

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
MÉDICAS

**Relações interespecíficas de *Sporothrix schenckii sensu stricto* e *Sporothrix brasiliensis* com *Acanthamoeba castellanii***

**PRISCILA LEMOS TAVARES**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Lúcia Scroferneker.  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marilise Brittes Rott

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS.

Porto Alegre 2018

#### CIP - Catalogação na Publicação

TAVARES, Priscila LEMOS

Relações interespecíficas de *Sporothrix schenckii* sensu stricto e *Sporothrix brasiliensis* com *Acanthamoeba castellanii* / Priscila LEMOS TAVARES. -- 2018.

45 f.

Orientadora: MARIA LUCIA Scroferneker.

Coorientadora: Marilise Brittes Rott.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Micologia médica. 2. cocultura entre microorganismos. 3. *Acanthamoeba castellanii*, *Sporothrix schenckii* sensu stricto e *Sporothrix brasiliensis*. 4. Relações interespecíficas entre microorganismos. 5. esporotricose. I. Scroferneker, MARIA LUCIA, orient. II. Rott, Marilise Brittes, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A vida é construída nos sonhos e

concretizada no amor!”

Chico Xavier

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por permitir que tudo isto acontecesse ao longo da minha vida, por me permitir sonhar, acreditar e realizar meus sonhos. Ao programa universidade para todos (PROUNI) por me proporcionar a minha formação como biomédica. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado, permitindo que eu me dedicasse à pesquisa clínica e experimental, adquirindo, assim, inúmeros conhecimentos. Ao programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas por me dar a oportunidade de fazer mestrado no seu programa. À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Lúcia Scroferneker pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Micologia Médica, ser sua aluna e por sua disponibilidade em ensinar. A minha co-orientadora à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marilise Brittes Rott por ter me aceitado como sua co-orientada e pelos aprendizados fornecidos. À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Valente da Silva por permitir a realização do meu estágio docente em uma das suas disciplinas da graduação. Aos alunos do Laboratório de Micologia Médica, aos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental pelo companheirismo fornecido durante este período, especialmente a Carine Tavares, Audren Monteiro e a Iasmin Rios. A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de fazer parte dos seus alunos. A todos os meus familiares, que foram fundamentais para que este meu sonho se tornasse realidade, meus pais e padrinhos pelo incentivo oferecido, especialmente a minha prima Jéssica que sempre me aconselhou e vibrou com minhas vitórias. Ao Márcio que me incentivou inúmeras vezes para que eu pudesse evoluir além do que eu imaginava ter capacidade, comemorando até mesmo as minhas pequenas conquistas. À Ananda, Loraine, Kaliandra que nos momentos de desafios jamais deixaram eu desistir e me lembraram o quanto eu era capaz de superá-los. As consultoras de beleza da Mary Kay pelos incentivos e companheirismo, especialmente a unidade Triunfo e a Neimara Bittencourt. Às pessoas que passaram pela minha vida ao longo destes oito anos de carreira profissional, que me apoiaram, viveram comigo alguns dos momentos deste sonho e que hoje, mesmo distantes, vibram com a minha conquista. Aos demais amigos e amigas que participam e convivem comigo no dia a dia pela companhia, atenção, carinho, apoio, distração, por aguentarem minhas reclamações e pelo positivismo que me forneceram nos momentos de tensão durante os desafios do mestrado.

obrigada!

## RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea zoonótica de distribuição mundial, causada por espécies fúngicas do complexo *Sporothrix schenckii*. Os protozoários do gênero *Acanthamoeba* constituem um grupo amplamente distribuído no ambiente (solo, água e ar) e algumas espécies podem ser patogênicas e/ou oportunistas. Estes organismos coexistem no mesmo ambiente, podendo resultar em algumas alterações interespecíficas. O objetivo do estudo foi verificar o perfil da interação entre *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* e *A. castellanii*, através de um modelo *in vitro* de cocultivo como fator modulador de características intrínsecas de ambos microrganismos. Para isso, foram avaliados o índice de fagocitose de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* por *A. castellanii*; a viabilidade de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* após contato com *A. castellanii*; a viabilidade das amebas após contato com os fungos; e a influência de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* no processo de encistamento de *A. castellanii*. As análises indicaram que *S. schenckii* e *S. brasiliensis* sofreram eventos fagocíticos por *A. castellanii*. Os resultados não demonstraram aumento significativo da replicação fúngica na presença da ameba e nem diminuição da viabilidade amebiana em cocultura com os fungos. Porém, os resultados foram obtidos através de testes *in vitro*, sendo necessários estudos com a coinfeção *in vivo* para confirmação desta hipótese.

**Palavra-chave:** *Acanthamoeba castellanii*, *Sporothrix schenckii sensu stricto* e *Sporothrix brasiliensis*, cocultura, interação.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a worldwide zoonotic subcutaneous mycoses, caused by species of the fungal *Sporothrix schenckii* complex. The protozoa from genus *Acanthamoeba* are widely distributed in the environment (soil, water and air), and some species may be pathogenic and/or opportunistic. These organisms coexist in the same environment, which may result in some interspecific changes. The aim of our study was to verify the profile of interaction between *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* and *A. castellanii*, by an *in vitro* model of co-culture as a modulator factor of both microorganisms intrinsic characteristics. In order to do so, we evaluated the phagocytosis index of *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* by *A. castellanii*; *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* viability after contact with *A. castellanii*; amoeba viability after contact with the fungus; and the influence of *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* in encystment process of *A. castellanii*. Our analyses indicated that *S. schenckii* and *S. brasiliensis* have suffered phagocytic events by *A. castellanii*. Results also showed that there was no significant increase in fungal replication in the presence of amoebae and there was no change in the viability of amoebas in co-culture with fungi. Our results were obtained through *in vitro* assays, which make possible the absence of these results *in vivo*, so there is a need for studies with co-infection *in vivo* in order to have a thorough understanding of this relationship. Our results were obtained through *in vitro* assays, which make possible the absence of these results *in vivo*, so there is a need for studies with co-infection *in vivo* in order to have a thorough understanding of this relationship.

**Keyword:** *Acanthamoeba castellanii*, *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis*, co-culture, interaction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégias para localizar e selecionar as informações .....	10
Figura 2 - Mascroscopia de <i>Sporotrix</i> .....	13
Figura 3 – Lesões de esporotricose.....	14
Figura 4 – Marco conceitual sobre a interação entre <i>Acanthamoeba castellanii</i> , <i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i> e <i>Sporothrix brasiliensis</i> .....	18

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATCC – *American Type Culture Colection*

FLA – *Free-Living Amoebae*

PBS – *Phosphatebuffered saline*

PYG – *Glucose-yeast-peptonemedium*

PAST – *Paleontological Statistics*

TCLE – *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*

UFC - *Unidades Formadoras de Colônias*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA DA INFORMAÇÃO.....	10
2.2 COMPLEXO SPOROTHRIX.....	11
2.2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS.....	11
2.2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	11
2.2.3 MORFOLOGIA.....	12
2.2.4 ESPOROTRICOSE .....	13
2.3 ACANTHAMOEBA CASTELLANII.....	14
2.3.1 ASPECTOS HISTÓRICOS.....	15
2.3.2 MORFOLOGIA.....	16
2.4 INTERAÇÃO ENTRE OS MICRORGANISMOS .....	16
3. MARCO CONCEITUAL.....	19
4. JUSTIFICATIVA .....	20
5. OBJETIVOS .....	21
5.1. Objetivo primário .....	21
5.2. Objetivos secundários.....	21
6. MATERIAL E METODO .....	22
6.1. Microorganismos .....	22
6.2. Índice de fagocitose .....	22
6.3. Viabilidade de <i>Sporothrix schenckii</i> e <i>Sporothrix brasiliensis</i> .....	22
6.4. Determinação de viabilidade de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	23
6.5. Influência de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i> no processo de encistamento de <i>A. castellanii</i> .....	23
6.6. Análise Estatística .....	23
7. REFERÊNCIAS.....	24
8. ARTIGO.....	30
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	45
10. ANEXOS E/OU APÊNDICES.....	46



## 1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea ou crônica causada por infecção traumática pelos fungos dimórficos (Guarro et al., 1999; Barros et al., 2001; Barros et al., Schubach et al., 2004, Marimon et al., 2008) do complexo *Sporothrix schenckii* (Bonifaz, 2010) com ampla distribuição mundial, principalmente em regiões de clima tropical. A maioria dos casos descritos é proveniente da América Central e América do Sul, principalmente do México, Colômbia, Brasil e Peru, além do continente Africano (Pappas et al., 2000; Kovarik et al., 2008). Na América do Sul, a maioria dos casos ocorrem no Brasil (Lopes et al., 1999), sendo a micose subcutânea de maior incidência no estado do Rio Grande do Sul (Da Rosa et al., 2005).

Amebas de vida livre são protozoários oportunistas/patogênicos encontrados na natureza. Apresentam quatro gêneros que são capazes de causar infecção no ser humano: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia* (Riveira et al., 1987; Schuster; Visvesvara, 2004; Visvevara et al., 2007), sendo *Acanthamoeba* o gênero de maior prevalência (Nunes et al., 2014). O protista apresenta no seu ciclo de vida dois estágios: o trofozoíto vegetativo e o cisto resistente (Khan, 2006; Visvesvara et al., 2007). *Acanthamoeba* spp. alimenta-se de bactérias, leveduras e algas. Alguns microrganismos são resistentes e sobrevivem à fagocitose, podendo sobreviver após a internalização e outros conseguem se replicar dentro dos trofozoítos (Sandstrom et al., 2011; Van Waeyenberghe et al., 2014; Guimaraes et al., 2016).

