



Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituto de Ciências Biológicas - ICB

**ISOLAMENTO E CULTIVO *in vitro* DO AGENTE ETIOLÓGICO DA
DOENÇA DE JORGE LOBO:
MORFOLOGIA, FISIOLOGIA E GENOMA DE *Candida lobo* sp. nov.**

Patrícia Fagundes da Costa

Belém - Pará

2015



Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituto de Ciências Biológicas - ICB

**ISOLAMENTO E CULTIVO *in vitro* DO AGENTE ETIOLÓGICO DA
DOENÇA DE JORGE LOBO:
MORFOLOGIA, FISILOGIA E GENOMA DE *Candida lobo* sp. nov.**

Patrícia Fagundes da Costa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de doutor em Neurociências e Biologia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Universidade Federal do Pará – UFPA**

Belém - Pará

2015



Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituto de Ciências Biológicas - ICB

**ISOLAMENTO E CULTIVO *in vitro* DO AGENTE ETIOLÓGICO DA
DOENÇA DE JORGE LOBO:
MORFOLOGIA, FISIOLOGIA E GENOMA DE *Candida lobo* sp. nov.**

Patrícia Fagundes da Costa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado (UFPA, Orientador)

Prof. Dr. Juarez Quaresma (UEPA, Avaliador)

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior (UFPA, Avaliador)

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva (UFPA, Avaliador)

Belém Pará

2015

Dedico a minha amada mãe Maria Helena (em memória), mulher guerreira e exemplo para mim de dedicação e coragem.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João e Helena (em memória) e a meus irmãos Fabio e Lilian muito obrigada pelo carinho e aconchego.

Ao amor da minha vida, meu filho Murilo que me faz abrir os olhos todos os dias e ver que a vida vale a pena.

Aos meus amados sobrinhos Beatriz Helena, Lucas e João pela alegria de compartilharmos a vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado que é inspiração de perseverança, dedicação, competência e certeza de que tudo pode dar certo.

A Profa Antônia Vieira pelo amor, amizade e aconchego maternal sempre disponíveis em todos os momentos, fossem eles bons ou maus.

Aos professores Jorge Pereira da Silva e José Maria Vieira pelo incentivo e amor ao estudo dos fungos.

Ao Prof. Dr. Josafá Barreto pela disponibilidade na discussão sobre ciência e no apoio a construção do mapa de casos da doença de Jorge Lobo.

Ao Prof Dr. Moisés Batista pela amizade e apoio no laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Dermato-imunologia Suellen Yamano, Simone Campelo, Daniela Paternostro, Tania Mara, Angélica, Raquel Bolth, Naila, Sâmella pela alegria da convivência.

Aos amigos de uma vida inteira Márcia Cristina, Lucelena, Graciene Taveira, Edna Costa, Carla Lopes e Silvia Helena.

Aos colaboradores do LDI, André, Érica, Giselle, Marcos e Silvia.

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade do aprendizado e aos melhores anos de minha vida como estudante, e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

A Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia/SESPA por todo apoio ao atendimento e tratamento dos pacientes.

Ao Laboratório de Dermato-Imunologia pelo suporte e a oportunidade de continuar me aprimorando, aperfeiçoando e construindo novas amizades.

Ao Instituto Evandro Chagas, em especial a Dra. Silvia Helena Marques do Laboratório de Micologia pela disponibilidade em auxiliar na geração dos resultados das provas fisiológicas e produção dos antígenos e ao Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz Junior e Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva pela geração de imagens de alta qualidade na microscopia eletrônica, além das relevantes e empolgantes discussões sobre o tema.

Ao Laboratório de genética de microrganismos da UFPA, em especial aos professores Arthur Silva e Adriana Carneiro pelo apoio ao projeto e pela montagem do genoma do fungo.

Ao Laboratório de Citogenética da UFPA, em especial ao Prof. Rommel Burbano por todo apoio com os experimentos de FISH.

Ao Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA, em especial a Profa. Dra. Ândrea Kely Ribeiro dos Santos e ao Prof. Dr. Sidney Santos pelas valiosas contribuições e incentivo no desenvolvimento do trabalho.

Ao Centro Universitário do Pará (CESUPA) e aos professores em especial Profa. Mônica Rocha, Solimar Lopes e Adriana Paula.

Aos órgãos de fomento, CNPQ, CAPES, CAPES PROAMAZÔNIA, FAPESPA, PPSUS, FADESP pelo fomento ao projeto.

*Neste mundo em que vivemos,
tudo está sujeito a mudanças contínuas e inevitáveis.*

Jean-Baptiste Lamarck

RESUMO

A Doença de Jorge Lobo é uma infecção crônica, granulomatosa, que se desenvolve após a implantação traumática do fungo na pele. Manifesta-se com lesões nodulares, verrucosas e/ou queloidiformes, localizadas principalmente nos membros inferiores e pavilhões auriculares. Doença prevalente na região Amazônica e, atualmente considerada como emergente, com casos novos em outros continentes em humanos e golfinhos. Pouco se conhece sobre o agente etiológico da doença de Jorge Lobo, principalmente pela impossibilidade do cultivo *in vitro*, dificultando a caracterização correta do agente. Este trabalho teve como objetivo isolar, cultivar e caracterizar cepas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo provenientes de pacientes atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará Dr. Marcello Candia, Marituba no estado do Pará. Durante alguns anos foram acompanhados 23 pacientes, a maioria lavradores do sexo masculino, entre 14 e 80 anos de idade, com material biológico coletado por raspado dérmico e biópsia, para confirmação do diagnóstico pelo exame micológico direto e histopatologia, com posterior tratamento. O material biológico coletado foi processado para o isolamento, com a obtenção de células leveduriformes características do agente etiológico da doença de Jorge Lobo após 7 a 14 dias em meio RPMI com a enzima dispase II. Depois de 2 a 6 meses em RPMI (5% CO₂, 37°C) observamos a fragmentação das células-mãe provenientes das lesões e a presença de células leveduriformes, variando de 1 a 7 µm de diâmetro. A partir deste momento, foi possível manter as cepas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo em meio líquido RPMI ou em ágar Sabouraud-dextrose à temperatura ambiente, onde formaram colônias pastosas, branco-acastanhadas, cerebriformes, por vezes lanuginosas. Células destas cepas foram analisadas por diferentes técnicas de microscopia óptica e eletrônica, bioquímicas e genéticas, culminando com a descrição do genoma da cepa de um paciente, logo após o isolamento enzimático e antes da diferenciação em cultura, definindo a seguinte identificação taxonômica: Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Debaryomycetaceae; Candida/Lodderomyces clade; *Candida*; *Candida* sp. LDI48194. A apresentação de características clínicas peculiares, associada a aspectos morfológicos únicos, propriedades fisiológicas e genéticas, que não permitem a definição de uma espécie já identificada, indicam que o agente da doença de Jorge Lobo é, na realidade, uma nova espécie, para a qual propomos a nomenclatura de *Candida lobo*.

Palavras chave: Doença de Jorge Lobo, *Lacazia lobo*, *Candida* sp, epidemiologia, morfologia, fisiologia, isolamento, cultura.

ABSTRACT

Jorge Lobo's disease is a chronic granulomatous infection developing after traumatic implantation of the fungus in the skin. It presents with nodular, verrucous or keloid-like lesions mainly on legs and ears. The highest prevalence is at Amazon Region and it has been considered an emergent disease, presenting new cases on other continents in both, humans and dolphins. Little is known about *L. lobo*, and the absence of *in vitro* culture impairs the correct characterization of the fungus. This work had as the main goal to isolate, culture and characterize strains of the etiological agent of Jorge Lobo's disease, obtained from patients attended at the Dr Marcello Candia Reference Unit in Sanitary Dermatology of the State of Pará, in Marituba, Pará, Brazil. During many years 23 patients were diagnosed and followed by our team. Most of them were male farmers, with age varying from 14 to 80 years-old. After biopsy of the lesion for confirming the diagnosis, the patients initiated treatment and the material was processed with dispase II at liquid medium RPMI, 37° C, 5% CO₂ for 1-2 weeks to isolate yeast cells from human tissue. After 2-6 months in the medium, we observed fragmentation of mother cells and the presence of new yeast cells with diameter varying from 1 to 7µm. From that moment, it was possible to grow the strains in different liquid or solid mediums at 37° C or RT, where creamy, whitish cerebriform, sometimes hairy colonies were observed. Cells from those strains were analyzed by different techniques of optical and electron microscopy, biochemistry and genetics, ending with the description of the genome of one patient just after isolation of the fungal cells from the lesional skin, defining the following taxonomic identification: Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Debaryomycetaceae; Candida/Lodderomyces clade; *Candida*; *Candida* sp. LDI48194. The peculiar clinical presentation associated to unique morphological, physiological and genetic characteristics that do not permit the definition of a known species indicate that the etiological agent of Jorge Lobo's disease is a new species, for which we propose to use the name *Candida lobo*.

