C por sete dias. Após a incubação foi analisada a forma e coloração dos conídios, quantificação de conídios demáceos e de formas como "margaridas" em graus + (escasso), ++ (moderado) e +++ (muito).

A conversão da fase filamentosa para leveduriforme foi realizada através da semeadura dos isolados de *S. schenckii* em infusão cérebro-coração (BHI) com incubação em estufa shaker a 37°C por sete dias, sob agitação constante de 100 ciclos/minuto. Após o período de incubação foi realizado exame direto através de esfregaço e coloração de Gram para verificar a presença de células leveduriformes. Para avaliação da termotolerância, os isolados foram subcultivados em SDA acrescido de extrato de levedura 1% e incubados a 41°C por sete dias, sendo realizado também o exame microscópico das colônias.

Os resultados foram analisados em programa Statistix 8.0, submetendo os dados de velocidade de crescimento à análise de variância totalmente casualizado e a comparação entre médias através do teste de Tukey. Os demais dados como quantidade de conídios pigmentados e presença de margaridas foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

Resultados

Os 40 isolados clínicos e do ambiente de *S. schenckii* utilizados para os estudos fenotípicos e de termotolerância pertenciam a cinco municípios da região sul do Rio Grande do Sul: Rio Grande, Pelotas, Capão do Leão, Pedro Osório e Canguçu.

O estudo da macromorfologia dos isolados de *S. schenckii* demonstrou o crescimento de colônias com diferentes colorações, topografia e textura nos meios de cultivo utilizados. Além disso, verificaram-se diferenças na velocidade de crescimento das colônias com relação à temperatura e meio de cultivo (Tabela 1). O crescimento com relação à origem dos isolados demonstrou diferença estatística entre as cepas de referência e os isolados clínicos e do ambiente ($p=0,026$), com o crescimento mais lento das cepas de referência. Com relação aos meios de cultivo, observou-se

Tabela 1: Média de crescimento de 42 isolados de *S. schenckii* a 25°C e 35°C nos diferentes meios de cultivo

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	SDA (cm)	PDA (cm)	Lactrimel (cm)
25	7	0,97	1,10	0,86
	14	1,86	2,01	1,64
	21	2,52	2,58	2,37
35	7	1,03	1,05	0,75
	14	1,56	1,72	1,40
	21	2,34	2,39	2,13

SDA: agar Sabouraud dextrose; PDA: agar batata

crescimento mais lento das colônias em agar lactrimel quando comparado ao SDA e PDA. A coloração das colônias variou de creme a marrom-escura, sendo que no agar lactrimel houve predominância de colônias marrom-escuras de textura aveludada e de topografia plana, enquanto no PDA e SDA, as colônias apresentaram colorações creme-acinzentadas ou creme-acastanhadas de textura aveludada ou membranosa e de topografia elevada ou rugosa.

O estudo da micromorfologia dos isolados demonstrou diferentes graus de pigmentação dos conídios e formas como “margarida”, sendo verificada uma relação inversa na quantidade destes. De modo geral, foram observadas hifas finas, septadas, hialinas e ramificadas com conidióforos delgados, conídios hialinos e pigmentados de formato esférico. Quando comparados os isolados provenientes de casos clínicos em felinos com os outros isolados observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,0003$) com relação à quantidade de conídios pigmentados. Isolados de felinos apresentaram grau +++ para conídios demáceos, enquanto os isolados de humanos e caninos apresentaram graus + e ++. Com relação à quantidade de formas como “margaridas” observou-se diferença estatística ($p=0,0091$) entre isolados de felinos e isolados de outras origens com nenhuma amostra de felino apresentando esta característica (Figura 1).