Referente a relações interespecíficas entre amebas e fungos, tem-se sugerido que *A. castellanii* poderia provocar o surgimento de novas características fúngicas, podendo auxiliar a sobrevivência do fungo em hospedeiros (Steenbergen et al., 2001; Van Waeyenberghe et al., 20013). Steenbergen et al, (2001) demonstrou que amebas, como a *A. castellanii*, podem ser uma alternativa complementar aos estudos de macrófagos. Estudos relatam interações da ação entre mamíferos e macrófagos, através do *Aspergillus fumigatus* e a sua internalização pela ameba, promovendo a exocitose do fungo ou o desenvolvimento intracelular do fungo (Van Waeyenberghe et al.,2013). Nesse sentido, estudos avaliando a interação entre fungos e amebas de vida livre são relevantes, pois geram maior conhecimento das estratégias utilizadas pelos fungos no seu desenvolvimento parasítico.

Considerando a coexistência de amebas e de *Sporothrix* spp. no mesmo ambiente, este estudo teve o objetivo de analisar a interação entre *S. schenckii* e *S. brasiliensis* com *A. castellanii*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA DA INFORMAÇÃO

A estratégia de busca da informação foi direcionada à coexistência entre os fungos *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* e o protozoário *A. castellanii*, envolvendo as bases de dados da web PubMed, LILACS, SciELO, bem como livros-texto, dissertações, teses e artigos contidos em suas referências no período de 2008 a 2017, apresentadas na figura 1. Realizaram-se buscas através dos descritores “*Sporothrix* and parasite”, “*Sporothrix* and *Acanthamoeba*” utilizando filtros para língua portuguesa, inglesa e espanhola. Os artigos foram analisados pelo conteúdo do resumo e incluídos para esta revisão. Os estudos que envolviam *Sporothrix* e outros protozoários foram excluídos. Foi encontrado apenas um estudo com *S. schenckii* e *A. castellanii*.

<b>Palavras-chaves</b>	<b>Artigos Incluídos</b>
“ <i>Sporothrix</i> and parasite”	➔ 1 artigo <i>Sporothrix</i> and <i>Acanthamoeba castellanii</i>
8 artigos PUBMED parasitas	8 artigos <i>Acanthamoeba castellanii</i> e outros
“ <i>Sporothrix</i> and sporotrichosis”	➔ Artigos sobre o fungo e a patologia
879 artigos PUBMED	
136 artigos LILACS	
“ <i>Sporothrix</i> and <i>Acanthamoeba</i> ”	➔ 1 artigo <i>Sporothrix</i> and <i>Acanthamoeba castellanii</i>

**Figura 1.** Estratégias para localizar e selecionar as informações

Fonte: autora

## **2.2 COMPLEXO *Sporothrix schenckii***

### **2.2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS**

Em 1898, no Hospital John Hopkins nos Estados Unidos, foi diagnosticado o primeiro caso de esporotricose humana identificada por um fitopatologista, como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (Schenk, 1898). Pesquisadores nos Estados Unidos, em 1900, comunicaram um segundo caso e o denominaram *Sporotrichum schenckii* (Hektoen: Perkins, 1900). Na França, em 1903, o fungo foi isolado e recebeu a denominação de *Sporotrichum beurmanni*, por diferenças daqueles isolados em 1898. Só em 1910, o fungo foi definido como *Sporotrichum schenckii*. Em 1921, os fungos isolados nos Estados Unidos e na França, foram considerados idênticos, sendo denominado como *Sporothrix schenckii* em 1963 (Antunes, 2004).

Ao complexo *Sporothrix schenckii*, pertencem as espécies *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. schenckii stricto sensu*, *S. mexicana*, *S. luriei*, *S. brunneoviolacea*, *S. dimorphospora* e *S. pallida* (Antunes, 2004; De Meyer et al., 2008). Os primeiros relatos de esporotricose no Brasil foram em 1907 na cidade de São Paulo, acometendo seres humanos e ratos, sendo a fase parasitária cultivada *in vitro* (Lutz: Splendore, 1907). No Rio Grande do Sul, dois casos de esporotricose em cães foram descritos em 1964 (Londero et al., 1964).

### **2.2.2 EPIDEMIOLOGIA**

O complexo *S. schenckii* tem sido isolado do solo, água, insetos, matéria orgânica e em animais domésticos. A infecção ocorre através do contato com ferimentos com algum material contaminado com o fungo. Assim, algumas ocupações são predispostas para a infecção, tais como, o manejo rural, jardinagem, construção civil e médicos veterinários (Campbell, 1988; Lopes-Bezerra et al., 2006). Em algumas regiões, a caça a tatus, que culminam em arranhaduras e mordeduras sofridas pelo caçador também tem sido associadas à esporotricose (Alves et al., 2010). Na zona urbana, a zoonose ocorre, principalmente, pela transmissão dos felinos infectados aos seus donos, através de arranhaduras ou mordeduras (Schiappacasse et al., 1985; Fleury et al., 2001).

A esporotricose tem sido identificada nos cinco continentes, a maioria dos casos existentes na literatura são provenientes da América Central e América do Sul principalmente no México, Colômbia, Brasil e Peru, além do continente Africano (Pappas et al., 2000; Kovarik et al., 2008; Lopes-Bezerra et al., 2018). A esporotricose não é uma doença de notificação compulsória, desta forma na maioria dos países, os dados de incidência são gerados pelas publicações de casos clínicos (Barros et al., 2011). No Brasil possuímos vários casos clínicos descritos na literatura (Da Rosa et al., 2005).

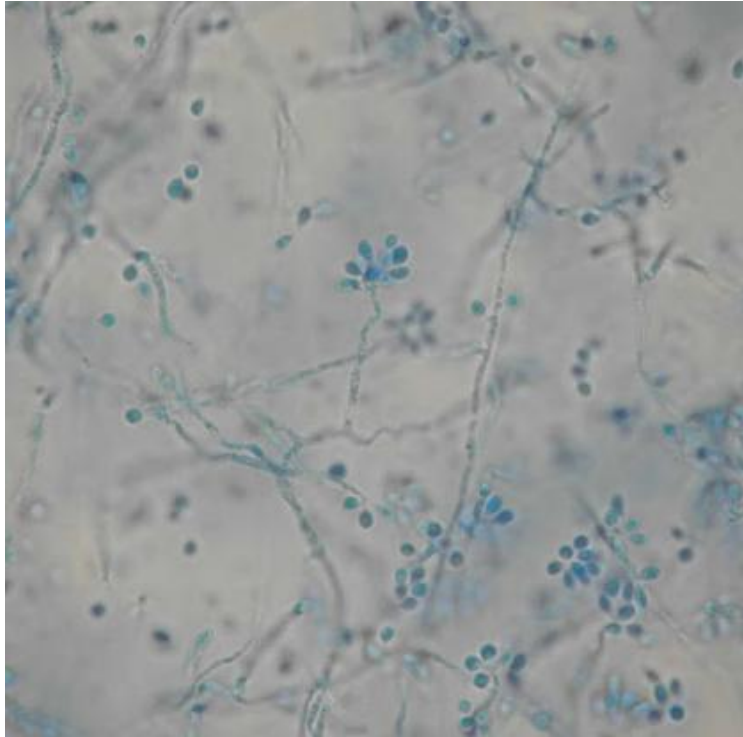
No Brasil o perfil epidemiológico de casos da esporotricose tem se modificado ao passar dos anos e a emergência de uma epidemia na zona urbana do estado do Rio de Janeiro comprova essa dinâmica (Silva et al., 2012). No Rio de Janeiro os primeiros relatos da zoonose ocorreram em 1982 (Sperling, 1982). No Rio Grande do sul, ROSA *et al.*, 2005 realizaram uma análise em casos provenientes do hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre de 1967 a 2002 mencionando 304 casos. A esporotricose no Rio Grande do Sul continua sendo a micose subcutânea mais prevalente no ser humano (Madrid et al., 2012). Atualmente ocorre uma epidemia de transmissão de casos de esporotricose sendo transmitidas de felinos para humanos no Rio de Janeiro (Boechat et al., 2018).

### **2.2.3 MORFOLOGIA**

As espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii* apresentam-se em duas fases, a fase saprofítica, quando cultivada a 25°C, apresenta-se em forma filamentosa, com hifas hialinas septadas, ramificadas e com conídios unicelulares (hialinos a demáceos) e a fase leveduriforme (parasitária) quando o fungo é cultivado a 37°C. Os conídios hialinos são ovoides e pequenos, já os conídios demáceos são ovoides e grandes com parede celular espessa (Chandler et al., 1980; Lacaz et al., 2002; Ramos-e-Silva et al., 2007). Figura 2 ilustra a morfologia de *Sporothrix schenckii*.

Macroscopicamente as colônias da fase saprofítica apresentam-se na fase inicial com a coloração branca e progressivamente após a formação de conídios, a coloração muda, indo de marrom a negra. As colônias da fase parasitária são beges amareladas e com aspecto cremoso (Chandler et al., 1980; Lopez-bezerra et al., 2006; Madrid et al., 2010). Vale ressaltar que *Sporothrix schenckii* possui grânulos de melanina que

auxiliam em sua sobrevivência no hospedeiro e no meio ambiente, além de fatores que aumentam sua patogenicidade como amostras resistentes à temperatura, enzimas extracelulares e diferentes constituintes da parede celular (Resende et al., 2001; Barros et al., 2010).



**Figura 2.** Morfologia do complexo *Sporotrix schenckii*.

Fonte: autora

#### **2.2.4 ESPOROTRICOSE**

A esporotricose é uma infecção benigna na pele e/ou no tecido subcutâneo, com a possibilidade de se espalhar para ossos e órgãos. As formas das manifestações clínicas em humanos associam-se com a via de infecção e estado imunológico do paciente (Torres-Rodriguez *et al.*, 1993). Em alguns casos, a patologia inicia-se de forma sistêmica, originando-se no sistema pulmonar. A forma cutânea disseminada e extracutânea é a menos frequente na população, mas tem acometido pacientes imunocomprometidos (Howell: Toohey, 1998; Carvalho et al., 2002; Zaitz *et al.*,

2010). A esporotricose é uma doença curável na dependência da extensão da lesão e do tempo decorrido desde sua aquisição. As formas mais raras são as viscerais com uma evolução rápida e que podem levar a óbito (Esteves *et al.*,1990).