Key words: Jorge Lobo's disease, *Lacazia lobo*, *Candida* sp, epidemiology, morphology, physiology, isolation, culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características microscópicas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.....	21
Figura 2. Isolamento enzimático de células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo a partir de lesões de pacientes.....	27
Figura 3. Cultura células fúngicas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo recém-isoladas pelo método enzimático em meios artificiais.....	29
Figura 4. Principais etapas da Hibridização fluorescente <i>in situ</i>	42
Figura 5. Mapa da distribuição mundial dos casos de doença de Jorge Lobo em humanos e em golfinhos.....	45
Figura 6. Mapa da distribuição geográfica dos casos de doença de Jorge Lobo no estado do Pará.....	47
Figura 7. Aspectos clínicos da doença de Jorge Lobo.....	48
Figura 8. Exame micológico direto e histologia para diagnóstico da doença de Jorge Lobo.....	50
Figura 9. Evolução do tratamento de pacientes com itraconazol 200mg/dia.....	51
Figura 10. Inoculação de células recém-isoladas em pata de camundongo.....	53
Figura 11. Células leveduriformes obtidas pelo tratamento enzimático.....	54
Figura 12. Amostra de crescimento das células fúngicas em caldo Fava Netto.....	55
Figura 13. Amostras de cultura após 5 dias de crescimento em ágar Sabouraud-dextrose.....	56
Figura 14. Relação do tamanho do diâmetro das colônias do agente etiológico da doença de Jorge Lobo, da <i>Candida tropicalis</i> e da <i>Candida albicans</i> em meios de cultura artificial.....	57
Figura 15. Características macroscópicas das colônias do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.....	58
Figura 16. Modificações morfológicas das células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo quando cultivadas em meios de cultura artificiais.....	59
Figura 17. Esquema de modificações morfológicas das células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo quando cultivadas em meios de cultura artificiais.....	60
Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura de células leveduriformes recém-isoladas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.....	61

Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura de células leveduriformes obtidas de cultivo do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.....	62
Figura 20. Microscopia eletrônica de transmissão de células leveduriformes obtidas de cultivo do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.....	63
Figura 21. Caracterização dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo pelo CHROMagar® <i>candida</i>	66
Figura 22. Cultura dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo em ágar niger.....	67
Figura 23. Teste da urease.....	69
Figura 24. Teste de proteinase.....	70
Figura 25. Teste da lipase.....	71
Figura 26. Teste da fosfolipase.....	72
Quadro 1. Perfil exoenzimático dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.....	73
Figura 27. Gel dodecil – sulfato de sódio de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado pela prata - Perfil protéico ou glicoproteico de exoantígeno bruto.....	74
Figura 28. Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>	75
Figura 29. Resultado de Blast das sequências contigs do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.....	77
Quadro 2. Resultado de Blastn das sequências de marcadores filogenéticos de <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida</i> sp. (LDI48194).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes e soluções para preparação do gel dodecil-sulfato de sódio com poliacrilamida (SDS-PAGE).....	37
Tabela 2: Etapas da Hibridização fluorescente <i>in situ</i> – FISH.....	41
Tabela 3: Distribuição epidemiológica dos pacientes com doença de Jorge Lobo de acordo com o gênero.....	46
Tabela 4: Distribuição epidemiológica dos pacientes com doença de Jorge Lobo de acordo com a atividade profissional.....	46
Tabela 5: Representação do Perfil de assimilação de fonte de carbono e atividade enzimática dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	25
2.1. OBJETIVO GERAL.....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. CASOS CLÍNICOS.....	26
3.2. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
3.3. ISOLAMENTO ENZIMÁTICO.....	26
3.4. INOCULAÇÃO EM PATA DE CAMUNDONGO.....	28
3.5. CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA	28
3.6. CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA.....	30
3.7. CARACTERIZAÇÃO MICRÓSCOPICA.....	30
3.8. CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL.....	30
3.9. PERFIL BIOQUÍMICO DAS CÉLULAS LEVEDURIFORMES OBTIDO PELO SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK 2.....	31
3.10. TESTE DE IDENTIFICAÇÃO EM MEIO SELETIVO: CHROMagar® Candida (CHROMagar, Difco, França) E ÁGAR NIGER.....	32
3.11. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE EXOENZIMÁTICA DAS CÉLULAS FÚNGICAS.....	32
3.12. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) PARA OBTER O PERFIL PROTEICO DE ANTÍGENO BRUTO DAS CÉLULAS FÚNGICAS CULTIVADAS.....	37
3.13. HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE – FISH.....	40
3.14. EXTRAÇÃO DE DNA DE CÉLULAS LEVEDURIFORMES RECÉM- ISOLADAS, OBTIDAS DE PELE LESIONAL DE UM PACIENTE DE DOENÇA DE JORGE LOBO.....	42
3.15. SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE CÉLULAS LEVEDURIFORMES RECÉM- ISOLADAS.....	43
4. RESULTADOS	44
4.1. DADOS DEMOGRÁFICOS	44
4.2. ASPECTOS CLÍNICOS.....	48
4.3. EXAME MICOLÓGICO DIRETO E HISTOPATOLÓGICO.....	49

4.4. TRATAMENTO DOS PACIENTES COM ITRACONAZOL.....	50
4.5. INOCULAÇÃO EM PATA DE CAMUNDONGO.....	51
4.6. CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA.....	54
4.7. DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA CÉLULA LEVEDURIFORME.....	57
4.8. DESCRIÇÃO ULTRAESTRUTURAL.....	60
4.9. PERFIL BIOQUÍMICO DAS CÉLULAS LEVEDURIFORMES OBTIDO PELO SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK 2.....	64
4.10. TESTE DE IDENTIFICAÇÃO EM MEIO SELETIVO: CHROMagar® Candida (CHROMagar, Difco, França) E ÁGAR NIGER.....	66
4.11. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE EXOENZIMÁTICA DAS CÉLULAS FÚNGICAS.....	68
4.12. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) PARA OBTER O PERFIL PROTEICO DE ANTÍGENO BRUTO DAS CÉLULAS FÚNGICAS CULTIVADAS.....	74
4.13. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>in situ</i> (FISH).....	75
4.14. SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE CÉLULAS LEVEDURIFORMES RECÉM ISOLADAS DO PACIENTE 48194.....	76
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS	90
ANEXO	102
A. Depósito da cepa padrão na coleção de fungos patogênicos do Instituto nacional de controle de qualidade em saúde (INCQS/FIOCRUZ).....	102
B. Relatório do Perfil completo de assimilação dos substratos de carboidrato e atividade enzimática - VITEK 2.....	103
C. Bioprojeto NCBI PRJNA282657 <i>Candida sp.</i> LDI48194.....	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE JORGE LOBO EM HOSPEDEIROS HUMANOS

A Doença de Jorge Lobo é uma infecção crônica, granulomatosa causada pelo fungo *Lacazia loboi*, descrita em 1931 em Recife pelo dermatologista Jorge Lobo em um paciente procedente da Amazônia, que apresentava lesões nodulares confluentes na região sacra com evolução de aproximadamente 19 anos (Lobo, 1933; Lacaz et al., 2002). Acredita-se que a infecção pode ocorrer após a implantação traumática do fungo na pele, através de corte, picada de inseto ou mordida de animal (Brun, 1999). A inoculação através de picada é uma hipótese forte, uma vez que já foi descrito a provável transmissão de outro agente, como *Micobacterium ulcerans* por insetos aquáticos e que muitos pacientes com doença de Jorge Lobo referem picada de insetos como evento prévio ao aparecimento da lesão (Marsollier et al., 2004; Mosi et al., 2008).

A doença foi descrita inicialmente como um tipo de coccidioidomicose e depois como blastomicose queloidiforme devido ao aspecto clássico da lesão (Lobo, 1931; 1933; Campos-Aasen, 1958; Paniz-Mondolfi, Reyes Jaimes e Davila Jones, 2007). Com o passar dos anos, o crescimento no número de casos relatados na Região Amazônica e a ausência de classificação em relação ao agente etiológico resultou em uma variedade de sinônimos utilizados para denominar a doença, tais como blastomicose pseudolepromatosa Amazônica (Fonseca Filho e Area Leão, 1940; Campos-Aasen, 1958; Brito e Quaresma, 2007), blastomicose do tipo Jorge Lobo (Fonseca Filho e Area Leão, 1940; Campos-Aasen, 1958), lepra-dos-Caiabi (Baruzzi, Lacaz e Souza, 1979), Lobomicose (Borelli, 1958) e recentemente Lacaziose (Vilela et al., 2005).