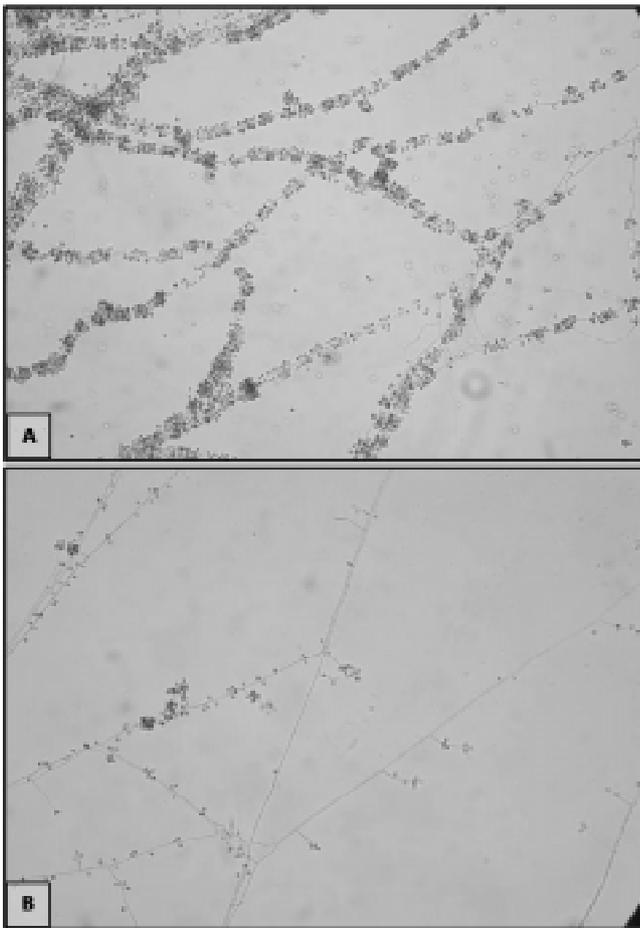


Figura 1: Numerosos conídios demáceos ao redor das hifas em isolado de *S. schenckii* proveniente de esporotricose felina (a) e presença de “margaridas” em isolado de esporotricose canina (b).

Em todos os isolados foi confirmado o dimorfismo, com a conversão da fase filamentosa para leveduriforme. Microscopicamente, as leveduras de *S. schenckii* eram caracterizadas por células ovais a alongadas com brotamento unipolar. O estudo da termotolerância demonstrou 11/42 (26,2%) dos isolados com capacidade de crescer a 41°C, dos quais seis eram isolados provenientes de felinos, dois de humanos, um de canino e dois do ambiente. Nenhuma cepa de referência cresceu nesta temperatura. As colônias apresentavam coloração creme, textura cremosa e topografia plana a rugosa. Na avaliação da relação entre presença de conídios pigmentados e termotolerância não foi observada diferença estatística, embora 54,5% dos isolados termotolerantes eram provenientes de casos de esporotricose felina.

Discussão

Os resultados da morfologia macroscópica dos 42 isolados de *S. schenckii* demonstraram diferenças na textura, topografia e coloração entre os meios de cultivo utilizados. Verificou-se que cultivos realizados em SDA e PDA apresentaram características similares como colônias creme-acinzentada ou creme-acastanhada, membranosas ou aveludadas, elevadas e rugosas similares as descritas na literatura (Mesa-Arango et al., 2002; Lopes et al., 2006). Por outro lado, o crescimento em agar lactrimel demonstrou colônias planas, aveludadas e enegrecidas. Os achados do presente estudo não foram similares aos descritos por Marimon et al. (2007), os quais observaram colônias laranja-pálida e laranja-acinzentada utilizando como meios de cultivo o agar fubá, agar batata e agar aveia.

A análise micromorfológica dos 42 isolados de *S. schenckii* demonstrou relação inversa entre grau de pigmentação de conídios e formas de “margaridas”. Assim, foi possível observar que isolados de felinos apresentaram maior grau de pigmentação dos conídios, o que está diretamente relacionado com a presença de melanina, um importante fator de patogenicidade do fungo (Almeida-Paes et al., 2009). Pesquisas *in vivo* demonstraram maior poder de invasão e disseminação tecidual de isolados pigmentados do que isolados mutante-albinos (Nobre et al., 2008; Madrid et al., 2010a). Pesquisas a respeito da melanização de isolados brasileiros de *S. schenckii* demonstraram uma maior habilidade de produção de melanina em meio mínimo e em meio L-DOPA (dihidroxifenilalanina) do que em agar Sabouraud dextrose assim como, em temperatura de 30°C do que a 37°C (Almeida-Paes et al., 2009). O fungo *S. schenckii* produz melanina DHN (dihidroxi-naftaleno) tanto na fase filamentosa quanto leveduriforme, a qual tem sido considerada um dos principais fatores de patogenicidade do fungo (Romero-Martinez et al., 2000; Morris-Jones et al., 2003; Nobre et al., 2004; Madrid et al., 2010a). Entretanto, Almeida-Paes et al. (2009) demonstraram a produção *in vitro* de melanina por isolados de *S. schenckii* a partir de compostos fenólicos, sugerindo assim, a produção de melanina DOPA.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos dados demonstrados por Mendonza et al. (2005), os quais realizaram estudo morfológico de um isolado clínico de *S. schenckii* proveniente de um caso de esporotricose humana na Venezuela, utilizando agar Sabouraud e observaram conídios ovais a alongados. Entretanto, no presente estudo