A figura 3 ilustra um caso de esporotricose linfocutânea, ocasionada pelo *S. shenkii stricto sensu*, sendo a forma clínica mais comum da doença, acometendo cerca de 90% dos casos de esporotricose (Madrid *et al.*, 2012; Lopes-Bezerra *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Lesões de esporotricose, contendo nódulo seguindo o trajeto linfático ascendente (A) com placa verrucosa na mão direita, local inicial da infecção (B) (Vettorato *et al.*, 2018).

Atualmente o tratamento para esporotricose é limitado. Alguns medicamentos são utilizados para o tratamento da esporotricose, incluindo iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina, fluconazol e anfotericina B. A escolha do fármaco é baseada na condição clínica do paciente, nas lesões cutâneas, nas interações medicamentosas, nos eventos adversos, e se há a presença de envolvimento sistêmico (Kohler *et al.*, 2004).

### **2.3 *Acanthamoeba castellanii***

*Acanthamoeba castellanii* é um protozoário pertencente ao grupo das amebas de vida livre. É um organismo cosmopolita encontrados no meio ambiente (solo, ar e água) e como comensal na orofaringe de humanos. Possuem comportamento anfizóico devido sua sobrevivência tanto como parasita em humanos e animais domésticos, quanto em vida livre (Larkin *et al.*, 1990; Walochnik *et al.*, 2002; Khan, 2003; Schuster e Visvesvara, 2004). Este gênero amebiano tem despertado interesse devido à possibilidade de causar infecções graves (Chan *et al.*, 2011). *Acanthamoeba* spp. causa duas importantes patologias, sendo a de maior prevalência a ceratite amebiana (CA), infectando indivíduos imunocompetentes e a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), acometendo principalmente indivíduos imunossupressos (Trabelsi *et al.*, 2012).

*Acanthamoeba* spp. consomem preferencialmente microrganismos ambientais (Aksozek, *et al.*, 2002) dependente de expressão de enzimas hidrolíticas amebianas, tais como proteases, fosfolipases, lipases e DNases (Casadevall, 2008). Além disso, alguns microrganismos evoluíram para resistir à destruição por amebas de vida livre utilizando a capacidade de escapar da fagocitose e desenvolver-se no ambiente, ou sobreviver e multiplicar-se após a fagocitose no interior da ameba, mesmo após o encistamento da forma trofozoítica (Thomas *et al.*, 2010). Assim, há a proliferação de microrganismos no meio ambiente devido a essa interação, ocasionando uma possível resistência do patógeno, podendo aumentar infecções em hospedeiros que estejam expostos.

#### **2.3.1 ASPECTOS HISTÓRICOS**

Os primeiros relatos sobre *Acanthamoeba* de que se tem conhecimento datam de 1913 quando uma ameba nomeada *Amoebae polyphagus* foi isolada da poeira. Esta ameba foi renomeada em 1930 por Castellani através de um contaminante de leveduras, *Acanthamoeba Castellanii*. Em 1958, durante estudos para produção da vacina de poliomielite, houve o surgimento de um contaminante nas placas de cultivo celular, posteriormente identificados como cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* (Culbertson *et al.*, 1958). Em 1971 ratos e macacos foram inoculados com esta ameba tendo sido constatada sua patogenicidade uma vez que os animais morreram de encefalite (Culbertson *et al.*, 1958).

No ano de 1972, foi registrado o primeiro caso humano de EAG por *Acanthamoeba*, caracterizado como infecção oportunista devido a saúde debilitada do

paciente. Em 1974, foi diagnosticado o primeiro caso de ceratite humana por *Acanthamoeba* no Reino Unido (Naginton *et al.*, 1974). Diversos casos têm sido descritos no mundo, com estimativa de 200 casos de encefalite e 3000 de ceratite por *Acanthamoeba* (Yoder *et al.*, 2012).

### **2.3.2 MORFOLOGIA**

Os protozoários do gênero *Acanthamoeba* spp., durante seu ciclo de vida, podem apresentar-se sob duas formas: a trofozoítica e a cística (Riveira *et al.*, 1987; Walochnik *et al.*, 2002).

A forma trofozoítica é a de locomoção, reprodução e alimentação da ameba que no meio ambiente alimentam-se de algas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras através da fagocitose. A ameba durante a fase cística resiste a condições ambientais, como mudanças extremas de temperatura e alguns agentes físicos, químicos e antimicrobianos (Aksozec *et al.*, 2002; Khan, 2006). A forma cística da ameba pode apresentar-se viável e com sua patogenicidade conservada no ambiente por um longo período de tempo (Mazur *et al.*, 1995; Khan, 2006). Os cistos de *Acanthamoeba* spp. apresentam formas distintas: estrelado, poligonal e arredondado (Pussard e Pons 1977).

### **2.4 INTERAÇÃO ENTRE OS MICRORGANISMOS**

Amebas de vida livre não necessitam obrigatoriamente de um hospedeiro específico para sobrevivência (Casadevall, 2006). A falta de exigência de hospedeiro levanta questões fundamentais quanto à origem da virulência e da patogenicidade das FLA (Mylonakis *et al.*, 2007; Casadevall e Pirofski, 2007) devido à grande diversidade de inter-relações entre amebas e microrganismos do solo, como fungos, bactérias ou vírus, sugerindo a existência de mecanismos distintos onde a virulência pode selecionar a interação entre os associados (Casadevall e Pirofski, 2001, Marciano-Cabral e Cabral, 2003, Casadevall, 2006, Casadevall, 2008).

Relações interespecíficas entre as AVL e fungos, demonstram o surgimento de características fúngicas, que poderiam promover a sua sobrevivência em mamíferos. Estudos com fungos sugerem que a virulência fúngica sofreu alterações por pressões seletivas do meio amebiano e do meio ambiente (Steenbergen, *et al.*, 2001, Greub: Raoult, 2004; Schmitz-Esser *et al.*, 2008).

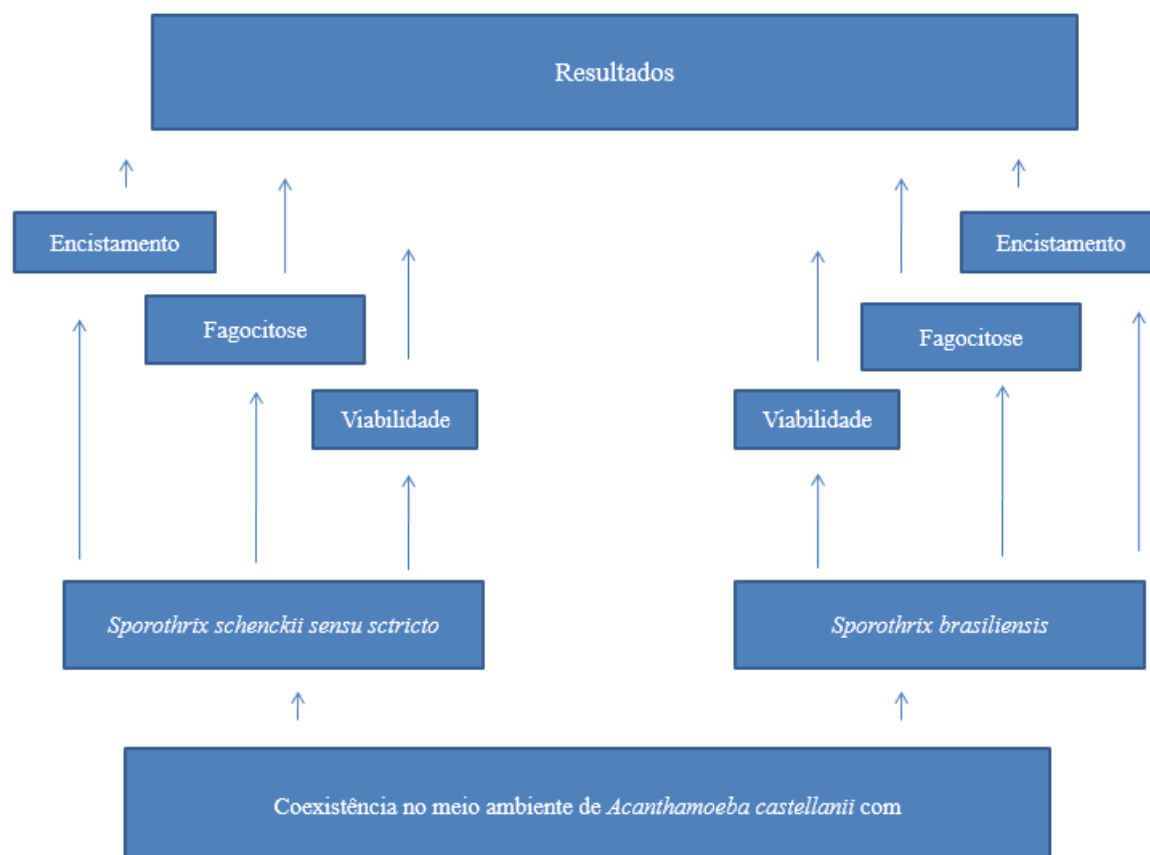


A transição de leveduras a hifas em fungos dimórficos pode ser estimulada pela ameba em temperaturas anormais. A transição de hifas para levedura está associada à virulência em diversos fungos dimórficos e ocorre de forma normal quando a temperatura é alterada do ambiente (25°C) ao hospedeiro mamífero (37°C). Dessa forma, a indução pelas AVL à formação de hifas em temperatura ambiente, implica que essa nova característica pode ser consequência da seleção ambiental, como um mecanismo anti predação, como observado em estudo com *Cryptococcus neoformans* (Steenbergen et al. 2004).