As lesões são pleomórficas, e podem existir como pápulas, nódulos e placas de vários tamanhos, isoladas ou agrupadas, verrucosas ou ulceradas, que podem estar localizadas em qualquer área do tegumento, com pouco ou nenhum prurido (Clyti e Salgado, 2007). Em 1961, Borelli relata a ocorrência de dor aguda e repentina nos locais das lesões, semelhante àquelas produzida pela picada da formiga amazônica, *Atta sexdens* (Borelli, 1961). Alguns autores descrevem uma predileção por áreas “frias e expostas do corpo”, particularmente nos membros e orelhas (Ramos-E-Silva et al., 2009; Paniz-Mondolfi et al., 2012; Talhari e Talhari, 2012).

Para facilitar a indicação de excisão cirúrgica ou não, Lacaz e outros autores classificaram a doença de acordo com sua distribuição em forma isolada ou localizada e

disseminadas e forma multifocal (Lacaz, Baruzzi e Rosa, 1986; Baruzzi e Azevedo, 1991; Opromolla, D. V. et al., 1999).

Devido ao grande polimorfismo das lesões é importante estabelecer o diagnóstico diferencial com várias dermatoses. Para isso, é necessário que profissionais da assistência básica de saúde sejam capacitados para suspeitar da doença que muitas das vezes, simula quadro de hanseníase ou outras dermatoses, e fornecer um diagnóstico fidedigno (Tubilla et al., 2008).

A doença de Jorge Lobo apresenta prolongado período de incubação, sugerindo com isso a evolução crônica da doença (Brun, 1999; Paniz-Mondolfi et al., 2012; Talhari e Talhari, 2012), o que se coaduna com a existência de lesões com 30 a 40 anos de evolução (Paniz-Mondolfi et al., 2012; Talhari e Talhari, 2012). Embora a forma de disseminação não esteja esclarecida, a via hemato-linfática parece ser importante (Fuchs, Milbradt e Pecher, 1990; Rodriguez-Toro e Tellez, 1992). Alterações em vasos linfáticos e adenopatias em áreas adjacentes as lesões são observadas, estes fatos suportam o argumento de disseminação linfática (Silverine et al., 1963; Azulay et al., 1976; Opromolla et al., 2003). Não há relato de transmissão inter-humana, mesmo que exista contato por longos períodos (Baruzzi et al., 1967; Baruzzi et al., 1973).

A doença até o momento não apresenta uma terapêutica efetiva. Em alguns casos, a cirurgia pode representar uma boa alternativa, principalmente em lesões localizadas (Fischer et al., 2002; Elsayed et al., 2004; Paniz-Mondolfi et al., 2012; Talhari e Talhari, 2012). Em casos de lesões disseminadas o tratamento com itraconazol, clofazimina ou combinações é recomendado (Fischer et al., 2002; Elsayed et al., 2004). Furtado et al.(2013) relatam que um paciente utilizando esquema terapêutico com clofazimina 100mg/dia, aliada ao fluconazol 450mg/dia durante 90 a 120 dias não apresentou resposta clínica satisfatória. Woods, Belone Ade, et al. (2010), observaram que 10 pacientes que apresentavam co-infecção por *Lacazia loboi* e *Mycobacterium leprae* melhoraram da doença de Jorge Lobo com o medicamento utilizado no combate à hanseníase, com diminuição do prurido e das lesões, discreta atrofia, e quando as lesões foram removidas cirurgicamente os pacientes não apresentaram recorrência.

1.2. DOENÇA DE JORGE LOBO EM HOSPEDEIROS NÃO HUMANOS

A doença de Jorge Lobo por muitos anos foi considerada doença exclusiva de humanos, porém em 1971 foi descrita a primeira ocorrência da doença em cetáceo da espécie

Tursiops truncatus na costa da Flórida (Migaki et al., 1971; Caldwell et al., 1975). Woodard (1972) analisa por microscopia óptica e eletrônica de material proveniente de golfinhos com doença de Jorge Lobo apreendidos em Marineland nos Estados Unidos. Novos casos de golfinhos da espécie *Sotalia guianensis* com doença de Jorge Lobo são identificados no estuário do Rio Suriname e ilha de San Marco na Flórida (De Vries e Laarman, 1973; Poelma et al., 1974). Em seguida, na Europa o primeiro caso de golfinho com doença de Jorge Lobo foi relatado (Symmers, 1983a). Novamente na Flórida, especificamente em Fort Lauderdale, golfinhos da espécie *T. truncatus* são observados com lesões nódulo-ulceradas (Bossart, 1984). No Brasil, na costa de Santa Catarina em 1993 foi registrado o primeiro caso de doença de Jorge Lobo em *T. truncatus* (Simõse-Lopes et al., 1993). Jule Sotos, 2007, relata a morte na praia da cidade de Navegantes - Vale do Itajaí, de um golfinho fêmea prenha e apresentava o corpo e o palato coberto por lesões semelhantes às da doença de Jorge Lobo. Keiichi et al. (2013) diagnosticaram 2 casos da doença de Jorge Lobo em golfinhos da espécie *T. truncatus*, capturados na costa do Japão, e o diagnóstico foi baseado nas características clínicas, citológicas, histopatológicas, testes imunológicos, e a detecção de sequencias de genes que codificam a gp43 por nested-PCR. E, através deste estudo confirmaram que o agente etiológico destes casos apresentou genótipos diferentes do *Lacazia loboi* da região amazônica. Golfinhos da espécie *Tursiops aduncus* foram capturados na baía de Kagoshima, Japão e apresentavam severas lesões de pele semelhantes às da doença de Jorge Lobo com reações granulomatosas e hiperqueratose, porém o fungo não foi observado no tecido (Tajima et al., 2015). Na costa dos Estados Unidos, golfinhos que apresentavam lesões mucocutâneas foram biopsiados e diagnosticados com diversas patologias e dentre essas, 16,7% de doença de Jorge Lobo cutânea (Bossart et al., 2015).

Em representantes da família delphinidae, as lesões são caracterizadas como verrucosas, às vezes elevadas, que podem ulcerar e formar placas maiores que 30 cm (Van Bresse et al., 2007; Bermudez et al., 2009; Van Bresse, Santos e Oshima, 2009). A doença progride lentamente, e assim como em humanos não apresenta cura espontânea e acomete predominantemente as áreas mais expostas do corpo como cabeça e nadadeiras dorsais (Van Bresse et al., 2007; Murdoch et al., 2008; Van Bresse et al., 2009).

O modo de vida, habitat dos mamíferos marinhos dentre estes os representantes da família delphinidae conferem a estes, vulnerabilidade à exposição dos contaminantes ambientais carregados para os oceanos, o que os tornam um dos melhores indicadores de contaminação sendo, portanto, espécies sentinelas e podem servir de bioindicadores da saúde

de organismos anteriores na cadeia trófica no ambiente aquático (Ross e Birnbaum, 2003; Bossart, 2006).

Um ambiente marinho estável não possui alta frequência de doenças emergentes com efeitos negativos sobre a saúde humana e a biodiversidade, principalmente envolvendo mortalidade ou declínio populacional de espécies sentinelas (Rapport, 1989). Porém, os ambientes marinhos têm sofrido constantes impactos promovidos pelas atividades humanas, como a contaminação química, a introdução de patógenos e biotoxinas. Esta tendência histórica tem sido acompanhada por um número crescente de doenças reportadas na megafauna oceânica, o que tem levado cientistas a relacionar estes casos com a deterioração da saúde dos oceanos (Bossart, 2006; Gulland e Hall, 2007).

Um fato interessante sobre a doença de Jorge Lobo em golfinhos é que até o momento a infecção não foi descrita em golfinhos que vivem em águas correntes (fluviais) como o caso dos botos (*Inia geoffrensis*) do Rio Amazonas ou os tucuxis (*Sotalia fluviatilis*) do Rio Orenoco (Paniz-Mondolfi e Sander-Hoffmann, 2009).

Miller e Owens (1999), observaram infecção em primatas *Aotus* sp. no Peru com período de incubação de meses a anos, sintomas inespecíficos, evolução lenta e cultura para microrganismos negativa, porém a microscopia óptica e eletrônica de tecidos dos órgãos revelou células leveduriformes em macrófagos livres nos tecidos, semelhantes a *Lacazia loboi*.

1.3. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE JORGE LOBO

A doença de Jorge Lobo pode ser considerada uma micose emergente e negligenciada. É frequente em regiões tropicais e subtropicais, particularmente nas Américas do Sul e Central. No Brasil, todos os casos descritos têm origem na região amazônica (Brito e Quaresma, 2007).

A maior concentração de casos da doença de Jorge Lobo em uma comunidade ocorre entre os índios Caiabi, vivendo em áreas entre os rios Teles Pires e Tapajós no norte do Mato Grosso. É interessante ressaltar que quando esses índios foram transferidos para o Parque Nacional Indígena do Xingu, nenhum caso novo foi diagnosticado, sugerindo não haver fonte de contaminação no parque. Outras tribos indígenas que habitavam o norte do Mato Grosso não apresentavam casos da doença, sugerindo susceptibilidade genética (Baruzzi et al., 1973).