a análise micromorfológica foi realizada em PDA e com isolados clínicos de *S. schenckii* provenientes de animais, assim como isolados do ambiente. Os resultados obtidos na avaliação micromorfológica, realizada em agar batata, se assemelham ao estudo realizado por Marimon et al. (2007), embora estes autores tenham utilizado agar fubá para o estudo microscópico de 127 isolados de *S. schenckii* provenientes de diferentes países. Estes autores sugeriram três novas espécies – *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. mexicana* –, sendo que todos os isolados provenientes do Brasil demonstraram características semelhantes, como a presença de conídios sésseis globosos de coloração marrom a marrom escura, sendo denominados de *S. brasiliensis*. Dixon et al. (1991) ao avaliarem as características microscópicas de isolados clínicos e do ambiente provenientes dos Estados Unidos, observaram diferenças no arranjo, formato e tamanho dos conídios. Os achados obtidos por estes autores com relação aos isolados do ambiente são semelhantes aos obtidos no presente estudo, sendo caracterizados pela presença massiva de conídios esféricos ao redor das hifas. Além disso, os achados com relação aos isolados clínicos também foram semelhantes embora os isolados provenientes de gatos com esporotricose tenham demonstrado maior número de conídios ao redor das hifas do que formas semelhantes a “margaridas”.

Um dos principais fatores de patogenicidade do *S. schenckii* é a termotolerância, a qual está relacionada principalmente com a disseminação fúngica para outros órgãos (Know-Chung 1979; Tachibana et al., 2001). No presente estudo, 26,2% dos isolados apresentaram capacidade de crescer a 41°C, sendo 54,5% provenientes de casos clínicos de esporotricose em felinos. Esta espécie desenvolve formas clínicas mais graves do que em outras, com lesões cutâneas extensas e disseminadas (Madrid et al., 2010b). Esses resultados se assemelham aos descritos por Fernandes et al. (2009) e Mesa-Arango et al. (2002) que testaram a termotolerância a 35 e 37°C e obtiveram maior percentual de inibição do crescimento de isolados provenientes de formas cutâneas fixa de esporotricose em humanos do que em isolados de outras formas cutâneas assim como de esporotricose em animais. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo diferem das pesquisas realizadas por Marimon et al. (2007)

e Ghosh et al. (2002), os quais não obtiveram crescimento a 40°C de nenhum isolado brasileiro e indiano de *S. schenckii*. No entanto, estes autores utilizaram agar batata para avaliar o crescimento a 40°C enquanto no presente estudo, a avaliação do crescimento a 41°C foi realizada em agar Sabouraud dextrose acrescido de extrato de levedura 1%. A termotolerância do *S. schenckii* é um dos fatores que determinam o desenvolvimento de formas clínicas extracutâneas e sistêmicas. Isolados de lesões cutâneas, normalmente não são capazes de crescer em temperatura de 37°C. Entretanto, alguns isolados conseguem se multiplicar nesta temperatura, podendo desenvolver a doença na forma sistêmica ou extracutânea (Tachibana et al., 2001). Por outro lado, estudos demonstraram que isolados clínicos provenientes de casos de esporotricose linfocutânea e extracutânea foram capazes de causar a forma sistêmica da doença, sendo considerados termotolerantes (Know-Chung, 1979).