Van Waeyenberghe et al. (2013) descreveram que *A. castellanii* internaliza conídios de *Aspergillus fumigatus*, resultando na germinação intracelular do fungo ou na exocitose de conídios, sendo essa interação muito semelhante com a que ocorre entre *A. fumigatus* e macrófagos de mamíferos e de aves. Assim, as AVL comportam-se como intermediários do mundo microbiano, por abrigar e transportar microrganismos para dentro do animal protegendo-os do sistema imune do hospedeiro. Além disso, diversos estudos têm demonstrado a capacidade das AVL na seleção de características de virulência, além de contribuir na adaptação dos microrganismos aos macrófagos (Greub: Raoult, 2004; Siddiqui: Khan, 2012).

### 3. MARCO CONCEITUAL

*Acanthamoeba castellanii*, *Sporothrix schenckii sensu stricto* e *Sporothrix brasiliensis* podem coexistir no meio ambiente, acarretando relações interespecíficas entre os mesmos, que poderão influenciar na fagocitose e encistamento amebianos e na viabilidade dos microrganismos participantes da relação após o cocultivo *in vitro*.



**Figura 4.** Marco conceitual sobre a interação entre *Acanthamoeba castellanii*, *Sporothrix schenckii sensu stricto* e *Sporothrix brasiliensis*.

Fonte: autora

#### **4. JUSTIFICATIVA**

O desenvolvimento do projeto justifica-se pelo fato da interação entre *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis* e *A. castellanii* não ter sido ainda elucidada. Sabe-se que este protozoário interage com outros microrganismos de modo a interferir em sua sobrevivência, como já verificado para outros fungos permitindo a sua transmissão para hospedeiros suscetíveis, além de serem capazes de aumentar sua virulência.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo primário**

Investigar as relações interespecíficas entre *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis* e *A. castellanii* utilizando um modelo de cocultura.

### **5.2. Objetivos secundários**

- Avaliar a internalização de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* por *A. castellanii*
- Observar a viabilidade *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* após o contato com *A. castellanii*;
- Determinar a viabilidade de *A. castellanii* após contato com células de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* vivas ou inativadas e sobrenadantes da cultura de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis*.
- Avaliar a influência de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* no processo de encistamento de *A. castellanii*.

## 6. MATERIAL E MÉTODO

### 6.1. Microorganismos

A cepa de *A. castellanii* Neef (ATCC 30010) foi mantida em meio PYG (2% de protease peptona, 0,2% de extrato de levedo e 1,8% de glicose) em garrafas de cultivo (25cm<sup>2</sup>), à temperatura de 30°C. A contagem de células ( $1 \times 10^5$  células/mL) foi realizada usando câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal e a viabilidade avaliada por meio do corante de exclusão azul de tripan (0,3%). Amostras clínicas de *S. schenckii* (ATCC 201679) e de *S. brasiliensis* (ATCC 201681), foram cultivadas em meio Ágar batata, para a indução da formação de conídios, por 7 dias a 25°C, após, foi realizada uma suspensão de esporos ( $1 \times 10^5$  células/mL) da amostra, quantificada em câmara de Neubauer.

### 6.2. Índice de Fagocitose

A avaliação da internalização dos conídios pela ameba foram determinadas através do índice de fagocitose em quatro intervalos de tempo (2, 4, 6 e 8h). Os trofozoítos foram semeados em microplacas de 96 poços em PBS e incubados por 2h a 30°C, para aclimação e a aderência de *A. castellanii* na placa. Os conídios de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* foram adicionados aos poços, na proporção de 1:1 ( $1 \times 10^5$  células/mL). Após 2, 4, 6 e 8h de incubação, a cocultura foi ressuspendida, e o número amebas contado em câmara de Fuchs-Rosenthal. Três poços do cocultivo de *Acanthamoeba* com as diferentes espécies de *Sporothrix* foram usados para determinar o índice de fagocitose, definido como o número de amebas com conídios internalizados em razão do total de amebas. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidas três vezes.

### 6.3. Viabilidade de *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis*

100µL de uma suspensão ( $1 \times 10^5$  células/mL) de amebas em PBS foi colocada em microplaca de 96 poços e incubada a 30°C por 2h. Foram adicionados 100µL de suspensões  $1 \times 10^5$  de conídios (*S. schenckii* e *S. brasiliensis*) aos poços com as amebas e o cocultivo foi analisado por 24, 48, 72 e 96h. Como controle, os conídios foram incubados em PBS. A cada intervalo de tempo, a contagem fúngica foi realizada

diluindo-se cada uma das amostras e inoculando-se em placas de ágar saboraud dextrose por 48h à 30°C para contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs).

#### **6.4. Determinação de viabilidade de *Acanthamoeba castellanii***

100 µL da suspensão amebiana em PYG ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram semeados em microplaca de 96 poços e as amebas foram mantidas a 30°C por 2h. Após foram lavadas 2x com PBS. Foram adicionados separadamente aos poços: 100 µL de PBS como controle, 100 µL conídios de *S. schenckii* (vivos e inativados), 100 µL de *S. brasiliensis* (vivos e inativados), 100 µL do sobrenadante da cultura do fungo e incubados à 30°C por 24, 48, 72, 96h. Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos três vezes. Os conídios utilizados foram inativados por aquecimento (60°C por 3h) e o sobrenadante da cultura fúngica foram obtido a partir de uma suspensão dos fungos em PBS ( $1 \times 10^5$  células/mL) incubados por 72h a 30°C, em seguida a suspensão foi centrifugada à 600 x g por 10 min e filtrada em membrana de 0,22µm. A viabilidade amebiana foi determinada em câmara de Fuchs-Rosenthal utilizando-se o corante vital azul de tripan 0,3%.

#### **6.5. Influência de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* no processo de encistamento de *A. castellanii***

Em uma placa de 96 poços foram colocados 100 µL de uma suspensão  $10^5$  células mL<sup>-1</sup> de trofozoítos de *A. castellanii*. Após 30 min foram adicionados, em poços separados, 100 µL de suspensões de conídios ( $1 \times 10^5$  células/mL) de *S. Schenckii* e *S. brasiliensis* e incubados a 30°C por 96h. Como controle, foram usadas amebas em tampão PBS. Após a incubação, o número de trofozoítos e cistos foram determinados em câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal. Os dados foram expressos como percentagem de encistamento, isto é, o número de cistos em razão do número total de amebas.

#### **6.6. Análise estatística**

Os dados foram analisados usando-se o programa *PAST (verson 3.21)* usando a significância estatística definida de  $p < 0,05$ . Na determinação do índice de fagocitose foram utilizados o teste *ANOVA* de uma via, seguido do teste de *Tukey*. A diferença entre as medidas de viabilidade amebiana e fúngica foram analisadas pela análise da

variância (*ANOVA*) de duas vias, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*. A análise do processo de encistamento das amebas foi realizada através do *teste t* de *Student*.

## 7. REFERÊNCIAS

- Aksozek A, McClellan K, Howard K., Niederkorn JY, Alizadeh H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol* 2002;88(3):621–623.
- Alves SH, Boettcher CS, Oliveira DC, Tronco-Alves GR, Sgaria MA, Thadeu P, Oliveira LT, Santurio JM. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;43(5):523–525.
- Antunes T. 2004. **Efeito do itraconazol e da terbinafina no tratamento da esporotricose cutânea experimental** [Dissertação]. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul.
- Barros MBL, Schubach TMP, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, Lazerá MS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Marzochi KBF, Wanke B, Valle ACF. Sporotrichosis: na emergente zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2001;96(6):777-779.2001.
- Barros MBL, Schubach AO, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach, TMP, Reis RS, Wanke B, Marzochi KBF, Conceição MJ. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. *Clin Infect Dis* 2004;38(4):529-535.
- Barros MBL, Schubach TMP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach AO. Esporotricose: A evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev. Panam Salud Publica* 2010;27(6):4554-4560.
- Barros MBL, Paes RA, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev* 2011;24(4):633–654.
- Boechat JS, et al. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(3):185-196.
- Bonifaz A. 2010. **Esporotricosis**. En: *Micología médica básica*. 3ª ed. Ciudad de México: McGraw-Hill, p:179-196.
- Campbell I. Esporotricose. IN: Zaitz D, editor. *Compêndio de micologia médica*. Editora Médica Científica 1988;123-137.



- Carvalho MT, De Castro AP, Baby C, Werner B, Filus Neto J, Queiroz-Telles F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(6):655–659.
- Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 2001;184(3):337–344.
- Casadevall, A. Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbe* 2006;1(8):359-364.
- Casadevall, A. Evolution of intracellular pathogens. *Annu. Rev. Microbiol* 2008;62:19–33.
- Chan L, Mak J, Low Y, Koh T, Ithoi I, Mohamed SM. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica* 2011;117(1):23–30.
- Chandler FW, Kaplan W, Ajello LA. 1980. **Colour Atlas and Textbook of Histopathology of ycotic Diseases**. Wolfe Medical Publications Ltda. p.112-115.
- Culbertson CG, Smith JW, Minner H. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science* 1958;127(3313):1506.
- Da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005;52:451-459.
- De Meyer EM, De Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM, De Hoog GS, Vismer HF, Wingfield MJ. Taxonomy and phylogeny of new wood and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 2008;100(4):647–661.
- Esteves JA, Cabrita JD, Nobre GN. 1990. **Micologia Médica**. 2<sup>a</sup> ed. Lisboa: Fundação Caloute Gulbenkian, p.1058.
- Fleury RN, Taborda PR, Gupta AK, Fujita MS, Rosa PS, Weckwerth AC, Negrão MS, Bastazini I. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo. *Brazil. Int J Dermatol* 2001;40(5)318-322.
- Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol* 2004;17(2):413-433.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol* 1999,12(3):454-500.