No Pará, os estudos sobre a doença de Jorge Lobo se iniciam com os trabalhos de Azevedo em sua tese de livre-docência em 1949 e os estudos de anatomia patológica de Monteiro Leite em 1954 (Lacaz et al., 2002). Monteiro Leite, em 1967, realizou auto inoculação de células leveduriformes de um paciente com doença de Jorge Lobo, por via intradérmica na face anterior do antebraço esquerdo. Transcorridos mais de 12 meses, uma pequena lesão apareceu no local da inoculação que progrediu para uma lesão de aspecto queloidiforme. A lesão apresentou melhora após 22 anos de acompanhamento e tratamento com cloridrato de prazosina (Brito e Quaresma, 2007). No Serviço de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia do Pará no período de 1955 a 2005, foram registrados 132 casos (Brito e Quaresma, 2007). Outros trabalhos realizados por Leônidas Braga e colaboradores, descrevem casos de pacientes com relação de parentesco acometidos pela doença de Jorge Lobo no município do Capim, estado do Pará (Dias, L. B., Sampaio, M. M. e Silva, D., 1970).

O Acre em 10 anos registrou no Departamento de Dermatologia Sanitária 249 casos da doença de Jorge Lobo no período de 10 anos (Woods, Belone Ade, et al., 2010). No Amazonas, alguns estudos demonstram que a prevalência de doença de Jorge Lobo pode ser até maior que a de cromoblastomicose (Talhari et al., 1980).

A doença também se distribui na Colômbia, Suriname, Venezuela, Guianas, Equador, Costa Rica, Panamá, Peru, Bolívia, México e casos importados são encontrados nos Estados Unidos, Canadá, Europa (Bermudez et al., 2009; Paniz-Mondolfi et al., 2012; Arju et al., 2014). Recentemente, casos autóctones foram relatados na África e na Grécia (Al-Daraji, Husain e Robson, 2008; Papadavid et al., 2012).

Com a elevada frequência de viagens internacionais, muitos casos de micoses endêmicas são diagnosticados em áreas não endêmicas. Nos Estados Unidos, casos de paracoccidioidomicose (América Latina), histoplasmose africana (África) e penicilose marneffeii (sudeste e extremo oriente da Ásia) tem sido diagnosticado em pacientes com história de viagem ou residência em áreas endêmicas (Disalvo, Fickling e Ajello, 1973; Shore et al., 1981; Pautler, Padhye e Ajello, 1984; Ajello e Polonelli, 1985; Piehl, Kaplan e Haber, 1988).

A doença não é de notificação compulsória, por isso a dificuldade em estabelecer o número real de casos da doença, contribuindo para dados estatísticos inconsistentes (Woods, Belone, et al., 2010). A doença de Jorge Lobo atinge qualquer grupo, porém é mais comum no sexo masculino. As mulheres são menos atingidas o que pode ser explicado pelo fato de

desenvolverem atividades domésticas ou de menor exposição ao patógeno (Brito e Quaresma, 2007).

A faixa etária mais atingida é de 20 a 40 anos de idade, porém já foi diagnosticada em indígena caiabi de cinco anos de idade (Machado e Silveira, 1966) e em adolescente de 14 anos (Woods, Belone, et al., 2010). É considerada doença profissional, pois atinge em maior número profissionais que desenvolvem atividades na agricultura (Brito e Quaresma, 2007).

1.4. O AGENTE ETIOLÓGICO

A identificação taxonômica do agente da doença de Jorge Lobo está em constante mudança e é de grande dificuldade principalmente por ainda não ter sido cultivado.

Fonseca e Area Leão (1940) propõem o nome de *Glenosporella lobo*, porém o isolado foi posteriormente identificado com *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glenosporella amazônica* foi outro isolado descrito como agente causador da doença em 1943 por Fonseca, porém foi identificado posteriormente como *Aspergillus penicillioides*, um contaminante ambiental.

Langeron e Vanbreuseghem (1952) denominam o fungo de *Blastomyces lobo* o qual é considerado uma denominação binomial inválida para ser usada para o agente causal da patologia.

Ciferri et al. (1956) propõem o nome *Loboa lobo*, proposta baseada em uma cultura de *Glenosporella lobo*, cultura identificada anos depois, como de *P. brasiliensis*.

Borelli (1968) propõe o gênero *Lobomyces* para o fungo nos tecidos, porém esta proposta foi feita como sugestão passageira, sem validade.

De Fonseca e Lacaz (1971) propuseram uma nova espécie, *Paracoccidioides lobo*, porém a proposta do nome foi invalidada, pois não incluía nesta descrição o nome em latim. Então, em 1996 Lacaz, para validar a publicação faz a descrição em latim.

Taborda et al. (1999) propõem um novo gênero para a espécie, passando a chamar-se *Lacazia lobo* em homenagem a Carlos da Silva Lacaz médico que muito contribuiu para o conhecimento da doença.

O reservatório natural do *Lacazia lobo* ainda é desconhecido, porém acredita-se estar associado ao solo, vegetação e ao ambiente aquático. Um indicativo muito forte de que o *L. lobo* apresenta habitat aquático se dá pelo número crescente de golfinhos com doença de Jorge Lobo e o aparecimento da doença em paciente na Geórgia, EUA, que havia viajado para Venezuela e tomado banho em uma cachoeira onde, foi exposto a altas pressões de água,

desenvolvendo pequenas escoriações no tórax que evoluíram para lesões queloidiformes (Burns et al., 2000; Woods, Belone Ade, et al., 2010)

Borelli (1969) determinou a “*reservaria*” do fungo, sendo região de floresta tropical, clima equatorial quente e úmido, temperatura variando de 19°C a 34°C, e pluviosidade de 1000 a 2500 mm/ano. Ao contrário dos agentes de outras micoses o *Lacazia loboi* tem sua ecologia pouco conhecida. As dificuldades de isolamento do fungo, escassos estudos da doença em animais silvestres ou domésticos, os quais podem ser considerados sentinelas epidemiológicos, dificultam o esclarecimento de muitos aspectos relacionados às características do fungo.

Embora o *L. loboi* pertença à família Ajellomycetaceae como espécie irmã do gênero *Paracoccidioides*, apresenta peculiar estilo de vida quando comparado a outros da mesma família, como a dificuldade do cultivo, causa micose subcutânea e não sistêmica tanto em humanos quanto em golfinhos. Outra característica diferencial importante entre *L. loboi* e outros membros da família Ajellomycetaceae é que o *L. loboi* possui melanina em sua parede celular quando corado por Fontana – Masson (Taborda, V. B., Taborda, P. R. e McGinnis, M. R., 1999; Vilela et al., 2009). O *L. loboi* mesmo apresentando melanina não segue a caracterização de fungo pheoide, pois suas estruturas somáticas e reprodutivas não se apresentam naturalmente coradas (Taborda, V. B., Taborda, P. R. e McGinnis, M. R., 1999).

O *L. loboi* apresenta-se a microscopia óptica com morfologia ovóide de parede refringente medindo 5 a 6 x 12 a 14 µm. Podem se apresentar isolados ou formando cadeias curtas ou longas e unidas umas às outras por um tubo conector. No histopatológico observa-se granuloma constituído por um denso infiltrado histiocitário com múltiplas células gigantes multinucleadas e epitelióides (Brito e Quaresma, 2007) (**Figura 1**).

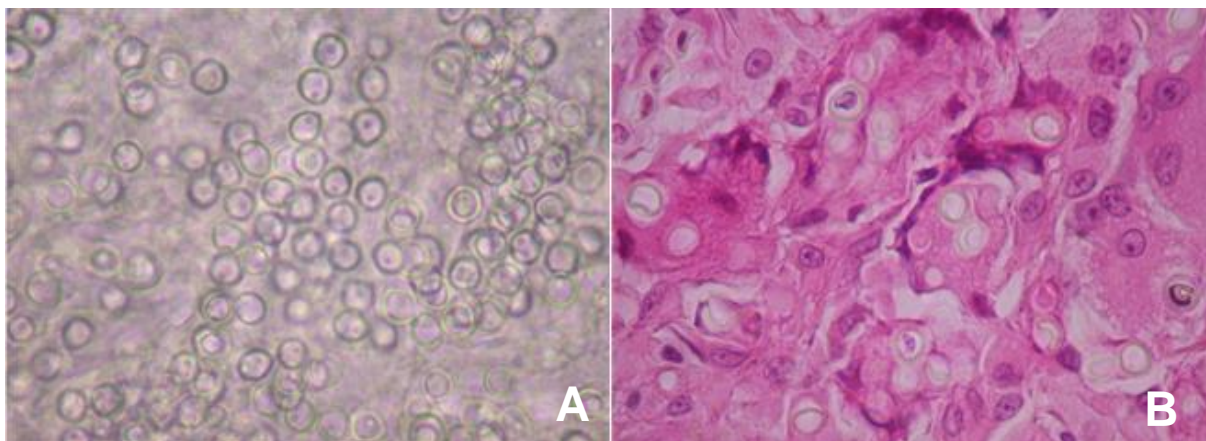


Figura 1. Características microscópicas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. O exame micológico direto mostra células leveduriformes globosas isoladas ou agrupadas e com brotamentos (A). Secção de tecido de paciente com doença de Jorge Lobo corado pela hematoxilina-eosina com células gigantes multinucleadas, fungo disperso e grande número de histiócitos (B).

Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia.

A análise de microscopia eletrônica mostra que *L. lobo* possui vários núcleos e que seu citoplasma contém mitocôndria, retículo endoplasmático, ribossomos, vesículas e gotículas de lipídios (Furtado, De Brito e Freymuller, 1967; Woodard, 1972; Sesso, Azevedo e Baruzzi, 1988; Sesso e Baruzzi, 1988). A parede celular é trilaminar com as camadas organizadas uma sobre as outras, sendo que a camada mais externa apresenta-se em placas imbricadas de aspecto eriçado, sendo por isso algumas vezes confundido a microscopia ótica com a criptoesporulação do *P. brasiliensis* (Abreu e Miranda, 1972). Furtado et al (1967) através de microscopia eletrônica sugere similaridades estruturais entre o *Lacazia lobo* e *Paracoccidioides brasiliensis*.

Desde o seu diagnóstico em 1930, várias tentativas para isolar o agente infeccioso em meio de cultura artificial estão sendo realizadas. Algumas amostras obtidas do paciente de Recife foram enviadas ao Rio de Janeiro e analisada por Fonseca Filho e outros. Outra parte foi mantida em Recife e processada para obtenção da cultura. O primeiro relato de cultivo foi realizado em 1940 do material processado por Fonseca Filho e Area Leão, identificando o fungo como pertencente à ordem aleurosporados como um fungo imperfeito, porém posteriormente esta colônia foi caracterizada como sendo de *Paracoccidioides brasiliensis*. Outras culturas obtidas desta vez por Jayme Carneiro mostrou cultura do agente parasitário desta micose, mas identificadas como *Aspergillus penicillioides* e *Sterigmatomyces halophilus*

uma levedura isolada do ar, considerando, portanto, os autores que nenhuma das culturas estava relacionada a patologia de Jorge Lobo (Fonseca e Lacaz, 1971).

Vilela et al.(2009) sugerem que o ancestral do *L. loboi* apresentava a habilidade de crescimento em meio de cultura artificial, porém perdeu esta capacidade devido sua adaptação ao parasitismo.

Salgado et al.(2009) isolaram através de método enzimático células de *L. loboi* a partir de lesão de pacientes, possibilitando com este resultado novos experimentos visando o cultivo em meios de cultura artificial, o que poderia resultar em avanços importantes no entendimento desta micose.

1.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença é clínico e laboratorial. O clínico é baseado nas características da lesão e o laboratorial na microscopia direta do agente. As principais características histológicas observadas são a formação de um granuloma constituído por um denso infiltrado histiocitário com múltiplas células gigantes multinucleadas e epitelióides, associadas a uma grande quantidade de fungos no local (Brito e Quaresma, 2007).

Estudos da imunidade humoral revelam que pacientes com doença de Jorge Lobo apresentam uma predominância no perfil de citocinas do tipo Th2 (Pecher, Croce e Ferri, 1979; Pecher e Fuchs, 1988). Na tentativa de estudar a atividade intradérmica de antígenos da doença de Jorge Lobo, foi desenvolvido a lobina, porém os testes não tiveram sucesso, uma vez que o antígeno não se mostrou específico e apresentou reação cruzada com paracoccidioomicoses e micetomas (Silva e Brito, 1994).

A impossibilidade do cultivo do agente etiológico da doença de Jorge Lobo dificulta a obtenção de antígenos próprios para serem utilizados em estudos imunológicos. Por isso a maioria dos estudos é realizada com antígenos brutos e específicos de *Paracoccidioides brasiliensis*, pois o *L. loboi* apresenta antígenos comuns a algumas cepas de *P. brasiliensis*, assim como com outras leveduras como, por exemplo, o *Histoplasma capsulatum*, *Histoplasma duboise*, *Candida albicans* e formas filamentosas de *Coccidioides immitis* (Silva, Kaplan e Miranda, 1968).

Camargo et al.(1998) mostraram que soros de pacientes com doença de Jorge Lobo reconhecem a glicoproteína imunodominante de 43 kDa (gp43) de *Paracoccidioides brasiliensis* tanto no exoantígeno bruto, quanto a gp 43 purificada. Além desta, outras proteínas como a de 29 kDa, 36kDa, 39kDa, 52kDa, 63kDa, 70kDa, 83kDa e 108kDa foram

reconhecidas, porém com baixa frequência e intensidade. Em relação ao *L. loboi*, Mendoza e colaboradores 2008 utilizando a técnica do western blotting descrevem um antígeno imunodominante de 193 kDa de *Lacazia loboi* utilizando soros humanos e de golfinhos, e sugerem que os golfinhos são infectados com cepa similar àquelas que infectam humanos. Demonstra ainda, que o *L. loboi* apresenta imunógenos diferentes do *P. brasiliensis* (Mendoza et al., 2008). O estudo molecular dos antígenos descritos, e principalmente do antígeno imunodominante de 193 kDa, poderá gerar no futuro informações importantes para o melhor entendimento imunológico e sorológico da doença, além do avanço em estudos epidemiológicos e terapêuticos.

Os métodos moleculares são ferramentas importantes e amplamente utilizadas para o estudo da biodiversidade e identificação dos fungos. Uma das grandes dificuldades relatadas por alguns autores no estudo molecular do *L. loboi* se refere ao fato de que no material biológico procedente dos pacientes o fungo não estar viável, pois após a retirada do material o fungo libera proteases e endonucleases que destroem o material genético. Assim, somente coletas a fresco seguida da imediata extração do DNA, obtiveram sucesso em estudos moleculares (Herr et al., 2001; Mendoza, Ajello e Taylor, 2001; Vilela et al., 2005; Vilani-Moreno e Opromolla, 1997).

Vilela et al (2005) amplificou 483 pb do gene que codifica a proteína gp-43 do *L. loboi*. Esses autores encontraram 85% de identidade de nucleotídeos e 75% de semelhança com a sequência de aminoácidos da proteína gp-43 do *P. brasiliensis*. Esta análise levou a confirmação da proximidade filogenética entre esses fungos.

Haubold et al (1998) através da técnica do PCR analisou material biológico proveniente de golfinho, e usando primers específico, o qual marca sequências altamente conservada no ácido nucléico genômico, mostrou que a sequência DNA exibe alinhamento e alta homologia com sequências encontradas no fungo do gênero *Cladosporium*, sugerindo que o agente encontrado nas lesões em golfinhos é de fato fungo.

Técnicas moleculares recentes utilizando a amplificação da subunidade 18S do DNA ribossomal (SSU rDNA) e 600 p.b.do gene da quitina sintetase-2 (CHS-2) do DNA genômico de células leveduriformes demonstrou que o *Lacazia loboi* tem relação filogenética com membros da ordem Onigenales onde estão agrupados o *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomices dermatitidis* (Herr et al., 2001; Vilela et al., 2005). Dados filogenéticos suportam que *L. loboi* seja espécie isolada de todas as espécies

filogeneticamente conhecidas de *Paracoccidoides brasiliensis* (Matute et al., 2006; Carrero et al., 2008; Vilela et al., 2009).

A lacuna de conhecimento que existe em relação à doença de Jorge Lobo muito se deve a dificuldade de cultivo do seu agente etiológico, que impede a disponibilidade de material biológico para estudos “*in vitro*” nas diferentes áreas, como imunologia, taxonomia, genética e da biologia do agente. A partir deste conhecimento novos caminhos se abrem para o tratamento e compreensão desta micose que se apresenta como doença emergente na região amazônica e em algumas partes do mundo, que causa lesões com características peculiares que pode tornar o indivíduo incapacitado para exercer suas atividades diárias, além de comprometer a auto estima.

2. OBJETIVO

2.1. GERAL

Isolar, cultivar e caracterizar a morfologia, fisiologia e o genoma de amostras do agente etiológico da doença de Jorge Lobo em humanos.