Tendo em vista as diferenças fenotípicas e de termotolerância entre isolados clínicos de esporotricose em felinos e isolados clínicos provenientes de humanos e cães observadas no presente estudo e a necessidade de realização de estudos fisiológicos e moleculares para determinação da espécie conforme descrito por Marimon et al. (2007), neste estudo não foi utilizada a nomenclatura proposta por estes autores. Dessa forma, não foi possível afirmar que os isolados do sul do Brasil utilizados podem ser classificados como *S. brasiliensis*. Além disso, a maioria dos estudos morfológicos, fisiológicos e moleculares com isolados de *S. schenckii* são provenientes de casos de esporotricose em humanos, o que difere do presente estudo que é essencialmente com isolados originados de casos clínicos de esporotricose em animais. Dessa forma, estudos moleculares estão sendo realizados com a finalidade de compreender as diferenças morfológicas observadas e relacioná-las com as formas clínicas, origem do isolado e suscetibilidade a antifúngicos e extratos vegetais.

Nossos resultados demonstraram diferenças morfológicas entre isolados clínicos e do ambiente de *S. schenckii* de uma mesma região e uma maior probabilidade de desenvolvimento de formas disseminadas e sistêmicas por isolados provenientes de casos de esporotricose felina devido à termotolerância.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo n. 550083/2009-0 pelo financiamento desta pesquisa e à Tatiane Barbosa pelo auxílio técnico.

Referências

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection*, v. 11, p. 554-562, 2009.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; WANKE, B.; LAMBERT-PASSOS, S.R. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect*, v.136, p.1192-1196, 2008.

DIXON, D.M.; SALKIN, I.F.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J.; HAINES, J.H.; KEMNA, M.E.; COLES, F.B. Isolation and Characterization of *Sporothrix schenckii* from Clinical and Environmental Sources Associated with the Largest U.S. Epidemic of Sporotrichosis. *J Clin Microbiol*, v. 29, n. 6, p. 1106-1113, 1991.

FERNANDES, G.F.; SANTOS, P.O.; AMARAL, C.C.; SASAKI, A.A.; GODOY-MARTINEZ, P.; CAMARGO, Z.P. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: a forgotten and re-emergent pathogen. *The Open Mycol J*, v. 3, p. 48-58, 2009.

- HOLECHECK, S.; CASQUERO, C.J.; ZURITA, M.S.; GUEVARA, C.J.; MONTOYA, P.Y. Variabilidad genética en cepas de *Sporothrix schenckii* aisladas en Abancay, Perú. *Rev Per Med Exper Salud Pub*, v. 21, n. 2, p. 87-91, 2004.
- GHOSH, A.; MAITY, P.K.; HEMASHETTAR, B.M.; SHARMA, V.K.; CHAKRABARTI A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses*, v. 45, p. 449-454, 2002.
- KWON-CHUNG, K.J. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. *J Infect Dis*, v. 139, p. 424-431, 1979.
- KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H.D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect*, v. 12, n. 11, p. 1077-1081, 2006.
- LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc*, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.
- MADRID I.M., MATTEI A.S., XAVIER M.O., GUIM, T.N.; FERNANDES, C.G.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes and Infection*, v. 1, p. 162-165, 2010a.
- MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; MARTINS, A.A.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Feline sporotrichosis in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses and Public Health*, v. 57, p. 151-154, 2010b.
- 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. *J Clin Microbiol*, v. 45, p. 3198-3206, 2007.
- MENDONZA, M.; HUNG, M.B.; DÍAZ, A.M.; ZAMBRANO, E.A.; DÍAZ, E.; ALBORNOZ, M.C. Growth kinetics and morphology of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. *J Mycologie Médicale*, v. 15, p. 127-135, 2005.
- MESA-ARANGO, A.C.; REYES-MONTES, M.R.; PEREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZUNIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 8, p. 3004-3011, 2002.
- MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ B.L., AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A.J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun*, v. 71, n. 7, p. 4026-4033, 2003.
- NOBRE M.O., ANTUNES T.A., MEIRELES M.C.A., FERREIRO L. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. *Acta Scient Veterin*, v. 32, n. 2, p. 119-123, 2004.
- NOBRE, M.O.; MADRID, I.M.; ANTUNES, T.A.; MARTINS, A.A.; FERNANDES, C.G.; MATTEI, A.S.; SPANAMBERG, A.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Virulence differences between albino and pigmented *Sporothrix schenckii* isolates. *J Mycologie Médicale*, v. 18, p. 191-197, 2008.
- ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun*, v. 68, n. 6, p. 3696-3703, 2000.
- TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. *Med Mycol*, v. 39, p. 295-298, 2001.