- Hektoen L, Perkins CF. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *J Exp Med* 1900;5(1):77– 89.
- Howell SJ, Toohey JS. Sporotrichal arthritis in south central Kansas. *Clin Orthop* 1998;346(1):207-214.
- Khan NA. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathog* 2003 v.34(6):277-285.
- Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30(4):564–595.
- Kohler LM, Hamdan JS, Ferrari TCA. Successful treatment of a disseminated *Sporothrix schenckii* infection and *in vitro* analysis for antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58(1):117–120.
- Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol*, 2008;46(1):53-56.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacarri EM, Takahashi de Melo N. 2002. **Tratado de Micologia médica**. Prefácio: Bertrand Dupont. Sarvier. p. 233- 247.
- Larkin DFP, Kilvington S, Dart JKG. Treatment of *Acanthamoeba keratitis* with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmol* 1992;99(2):185–191.
- Londero AT, Castro RM, Fischman O. Two cases of sporotrichosis in dog in Brazil. *Sabouraudia* 1964;3(4):273-274.
- Lopes JO, Alves SH, Mari CR, Brum LM, Westphalen JB, Altermann MJ, Prates FB. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32(5):541-545.
- Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Acad Bras Cienc* 2006;78(2)293-308.
- Lopes-Bezerra LM, et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Medical Mycology*. 2018;56(S1):126–143.
- Lutz A, Splendore A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. *Rev Med São Paulo* 1907;21:433–450.
- Madrid IM, Matttei AS, Xavier MO, Guim TN, Fernandes CG, Nobre MO, Meireles MCA. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes and Infection* 2010;12(2):162-165.

Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Nobre MO, Meireles MC. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Mycopathologia* 2012;173(4):265-273.

Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba spp.* as Agents of Disease in Humans. *Clin Microbiol* 2003;16(2):273–307.

Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol* 2008;46(6):621-625.

Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog* 2007;3(7):101.

Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974;28(7896):1537–1540.

Nunes TET. 2014. Interação entre *Acanthamoeba castellanii* e *Fusarium solani*: um possível problema no contexto da ceratite. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, RS.

Pappas PG, Tellez I, Deep AE, Nolasco D, Holgado W, Bustamante B. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. *Clin. Infect. Dis.* 2000;30:65-70.

Pussard M, Pons, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 1977;13(4):557-598.

Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol* 2007;25(2)181-187.

Read SI, Sperling LC. Feline sporotrichosis transmission to man. *Archives of Dermatology* 1982;188(6):429-31.

Resende PP, Franco AV. Esporotricose Cutâneo-linfática. *Caderno Brasileiro de Medicina* 2001;21(1, 2, 3).

Rivera F, Roy-Ocotla G, Rosas I, Ramirez E, Bonilla P, Lares F. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ Res* 1987;42(1):149-154.

Sandström G, Saeed A, Abd H. *Acanthamoeba*-bacteria: a model to study host interaction with human pathogens. *Curr. Drug Targets* 2011;12(7):936–941.

Schenck BR. On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1898;93:286-90.

Schiappacasse RH, Colville, JM, Wong PK, Markowitz A. Sporotrichosis associated with an infected cat, *Cutis* 1985;35(3):268-270.

Schmitz-Esser S, Toenshoff ER, Haider S, Heinz E, Hoenninger VM, Wagner M, Horn M. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *Acanthamoeba* isolates. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(18):5822–5831.

Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004;34(9):1001-1027. 2004.

Siddiqui R, Khan NA. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? *Experimental Parasitology* 2012;130(2):95- 97.

Silva TBM, Costa MMM, Torres SCC, Galhardo GCM, Valle SCA, Magalhaes FMMV, Sabroza CP, Oliveira MR. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2012;28(10):1867-1880.

SILVA-VERGARA, M.L.; MANEIRA, F.R.Z.; OLIVEIRA, R.M.; SANTOS, C.T.B.; ETCHEBEHERE, M.; ADAD, S.J. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. **Med Mycol**, v.43, n.2, p.187-90, 2005.

Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001;98(26):15245–15250.

Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. 2004. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 2004;72(6):3478-3488.

Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews* 2010;34(3):231-259.

Torres-Rodríguez JM, Palácio-Hernanz A, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M. 1993. Esporotricosis. **Micología Médica**, Barcelona, Marron S.A., Cap. 16, p.157-66.

Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathologic Biologie* 2012;60(6):399-405.

Van Waeyenberghe L, Bare J, Pasmans F, Claeys M, Bert W, Haesebrouck F, Houf K, Martel A. Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii*

parallels macrophage-fungus interactions. *Environmental Microbiology Reports* 2013;5(6):819–824.

Vettorato R, Heidrich D, Fraga F, Ribeiro AC, Pagani DM, Timotheo C, Amaro T, Vettorato G, SCROFERNEKER ML. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: Case report. *Med Mycol Case Rep*, 2018;28(19):18-20.

Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50(1):1-26.

Walochnik J, Haller-Schober EM, Kölli H, Picher O, Obwaller RA, Aspöck H. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. *Journal of Clin Microb* 2000;38(11):3932–3936.

Yoder JS, Verani J, Heidman N, Hoppe-Bauer J, Alfonso EC, Miller D, Jones DB, Bruckner D, Langston R, Jeng BH, Joslin CE, Tu E, Colby K, Vetter E, Ritterband D, Mathers W, Kowalski RP, Acharya NR, Limaye AP, Leiter C, Roy S, Lorick S, Roberts J, Beach MJ. *Acanthamoeba keratitis*: The Persistence of Cases Following a Multistate Outbreak. *Ophthalmic Epidemiology* 2012;19(4):221-225.

Zaitz C, Campbell I, Marques SA, Ruiz LRB, Framil VMS. 2010. **Compêndio de Micologia Médica**. Guanabara – Koogan, v.2, p.432.

---

Artigo em preparação para submissão à

Revista **ACTA TROPICA**

## The interaction between *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* with *Acanthamoeba castellanii*

Priscila Lemos Tavares<sup>a</sup>, Francisco Kercher Berte<sup>b</sup>, Carine Cristina Tavares de Souza<sup>c</sup>, Marilise Brittes Rott<sup>b,c</sup>, Maria Lúcia Scroferneker<sup>a,b</sup>.

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, Porto Alegre, CEP: 90035-003, Brasil.<sup>a</sup>; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, Sala 325, Porto Alegre, CEP: 90050-170, Brasil<sup>b</sup>; Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. , Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil<sup>c</sup>.

# Endereço de correspondência: ptavares497@gmail.com

\*Endereço I: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, Sala 325, Porto Alegre, CEP: 90050-170, Brasil. Tel: (055) 5133083934; Fax: (055) 5133083121.

### ABSTRACT

Sporotrichosis is a worldwide zoonotic subcutaneous mycoses, caused by species of the fungal *Sporothrix schenckii* complex. The protozoa from genus *Acanthamoeba* are widely distributed in the environment (soil, water and air), and some species may be pathogenic and/or opportunistic. These organisms coexist in the same environment, which may result in some interspecific changes. The aim of our study was to verify the profile of interaction between *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* and *A. castellanii* by an *in vitro* model of co-culture as a modulator factor of both microorganisms intrinsic characteristics. In order to do so, the phagocytosis index of *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* by *A. castellanii*; the *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* viability after contact with *A. castellanii*; the amoeba viability after contact with the fungus; and the influence of *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* in encystment process of *A. castellanii* were performed. The analyses indicated that *S. schenckii* and *S. brasiliensis* have suffered phagocytic events by *A. castellanii*. Results also showed that there was no significant increase in fungal replication in the presence of amoebae and there was no change in the viability of amoebas in co-culture with fungi. Our results were obtained through *in vitro* assays, which make possible the absence of these results *in vivo*, so there is a need for studies with co-infection *in vivo* in order to have a thorough understanding of this relationship.

**Keyword:** *Acanthamoeba castellanii*, *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis*, co-culture, interaction.

## **Introduction**

Sporotrichosis is a subcutaneous or chronic mycoses caused by traumatic infection by dimorphic fungi of *Sporothrix schenckii* complex (Guarro et al., 1999; Barros et al., 2001; Barros et al, Schubach et al., 2004, Marimon et al., 2008) with worldwide distribution, mainly in tropical regions. The majority of described cases is from Central America and South America, mainly Mexico, Colombia, Brazil and Peru, in addition to the African continent (Pappas et al., 2000; Kovarik et al., 2008). In South America, the majority of described cases are from Brazil (Lopes et al., 1999), being the subcutaneous mycoses the form of higher incidence in Rio Grande do Sul State (Da Rosa et al., 2010; Vettorato et al., 2017)

Free-living amoebae are opportunistic/pathogenic protozoan found in nature. They present four genera able to causing human infection: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* and *Sappinia* (Riveira et al., 1987; Schuster; Visvesvara, 2004; Visvevara et al., 2007), the *Acanthamoeba* is the one of a higher prevalence. This protist presents two stages on its life cycle: the vegetative trophozoite and the resistant cyst (Nunes et al., 2014) and it feeds on bacteria, yeasts, and algae. Although some microorganisms are resistant and can survive after internalization and others are able to replicate inside trophozoites (Khan, 2006; Visvesvara et al., 2007). Thus, interactions between amoebae and micro-organisms are reported and depend on its features, which can bring benefits or detriments (Sandstrom et al., 2011; Van Waeyenberghe et al., 2014; Guimaraes et al., 2016) that can occur naturally, as well as *in vitro*. Therefore this study aimed to investigate the interspecific relationships between *A. castellanii* and *S. schenckii* and *S. brasiliensis* using a co-culture model in addition to evaluating the changes related to factors inherent to the organisms.

## **Material and Method**

### **Microorganisms**

*A. castellanii* Neef strain (ATCC 30010) was maintained in PYG medium (2% protease peptone, 0.2% of yeast extract and 1.8% glucose) supplemented with streptomycin and penicillin in culture flasks (25cm<sup>2</sup>), at a temperature of 30°C. Cells counting (1x10<sup>5</sup> cells/mL) were performed using a Fuchs-Rosenthal counting chamber and the viability assessed by trypan blue exclusion dye method (0.3%). Clinical samples of *S. schenckii*



(ATCC 201679) and *S. brasiliensis* (ATCC 201681), identified by molecular methods were grown in tubes containing potato agar, for conidia formation induction, for 7 days at 25°C, following, a spore suspension was performed ( $1 \times 10^5$  cells/mL), measured in Neubauer chamber.