2.2. ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Compilar a distribuição dos casos de pacientes e golfinhos com doença de Jorge Lobo no mundo, até o ano de 2015.
- 2.2.2. Caracterizar o perfil demográfico, clínico e a terapêutica dos pacientes com doença de Jorge Lobo atendidos na Unidade de Referencia Marcello Candia.
- 2.2.3. Isolar amostras do agente etiológico da doença de Jorge Lobo a partir de lesões humanas.
- 2.2.4. Analisar a viabilidade dos isolados *in vitro* por inoculação em animal de experimentação.
- 2.2.5. Cultivar amostras do agente etiológico da doença de Jorge Lobo em meios de cultura artificiais.
- 2.2.6. Caracterizar macro e microscopicamente os isolados cultivados em meios de cultura artificiais.
- 2.2.7. Descrever a morfologia ultraestrutural do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.
- 2.2.8. Traçar o perfil exoenzimático e bioquímico do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.
- 2.2.9. Descrever o perfil proteico ou glicoproteico de isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.
- 2.2.10. Sequenciar o genoma de células leveduriformes recém-isoladas e obtidas um paciente com a doença de Jorge Lobo.

3. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CASOS CLÍNICOS

A descrição dos 23 casos foi realizada baseado no acompanhamento e análise dos registros clínicos de todos os pacientes que foram atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia no período de 8 anos. Os dados coletados de cada paciente foram: idade, sexo, procedência, local da lesão, atividade profissional e tratamento.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico foi obtido da coleta dos pacientes atendidos na Unidade Referência em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia (URE Marcello Candia), no município de Marituba, estado do Pará, e estão conservados no Laboratório de Dermatologia e Imunologia (LDI). O material biológico foi coletado da lesão com *punch* de 8 mm. Após a coleta, o material foi levado para o LDI, para processamento. A partir deste material foi realizado o exame micológico direto com KOH a 30%, exame histopatológico com hematoxilina e eosina, e prata metanamina-Gomori, isolamento enzimático, caracterização morfológica, fisiológica e análise molecular.

Dos 23 pacientes atendidos, dois não realizaram biópsia (foram diagnosticados pelo exame micológico direto, mas não retornaram para realizar o procedimento). Foi também utilizado material biológico de quatro índios provenientes do Parque Indígena do Xingu, coletado pela mesma técnica e gentilmente cedido pelos médicos da UNIFESP, Marcos Floriano e Jane Tomimori.

Foram utilizados como controle cepas de *Candida albicans* (INCQS 40041), *Candida tropicalis* (INCQS 40096) provenientes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Osvaldo Cruz (INCQS), além de uma cepa de *Cryptococcus sp* isolada de um paciente da URE Marcello Candia e utilizada como controle positivo no teste do meio ágar niger e uma de *Paracoccidioides brasiliensis* isolada de um paciente do Instituto Evandro Chagas, utilizada como controle no gel de SDS-PAGE.

3.3. ISOLAMENTO ENZIMÁTICO

O isolamento enzimático foi realizado a partir da biópsia de lesões de 25 pacientes de doença de Jorge Lobo seguindo o protocolo descrito por Salgado et al., 2009. Cada peça de

tecido foi fragmentada com lâmina de bisturi, inserida e um tubo de polipropileno do tipo Falcon contendo soro fisiológico acrescido de 10.000 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina por 30 minutos e realizando sucessivas lavagens. Depois deste período o material foi transferido para um tubo novo contendo 9 ml de meio RPMI1640 (Sigma, St Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Life Technologies, USA), 10.000 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma, St Louis, USA), 40 mg/ml de gentamicina e 1 ml (3.000 U/ml) da enzima dispase II (Roche, Indianopolis, USA). O material foi incubado por um período de 5 a 10 dias a 37°C, 5% CO₂, e após este período a solução foi centrifugada (1.500 rpm/3min, por três vezes) para eliminar o restante de tecido. Cada “pellet” foi transferido para um novo tubo, lavado em solução salina, centrifugado (3.000 rpm/3min, por três vezes), e transferido para um novo tubo com RPMI a 37°C, 5% CO₂. Ao isolamento inicial das células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo denominamos de recém-isolado (**Figura 2**).

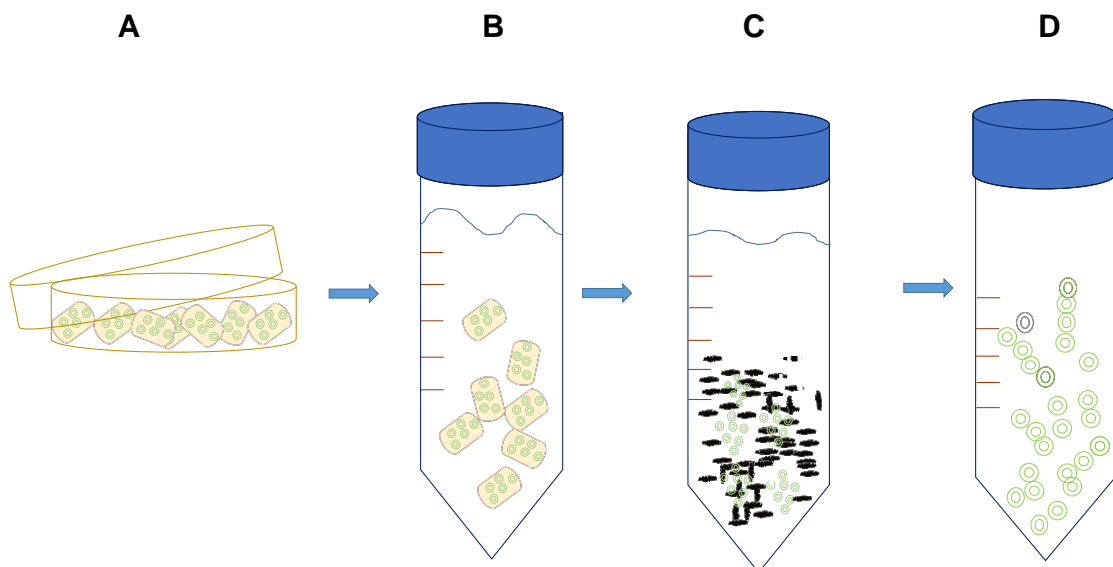


Figura 2. Isolamento enzimático de células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo a partir de lesões de pacientes. Fragmento de tecido coletado com punch 8mm (A). Fragmento de tecido macerado lavado por 30 minutos em soro fisiológico com antibiótico (B). Tecido macerado incubado RPMI1640 suplementado com 10% SFB e antibiótico e dispase II a 37° C em estufa de 5% CO₂ por um período de 5 a 10 dias (C). Células recém-isoladas obtidas após ação enzimática por pelo menos 10 dias e após sucessivas lavagens com soro fisiológico (D).

Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia.

3.4. INOCULAÇÃO EM PATA DE CAMUNDONGO

Cinco camundongos isogênicos Balb/c fêmeas com 6 semanas de vida foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB – UNICAMP, São Paulo) e mantidos em racks ventilados IVC (Individually Ventilated Caging, ALESCO, São Paulo) no Laboratório de Dermatologia. As inoculações foram realizadas como previamente descrito por Belone, 2002 (Belone et al., 2002) com algumas modificações. Resumidamente, os animais foram inoculados na pata traseira esquerda com uma seringa de 0,1cc com agulha acoplada (Ultra-fine II, BD, Brasil), contendo 5×10^6 células fúngicas em 0,1ml de soro fisiológico de células provenientes do paciente 18316(cepa LDI18316), logo após o isolamento enzimático. Os camundongos foram mantidos nas caixas ventiladas até serem sacrificados, 12 meses após a inoculação.

As patas inoculadas foram removidas e colocadas em formol a 10% até processamento para preparação dos blocos de parafina. Em seguida, após os cortes no micrótomo, as lâminas foram desmineralizadas, preparadas e coradas com hematoxilina-eosina, ácido periódico-Schiff (PAS) e metenamina de prata (Gomori-Grocot).

3.5. CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA ARTIFICIAL APÓS O ISOLAMENTO

Imediatamente após o isolamento com Dispase II, 40 μ L ($1,5 \times 10^8$ células) de células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo recém-isoladas foram repicadas para os meios de cultura ágar Sabouraud-dextrose (Difco Laboratories USA), ágar infusão cérebro- coração (Difco Laboratories USA), suplementado com 10% SFB (Gibco, Life Technologies, USA) e ágar Fava Netto e maridas em estufa com 5% CO₂ a 37⁰ C e a temperatura ambiente (25⁰ C – 27⁰ C) por um período de até 30 dias. Foram realizados também repiques para placas de cultura de 24 poços (TPP, Alemanha) contendo RPMI1640 suplementado com 10% SFB e Caldo Fava Netto, as culturas foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ mantidas por um período de 1 a 6 meses, as culturas foram retroalimentadas durante todo o período de observação (**Figura 3**).