### **The phagocytosis index**

Conidia internalization by amoebae were determined through the phagocytosis index in four time points (2, 4, 6 and 8 h). Trophozoites were seeded in 96 wells microplates with PBS and incubated for 2h at 30°C, for acclimation and adhesion of *A. castellanii* on the plate. Conidia of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* were added to the wells at a ratio of 1:1 ( $1 \times 10^5$  cells/mL). After 2, 4, 6 and 8 h of incubation, the co-culture was resuspended and the number of amoebae was counted in Fuchs-Rosenthal chamber. Three wells of *Acanthamoeba* co-culture with different *Sporothrix* species were used to determine the phagocytosis index, defined as the number of amoebae with internalized conidia by the reason of the total number of amoebae. Images of trophozoites phagocytosing conidia were taken using a Olympus BX41 microscope (Olympus America). The assays were carried out in triplicate and repeated three times.

### **Viability of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis***

A volume of 100 µl of amoebae suspension in PBS ( $1 \times 10^5$  cells/mL) was placed in a 96-well microplate and incubated at 30°C for 2h. Then, 100 µl of conidia suspension ( $1 \times 10^5$  - *S. schenckii* and *S. brasiliensis*) were added to the wells with amoebae and the co-culture was analyzed for 24, 48, 72 and 96 h. As control, the conidia were incubated in PBS. In each time point, fungal count was performed by diluting each of the samples and inoculating it into Saboraud dextrose agar Petri plates for 48 hours at 30° C to count colony forming units (CFU).

### ***Acanthamoeba castellanii* viability determination**

It was seeded 100 µl of the amoeba-PYG suspension ( $1 \times 10^5$  cells/mL) in 96-well microplate and the amoebae were kept at 30°C for 2h. After, it was washed 2 times with PBS. It were added separately to the wells: 100 µl of PBS as a control, 100 µl of *S. schenckii* conidia (alive and inactivated), 100 µl of *S. brasiliensis* (alive and inactivated), 100 µl of fungal supernatant culture and incubated at 30°C for 24, 48, 72, 96 h. All assays were performed in triplicate and repeated three times. The conidia were inactivated by heating (60°C for 3h) and the supernatant of the yeast culture was obtained from a suspension of fungi in PBS ( $1 \times 10^5$  cells/mL) incubated for 72h at 30°C, then the suspension was centrifuged at 600 x g for 10 min and filtered through a 0.22 µm membrane. Amoeba viability was determined with a Fuchs-Rosenthal chamber using the dye vital trypan blue stain at 0.3%.

### **The influence of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* in *A. castellanii* encystment process.**

In a 96-well plate were placed 100 µL of *A. castellanii* trophozoites suspension of  $10^5$  cells/mL. After 30 min were added, in separated wells, 100 µl of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* conidia suspension ( $1 \times 10^5$  cells/mL) and incubated at 30°C for 96 h. As a control, amoeba in PBS buffer was used. After incubation, the number of trophozoites and cysts were determined in Fuchs-Rosenthal chamber. The data were expressed as encystment percentage, that is, the number of cysts in the ratio of the total number of amoebae.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed using the software *PAST (version 3.21)* with the statistical significance of  $p < 0.05$ . For the phagocytosis index determination, one way *ANOVA* was performed, followed by the *Tukey* test. The difference between amoeba and fungal viability was analyzed by two-way *ANOVA* followed by *Bonferroni* post-test. The analysis of amoeba encystment process was performed by *Student's t-test*.

## **Results**

### **The phagocytosis index**

The phagocytosis index for *A. castellanii* in co-culture with *S. schenckii* and *S. brasiliensis* was determined in optical microscope. The co-culture was examined at 2, 4, 6 and 8 h, evidencing the occurrence of a higher phagocytosis index in 2h of interaction between the microorganisms, as demonstrated in Figure 1. Amoebae lysis events and fungal conidia release were observed over time (data not shown) (Fig 2).

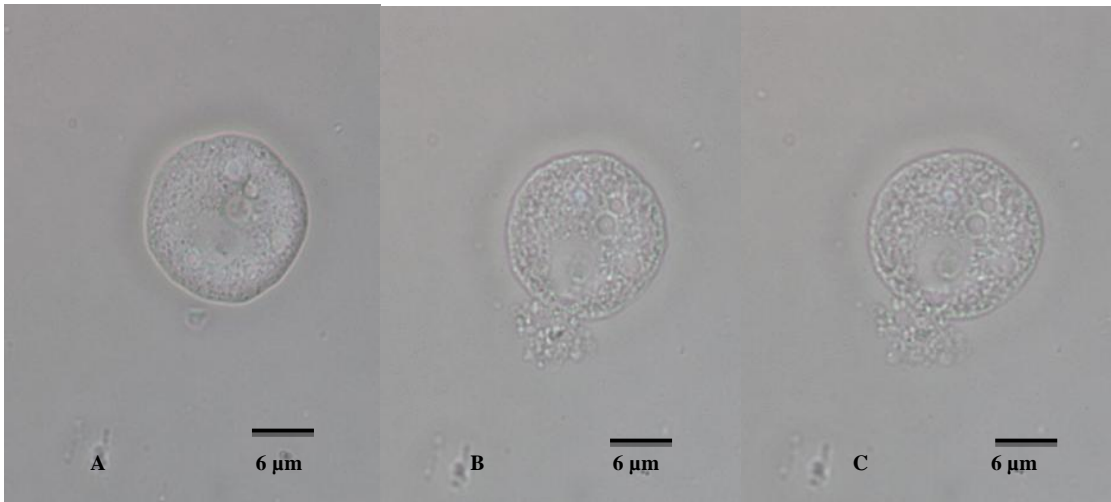


Figure 2. Representation of *A. castellanii* with internalized conidia of *S. brasiliensis* and the trophozoite lysis. (A) The *A. castellanii* with internalized conidia of *S. brasiliensis*, (B) and (C) the trophozoite lysis per conidia of *S. brasiliensis*.

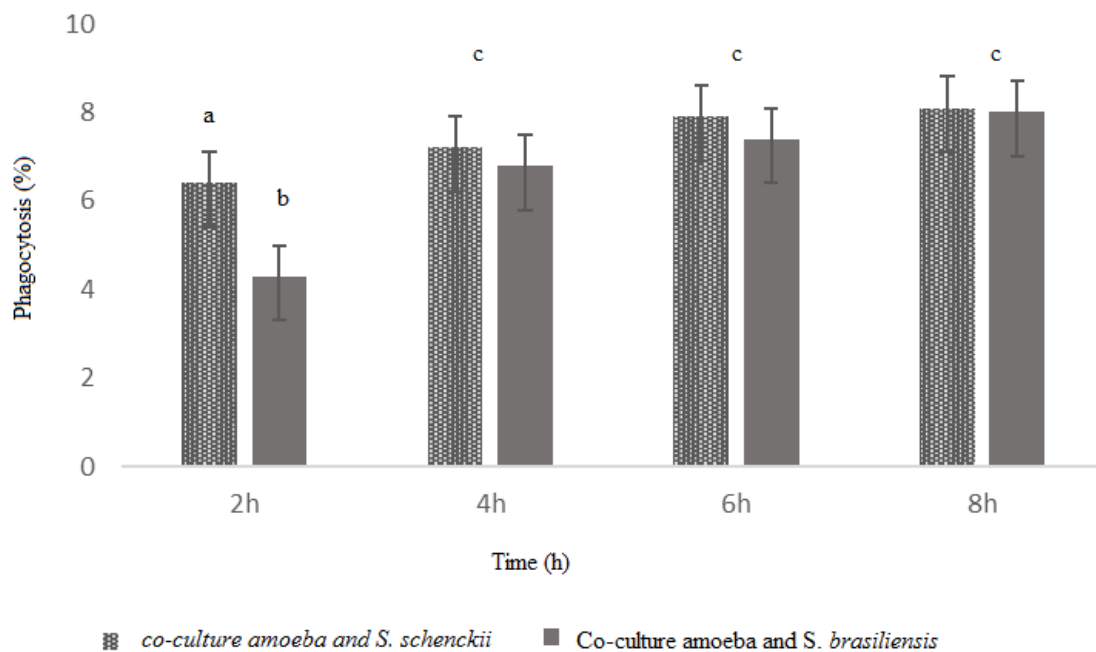


Figure 1. Phagocytosis of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* by the strain Neff. The index was calculated by counting the number of amoebae with internalized conidia in ratio of the total number of amoebae. Different letters (a) and (b) represent significant differences ( $p < 0.05$ ).

### Viability of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* after co-culture with *A. castellanii*

The viability of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* after co-culture with *A. castellanii* verified by counting of the CFU remained the same for the control and the tests at different time points, except for 72 h where the viability was significantly higher for *S. brasiliensis* in contact with amoebae in relation to the control (figure 3).