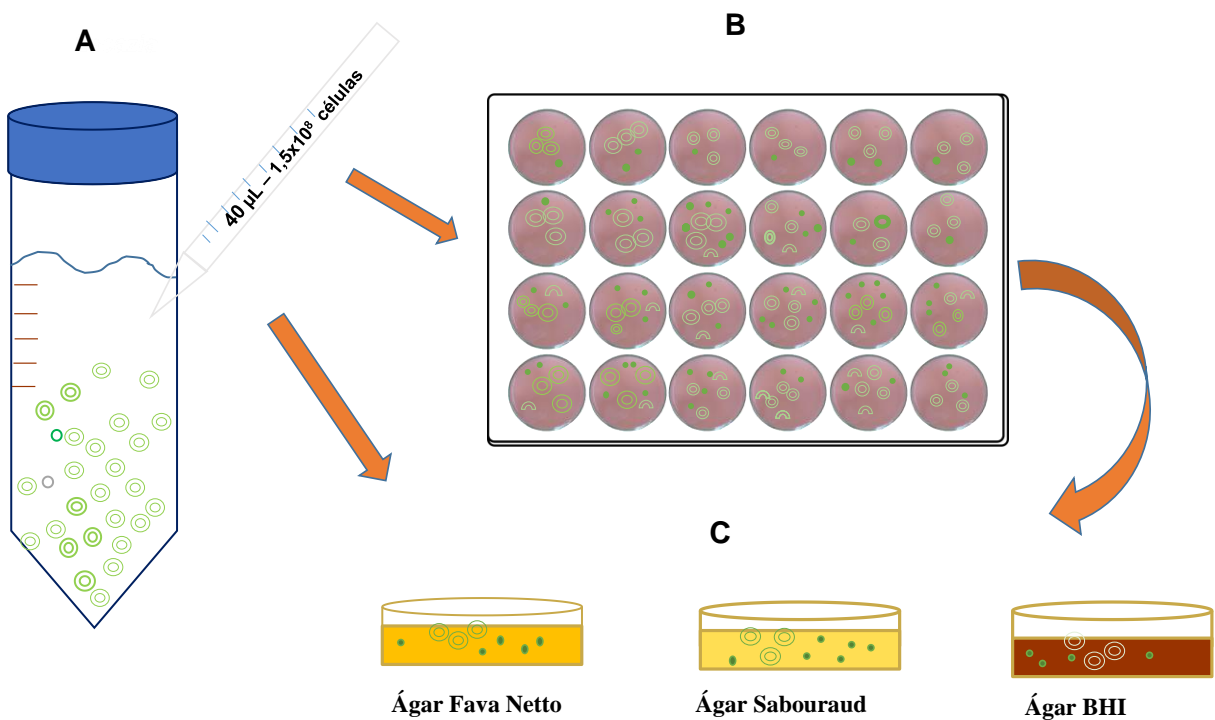


Figura 3. Células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo recém-isoladas pelo método enzimático e cultivadas em meios artificiais. Células recém-isoladas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo obtida pelo método enzimático (A). Placa de cultura de célula contendo meios líquidos, o RPMI 1640 suplementado ou Caldo Fava Netto semeado com 40 µL ($1,5 \times 10^8$ células) e incubadas a 37° C em estufa com 5% CO₂ por até 6 meses (B). Placas de Petri contendo meios sólidos como o Ágar Fava Netto, Ágar Sabouraud e Ágar BHI semeadas com 40 µL ($1,5 \times 10^8$ células) mantidas em estufa com 5% CO₂ a 37° C e a temperatura ambiente (25° C – 27° C) por até 30 dias (C).

Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia.

3.6. CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS

A partir de culturas em meio líquido rpmi1640 5% SFB, 37° C, 5% CO₂, 1.5x10⁸ células (0.5 de McFarland) foram repicadas para ágar Fava Neto, ágar Sabouraud-dextrose (Difco Laboratories USA) e ágar infusão cérebro- coração (Difco Laboratories USA) e mantidas a 37° C e a temperatura ambiente (25° C– 27° C). A caracterização foi realizada 10 dias após a semeadura e foi baseado nos seguintes critérios: tamanho da colônia utilizando paquímetro (ABSOLUTE, DIGIMATIC – Mitutoyo Products, Japão); velocidade de crescimento das colônias: rápida (<4 dias), média (4-10 dias), lenta (>10 dias); modo de desenvolvimento das colônias, limitado ou invasor; textura da superfície da colônia (lisa, radiada, cerebriforme, etc); quantidade de micélio aéreo (colônias glabras, penugentas, lanosas, cotonosas); coloração das colônias e; presença de pigmento capaz de se difundir no meio de cultura (Sidrim e Rocha, 2004).

3.7. CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS CÉLULAS FÚNGICAS: MORFOMETRIA

As características micromorfológicas dos 25 isolados foram descritas a partir das células leveduriformes obtidas da cultura do fungo em ágar Sabouraud-dextrose à temperatura ambiente (25° - 27° C) e à 37° C. Para identificação e caracterização em meio sólido foi utilizada a técnica do microcultivo em lâmina (Riddell, 1950). As células crescidas em meio sólido por 10 dias foram coradas com lactofenol azul de algodão permitindo observar a morfologia e organização das estruturas fúngicas. Para medida morfométrica, dez campos microscópicos foram escolhidos aleatoriamente para serem analisados em microscopia óptica e cerca de 10 células foram medidas em cada campo microscópico. As imagens foram obtidas em câmera acoplada ao microscópio (MRC 13 Mega Pixels, Carls Zeiss, Alemanha).

3.8. CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS FÚNGICAS

3.8.1. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras fúngicas recém-isoladas ou após cultivo em meio líquido foram lavadas em tampão PBS, pH 7.2 e fixadas a overnight a 4° C em solução contendo 1% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M e pH 7.2. Após esse período, as células foram aderidas em lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina e novamente lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução contendo 1% de tetróxido de

ósio (OsO_4), 0,8% de ferricianeto de potássio 5mM, CaCl_2 5mM em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 à temperatura ambiente por uma hora, lavadas em PBS e posteriormente desidratadas em uma série de acetona em água a 20, 30, 50, 70, 90% e 100%, com tempo de 30 minutos para cada etapa e duas vezes em etanol 100% e passadas por um processo de secagem por ponto crítico de CO_2 . A seguir as lamínulas foram fixadas em suporte para amostra (“stub”), recobertas com ouro (aproximadamente 2nm de espessura), as amostras foram metalizadas com ouro coloidal no Emitech K550 – England, posteriormente foram observadas em Microscópio eletrônico de varredura Leo 1450VP.

3.8.2. Microscopia eletrônica de transmissão.

As células fúngicas obtidas após o cultivo em meio líquido foram fixadas à temperatura ambiente por 2 horas em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M e pH 7,2. Após 2 horas de fixação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e pós-fixadas em solução contendo 1% OsO_4 , 0,8% de ferricianeto de potássio e 5mM CaCl_2 em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 à temperatura de 4°C por uma hora. Após esse período, as células foram novamente lavadas 3 vezes no mesmo tampão e desidratadas com passagem em uma sequência de acetona a 30, 50, 70 e 90%, com tempo de 20 minutos para cada etapa e duas vezes 20 minutos em acetona 100%. Após desidratação, as células foram infiltradas com uma mistura epon/acetona na proporção 1:3, 1:2, 1:1, 2:1 e 3:1, respectivamente, por 12 horas e em epon puro por 24 horas. Após polimerização em epon por 48 horas, cortes ultrafinos foram obtidos e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 900, Alemanha).

3.9. PERFIL BIOQUÍMICO DAS CÉLULAS LEVEDURIFORMES OBTIDO PELO SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK 2

Após crescimento prévio de 2 dias em ágar Sabouraud-dextrose a 37° com alça em gota, foi preparada uma suspensão da levedura em 3 mL de solução salina estéril (NaCl aquoso de 0,45 a 0,50% e pH 4,5 a 7,0) em tubos (75 x 12 mm) de poliestireno transparente, com uma densidade equivalente ao padrão Mc Farland nº 1,8 a 2,2 usando o calibrador VITEK 2 *DensiChek*. Dez isolados de agente etiológico da doença de Jorge Lobo foram caracterizados pelo sistema Vitek 2, utilizando os cartões do Vitek 2 yeast (ID-YST),

seguindo recomendações do fabricante (VITEK® 2 System, biomérieux,MO USA). O método consiste em 46 testes bioquímicos avaliando a assimilação de fonte de carbono, atividade enzimática e resistência. Foi utilizado como controle cepa de *Candida tropicalis*.

3.10. TESTE DE IDENTIFICAÇÃO EM MEIO SELETIVO: CHROMagar® Candida (CHROMagar, Difco, França) E ÁGAR NIGER

CHROMagar candida é um método de identificação de levedura sensível e específico estimado em 99% de segurança. A identificação é baseada, após a semeadura, na alteração da coloração e aspectos do crescimento do isolado a ser identificado após 48 h a 37°C. O CHROMagar candida é um meio constituído por diferentes substratos cromogênicos que são degradados pela ação de diferentes enzimas que alteram a cor dos meios.