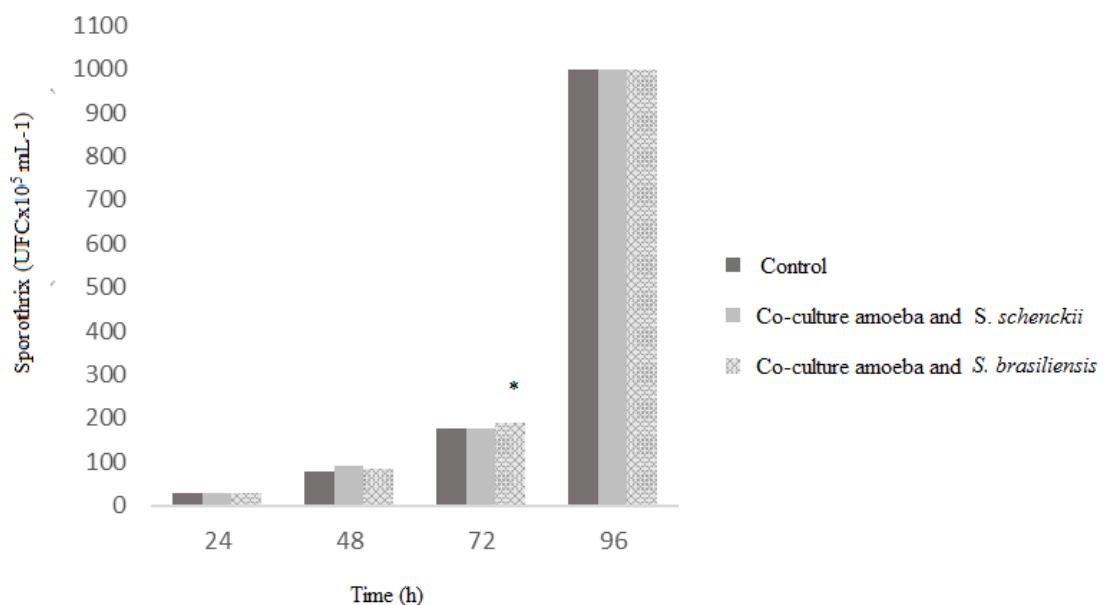
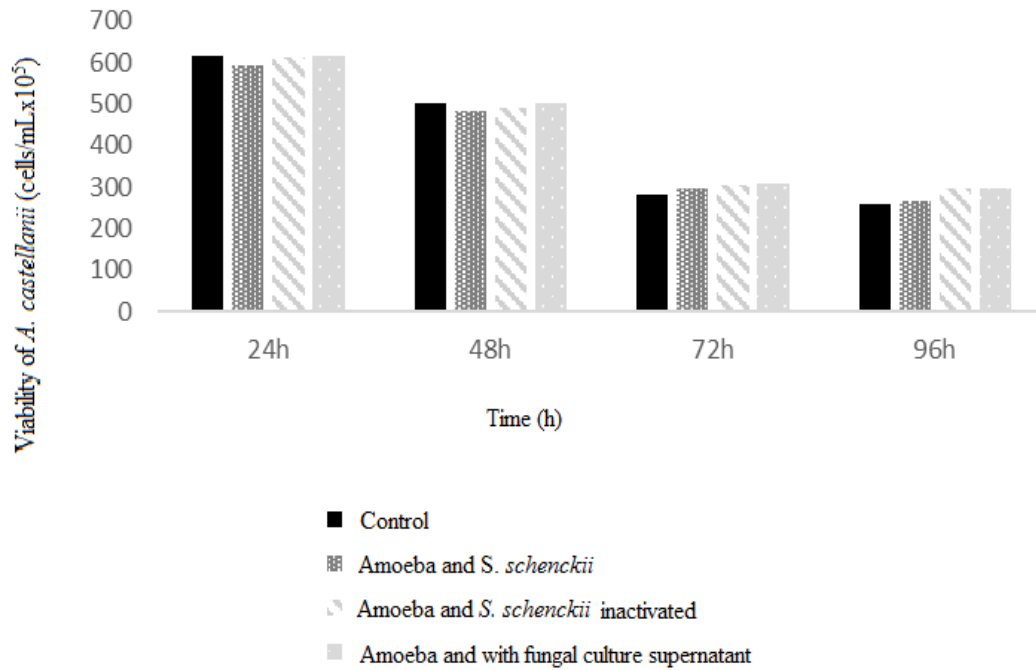


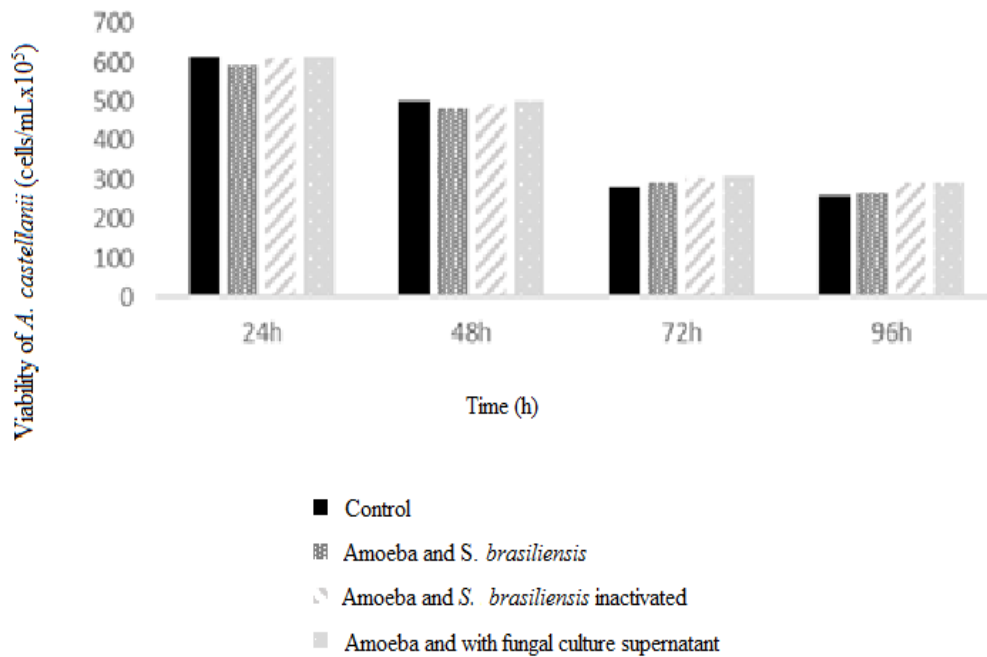
Figure 3. *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis* viability after co-culture with *A. castellanii*. (\* $p < 0.05$ ).

### Amoebae viability after co-culture with *S. schenckii sensu stricto* and *S. brasiliensis*

The viability of *A. castellanii* in co-culture with *S. schenckii* and *S. brasiliensis* was measured using trypan blue dye. The co-culture was quantified in 24, 48, 72 and 96 hours showing no significant decrease in amoeba viability through time as seen in figure 4A and 4B, which was also observed in the control.



**Figure 4A.** Viability of *A. castellanii* in the presence of *S. schenckii*, with fungal culture supernatant and inactivated *S. schenckii*.  $p < 0.05$



**Figure 4B.** Viability of *A. castellanii* in the presence of *S. brasiliensis*, with fungal culture supernatant and inactivated *S. brasiliensis*.  $p < 0.05$

### Encystment of *A. castellanii* in co-culture with *S. schenckii* and *S. brasiliensis*

The encystment was determined by counting cysts after 96 h of co-culture, it did not show significant difference, as shown in figure 5.

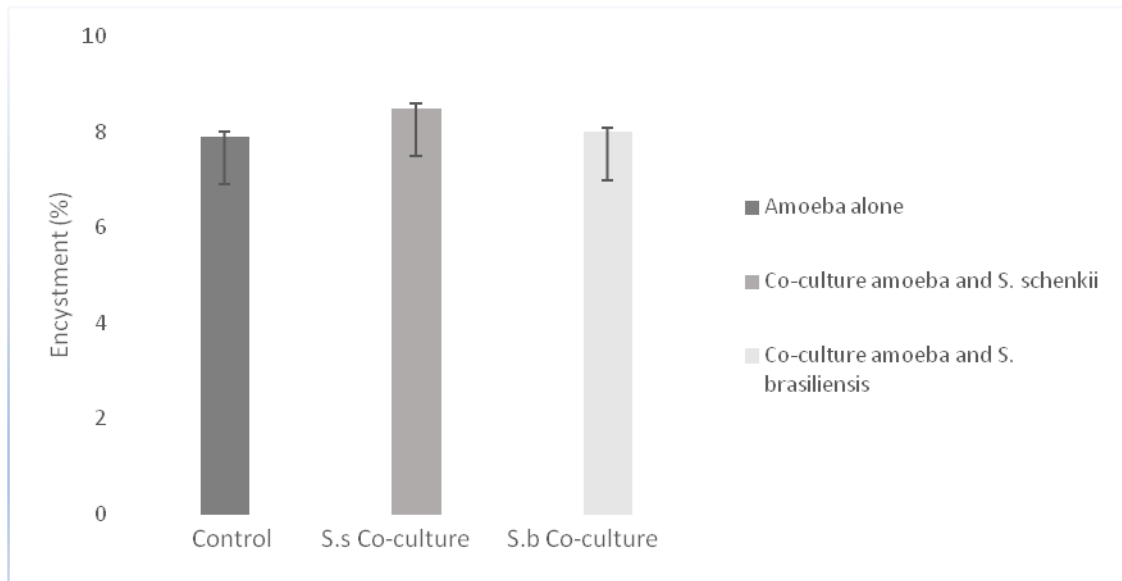


Figure 5. Encystment process of *A. castellanii* in the presence of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* and compared with control  $p < 0.05$ .

## Discussion

There are few studies about interactions between *A. castellanii* and *Sporothrix schenckii* complex species. The coexistence of these organisms in the environment stimulates research with interspecific relationships. In this study, we investigated the interaction between *A. castellanii* and two *Sporothrix* species (*S. schenckii* and *S. brasiliensis*).

To perform the assays it was used a saline buffer following the methodology developed by Steenbergen et al. (2004), this solution does not promote any of the microorganisms because it does not contain nutrients, indicating that the occurrences would be due to the interaction between the microorganisms. Studies about interactions between amoebae and microorganisms made by several authors suggest the ability of organisms are benefiting from amoebae nutrients to survival (Greub and Ranoult. 2004; Khan, 2006; Salah et al., 2009; Siddiqui; Khan, 2012). Investigating the phagocytosis index, we found that *S. schenckii* and *S. brasiliensis* are phagocytized by *A. castellanii* and this index is significantly higher for *S. schenckii* in the first two hours compared to *S. brasiliensis*. This behavior can probably be due to higher virulence of that species, what was proven by Stopiglia et al. (2014). *S. brasiliensis* has reached a similar phagocytosis index of after 4 hours of co-culture. In a study by Steenbergen et al.

(2004), phagocytosis was observed for *S. schenkii sensu stricto*, however the index found by the authors was approximately 80% at a temperature of 37°C after 2h of observation, while in our assays the phagocytic event ranged between 6 to 8% in the analyzed period, but the temperature used was 30°C. According to some authors (Hogan et al., 1996; Lacerda, 2010), the thermotolerance is an important factor related to virulence, showing a correlation with the clinical forms of the mycoses, whereas isolates unable to grow at temperatures above 37°C would be associated with the cutaneous mycoses, thermotolerant isolated would be able to develop in internal organs. Our result meets this idea by pointing out that high virulence showed by fungus would have a direct influence on amoeba phagocytic ability.

Contradicting previous studies describing that fungi are used as nutrients to amoebae (Lin et al., 2009), our study showed that there was a significant increase in conidia and hyphae count after 72h of co-culture of *S. brasiliensis* and that occurred amoeba lysis after fungal internalization, indicating that fungi probably used amoebae as nutritional source. In this way, it is possible to say that nutrients from protozoan growth or cell lysis have been used for fungal replication, what was also observed by other authors (Yli-Pirilä et al., 2006; Rizzo et al., 2017). Our results corroborate with those of Nunes et al. (2016) which has been conducted with another fungus species, *Fusarium solani*, demonstrating that *A. castellanii* strains induced an increase of conidia and hyphae, suggesting that amoeba may have served as a nutritional source and secreted nutrients aiding in fungi growth.

In our study, similarly to what was observed by Nunes et al. (2016), no significant difference was found in encystment process of *A. castellanii* in the presence of *Sporothrix* species. This possibly occurred due to the lack of nutrients in the medium used in the experiment (PBS), corroborating with other studies that describe that free-living amoebae encyst in unfavourable conditions, such as lack of nutrients (Panjwani, 2010; Bowers and Korn, 1969). According to Panjwani (2010) “a cyst” is formed when a trophozoite is in adverse conditions, such as exposure to biocides agents, nutrients scarcity, high temperature and hyperosmolarity.

Unlike previous studies, in which amoeba of the genus *Acanthamoeba* have suffered significant decrease in cell viability in co-culture with other microorganisms (Yli-Pirilä et al., 2006; Van Waeyenberg et al., 2013), in our study the presence of fungal elements (alive and inactivated fungi and fungal culture supernatant) did not

affect its viability. Similar results were obtained by Nunes et al. (2010), who did not find a significant increase in amoeba growth in the presence of alive or inactivated fungal.

Our analyses indicated that *S. schenckii* and *S. brasiliensis* have suffered phagocytic events by *A. castellanii*. Our results showed that there was no significant increase in fungal replication in the presence of amoeba and there was no change in the viability of amoebas in co-culture with fungi. Our results were obtained *in vitro* and may not demonstrate the same behavior *in vivo*, being required *in vivo* studies with co-infection in order to have a thorough understanding of this interaction.

#### **Conflict of interest:**

The authors declare have no conflict of interests.

#### **Thanks to:**

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

#### **Referências:**

- Barros, M.B.L., Schubach, T.M.P., Gutierrez-Galhardo, M.C., Schubach, A.O., Monteiro, P.C.F., Reis, R.S., Zancopé-Oliveira, R.M., Lazerá, M.S., Cuzzi-Maya, T., Blanco, T.C.M., Marzochi, K.B.F., Wanke, B., Valle, A.C.F., 2001. Sporotrichosis: na emergente zoonosis in Rio de Janeiro. Mem Ins Oswaldo Cruz. 96(6):777-779.
- Barros, M.B.L., Schubach, A.O., Valle, A.C.F., Gutierrez-Galhardo, M.C., Conceição-Silva, F., Schubach, T.M.P., Reis, R.S., Wanke, B., Marzochi, K.B.F., Conceição, M.J., 2004. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. Clin. Infect. Dis. 38(4):529-535.
- Da Rosa, A.C.M., Scroferneker, M.L., Vettorato, R., Gervini, R.L., Vettorato, G., Weber, A., 2005. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. Journal of the American Academy of Dermatology, 52: 451-459.
- Greub, G., Raoult, D., 2004. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. Clin Microbiol Rev. 17(2): 413-33.
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M., 1999. Developments in Fungal Taxonomy. Clin. Microbiol. 12(3):454-500.



- Guimaraes, A.J., Gomes, K.X., Cortines, J.R., Peralta, J.M., Peralta, R.H., 2016. *Acanthamoeba spp.* as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res.* 193:30–38.
- Khan, N.A., 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30(4):564–595.
- Kovarik, C.L., Neyra, E., Bustamante, B., 2008. Evaluation of cats as the source of endemic orotrichosis in Peru. *Med. Mycol.* 46(1):53-56.
- Lin, H.C., Hsiao, C.H., Ma, D.H.K., Yeh, L.K., Tan, H.Y., Lin, M.Y., Huang, S.C.M., 2009. Medical treatment for combined *Fusarium* and *Acanthamoeba keratitis*. *Acta ophthalmol.* 87(2):199–203.
- Lopes, J.O., Alves, S.H., Mari, C.R., Brum, L.M., Westphalen, J.B., Altermann, M.J., Prates, F.B., 1999. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32(5):541-545.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Guarro, J., 2008. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med. Mycol.* 46(6):621-625.
- Nunes, T.E.T.; Rott, M.B.; Fuentefria, A. M. 2014. INTERAÇÃO ENTRE *Acanthamoeba castellanii* E *Fusarium solani*: UM POSSÍVEL PROBLEMA NO CONTEXTO DA CERATITE. (Dissertação) de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, RS.
- Nunes, T.E.T., Brazil, N.T., Fuentefria, A.M., Rott, M.B., 2016. *Acanthamoeba* and *Fusarium* interactions: a possible problem in keratitis. *Acta Trop.* 157:102-7.
- Panjwanin, N., 2010. Pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis*. *Ocul Surf*, 8:70-9.
- Pappas, P.G., Tellez, I., Deep, A.E., Nolasco, D., Holgado, W., Bustamante, B., 2000. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. *Clin. Infect. Dis.* 30:65-70.
- Pussard, M., Pons, R., 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica.* 13(4):557-598.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P., Lares, F., 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ Res.* v.42, p. 149-154.
- Rizzo, J., Albuquerque, P.C., Wolf, J.M., Nascimento, R., Pereira, M.D., Nosanchuk, J.D., Rodrigues, M.L., 2017. Analysis of multiple components involved in the

- interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. Fungal Biol. 121(6-7): 602-614.
- Salah, I.B., Ghigo, E., Drancourt, M., 2009. Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. Clin Microbiol Infect. 15(10):894-905.
- Sandström, G.; Saeed, A.; Abd, H., 2011. *Acanthamoeba*-bacteria: a model to study host interaction with human pathogens. Curr. Drug Targets 12(7):936-941.
- Schubach, A., 2010. Esporotricose: A evolução e os desafios de uma epidemia. Rev. Panam Salud Publica. 27(6): 455-60.
- Schuster, F.L.; Visvesvara, G.S., 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 34:1001-1027.
- Siddiqui, R., Khan, N.A., 2012. *Acanthamoeba* is the evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? Exp parasitol. 130(2):95-7.
- Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D., Malliaris, S.D., Casadevall, A., 2004. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. Infect Immun. 72(6): 3478-88.
- Steenbergen, J.N., Shuman, H.A., Casadevall, A., 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA. 98(26):15245-50.
- Stopiglia, C.D.O., Magagnin, C.M., Castrillón, M.R., Mendes, S.D., Heidrich, D., Valente, P., Scroferneker, M.L., 2014. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. Medical Mycology 52:56-64.
- Van Waeyenbergh, L., Baré, J., Pasmans, F., Claeys, M., Bert, W., Haesebrouck, F., Houf, K., Martel, A., 2013. Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. Environ Microbiol Rep. 5(6):819-824.
- Vettorato, R., Heidrich, D., Fraga, F., Ribeiro, A.C., Pagani, D.M., Timotheo, C., Amaro, T., Vettorato, G., Scroferneker, M.L., 2018. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed in vitro and in vivo: Case report. Med Mycol Case Rep 28(19):18-20.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol. 50: 1-26.

Yli-Pirilä, T., Kusnetsov, J., Hirvonen, M.R., Seuri, M., Nevalainen, A., 2006. Effects of amoebae on the growth of microbes isolated from moisture-damaged buildings. *Can J Microbiol.* 52(4): 383–39.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, nossas análises indicaram que *S. schencki* e *S. brasiliensis* sofreram eventos fagocíticos por *A. castellanii*. Os resultados não demonstraram aumento significativo da replicação fúngica na presença da ameba e nem diminuição da viabilidade amebiana em cocultura com ambos os fungos. Porém, os resultados foram obtidos através de testes *in vitro*, sendo necessários estudos com a coinfeção *in vivo* para confirmação desta hipótese. É importante ressaltar que nossos resultados foram obtidos através de testes *in vitro*, comportamento que pode não se refletir *in vivo*. Portanto, estudos relativos a esta coinfeção *in vivo* são necessários para entendermos completamente esta relação.

## 10. ANEXOS E/OU APÊNDICES

### ANEXO: STROBE checklist -

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (pág.4 e 5)
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found (pág.4 e 5)
<b>Introduction</b>		pág. 9
<b>Background/rationale</b>		Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported (pág. 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20)
<b>Objectives</b>	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses (pág . 21)
<b>Methods</b>	6	(pág. 22, 23 and 24)
<b>Article</b>	8	(pág. 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44)
<b>Final Consideration</b>	45	