O ágar niger foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Paliwal e Ranghava (1978). É o meio utilizado para identificação de *Cryptococcus neoformans*, baseando-se na capacidade de produzir a enzima fenoloxidase quando na presença da tirosina e ácido clorogênico contido em semente de *Guizotia abyssinica* fornecendo ao meio uma pigmentação castanha (Paliwal e Randhava, 1978).

Amostras dos isolados foram semeadas em ágar niger e incubadas a 37° C e observadas diariamente até o décimo dia. A produção de melanina é evidenciada pela coloração marrom a negra das colônias. Foram utilizados três (03) isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo e cepa *Cryptococcus* como controle positivo.

3.11. ATIVIDADE EXOENZIMÁTICA DAS CÉLULAS FÚNGICAS

O perfil enzimático de 5 (cinco) isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo foi obtido a partir das provas de gelatinase, lipase, urease, desoxirribonuclease, caseinase, fosfolipase, proteinase e homolisinas, conforme descrito abaixo. Quarenta microlitros de uma suspensão de células leveduriformes (1.5×10^8 células 0.5 McFarland) foram inoculados nos meios de prova.

1. Gelatinase

A produção da gelatinase foi avaliada semeando-se o fungo em meios de cultura contendo gelatina a 12%.

Extrato de carne..... 3 g
Peptona 5 g
Gelatina..... 120 g
Água destilada..... 1000 mL pH 7.

O meio foi distribuído em tubos de ensaio, autoclavados a 121° C, por 15 minutos e mantidos a 25°C. Após cultivo, os tubos foram incubados a 4° C por 60 dias. Um tubo contendo somente o meio (não semeado) foi utilizado como controle negativo. Para verificação da hidrólise da gelatina foi considerado meio liquefeito como prova positiva e meio não liquefeito como prova negativa após 60 dias de cultura (Kurtzman e Fell, 1998).

2. Lipase

A análise foi realizada em meio contendo:

Peptona bacteriológica..... 10 g
NaCl5 g
CaCl₂.....0,1 g
Ágar Base..... 20 g
Tween2010 mL
Água destilada.....1000 mL

O meio foi autoclavado a 121° C por 15 minutos. Após o semeio, a placa foi incubada a 27°C durante 10 dias. Foram consideradas produtoras de lipases as amostras capazes de produzir um halo opaco ao redor da colônia (Muhsin, Aubaid e Al-Duboon, 1997).

3. Urease

Foi utilizado o meio de cultura ágar ureia de Christensen, autoclavado a 121°C por 20 minutos e resfriado e acrescentado 50 mL de solução estéril de Uréia a 40%, conforme o protocolo de (Christensen, 1946). Os isolados foram inoculados e incubados a 25° C por 7 dias. A produção de urease foi avaliada pela mudança de cor do meio, que passa de amarelo para uma tonalidade rosa-avermelhado.

4. Desoxirribonuclease (DNase)

A produção de DNase extracelular foi avaliada inoculando uma alíquota das colônias fúngicas no meio Agra teste DNase base (Difco, BD, USA). Após 7 dias de incubação a 25° C, foi pulverizado nas placas solução de Azul de Toluidina (100 mg de Azul de Toluidina, 1000 mL de água destilada), procedendo-se à observação quanto à presença ou ausência de um halo de degradação ao redor da colônia. Este halo foi identificado como um círculo transparente ao redor da colônia em contraste com o restante da placa, caracterizando a produção da enzima DNase. A ausência do halo indica teste negativo (Lopez-Martinez et al., 1994).

5. Caseinase

Para este ensaio, os isolados foram semeados em placas contendo o meio de cultura ágar Caseína:

Meio I:

Leite desnatado..... 10 g
Água destilada.....100 mL

Meio II:

Ágar Base2 g
Água destilada.....100 mL

Os meios foram autoclavados separadamente, resfriados e misturados e incubados a 25° C. A hidrólise é verificada após a formação de um halo em torno da colônia.

A análise dos resultados foi realizada pelo cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro mais o halo produzido (dcd), proposta por (Price, Wilkinson e Gentry, 1982). Esta razão representa a atividade enzimática da caseinase (CZ).

$$CZ = dc \div dcd$$

Segundo (Price, Wilkinson e Gentry, 1982):

$CZ = 1,0$; indica que o microrganismo não é produtor da enzima;

$CZ \geq 0,64 < 1$; indica que o microrganismo é positivo, produtor da enzima;

$CZ < 0,64$; indica que o microrganismo é fortemente positivo, produtor de enzima.

O diâmetro da colônia foi medido com o paquímetro (ABSOLUTE, DIGIMATIC – Mitutoyo Products, Japão)

6. Fosfolipase

A capacidade de produção de fosfolipase foi detectada pela técnica preconizada por (Price, Wilkinson e Gentry, 1982). A análise foi realizada em meio de cultura preparado conforme abaixo descrito:

Meio de emulsão de ovo:

Gema de ovo.....16 g

Solução fisiológica estéril.....16 mL

Os ovos foram criteriosamente lavados em água corrente e deixados de molho em álcool a 70% por 60 minutos. As gemas foram homogeneizadas, misturadas à solução fisiológica, filtradas em gaze estéril e acrescentadas ao meio ágar fosfolipase resfriado.

Meio Ágar fosfolipase:

Peptona bacteriológica.....2 g

Glicose4 g

Cloreto de sódio..... 11,46 g

Cloreto de cálcio..... 0,11 g

Ágar Base4,9 g

Água destilada..... 200 mL

O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121° C e resfriado e acrescentado o meio de emulsão de ovo.

As amostras cultivadas por 24 horas a 37°C em ágar Sabouraud-Dextrose foram inoculadas em placa de Petri, contendo meio de cultura ágar fosfolipase enriquecido com a emulsão de gema de ovo. As placas testes foram incubadas a 37° C, e a leitura foi realizada no décimo dia. A análise foi realizada da mesma maneira da atividade de caseinase.

7. Proteinase

Amostras cultivadas por 24 horas a 37° C em Sabouraud-Dextrose inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura ágar Proteinase (Ruchelet al., 1992), preparado conforme segue:

Meio I:

Ágar Base (Merck, Alemanha)	18 g
Água destilada	900 mL

Meio II:

Yeast Carbon Base	11,7 g
Albumina bovina- Fração V (Sigma, EUA)	2 g
Protovit® (Roche, Brasil)	2,5 mL
Água destilada	100 mL

O meio I foi autoclavado por 15 minutos a 121° C e resfriado a 50° C. O meio II foi filtrado em millipore 0,45 µm e acrescentado ao meio I.

As placas testes foram incubadas a 37° C, e a leitura foi realizada no décimo dia. A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo transparente ao redor das colônias. A detecção da produção da proteinase e a medida desta atividade seguem Price e colaboradores (Price, Wilkinson e Gentry, 1982).

8. Hemolisina

A atividade hemolítica *in vitro* foi avaliada seguindo o ensaio descrito por (Furlaneto- Maia et al., 2008), com modificações. Os isolados foram semeados (1.5×10^8 células 0.5 McFarland) em Ágar sangue base (HIMEDIA), acrescido por meio de centrifugação de 7% de sangue de carneiro e incubados por 48 horas a 37°C. A hemólise foi classificada como fraca (+), média (++) , forte (+++) ou muito forte (++++). A intensidade da hemólise é obtida pela razão: $(\text{halo} + \text{colônia})/2$, sendo H a medida em mm do halo interno translúcido somado ao do halo externo marrom-esverdeado e o C o diâmetro da colônia (Furlaneto- Maia et al., 2008).

3.12. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) PARA OBTER O PERFIL PROTEICO DE ANTÍGENO BRUTO DAS CÉLULAS FÚNGICAS CULTIVADAS

O gel para eletroforese vertical foi preparado segundo (Laemmli, 1970), em uma cuba de eletroforese vertical para mini gel (GibcoBRL, modelo Mini 8.10), constando de um gel de separação linear a 10 % de acrilamida e um gel de empilhamento a 3 % de acrilamida, polimerizado entre 2 placas de vidro separadas por espaçadores de 1,5 mm de espessura. Um pente com 10 canaletas para molde foi utilizado para a aplicação das amostras.

Os géis foram preparados a partir de soluções de reagentes nas seguintes proporções conforme a **tabela 1**.

Tabela 1. Soluções e reagentes para preparação do gel de SDS-PAGE.

<i>Solução Estoque</i>	<i>Gel de Separação (10 %)</i>	<i>Gel de Empilhamento (3 %)</i>
Acrilamida-Bisacrilamida (30 % : 0,8 %)	5 mL	0,65 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3,75 mL	X
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	X	1,25 mL
Água Bidestilada	6,25 mL	3,05 mL
Persulfato de Amônia a 10 %	50 µL	25 µL
N,N,N',N'-Tetrametilenodiamino	10 µL	5 µL

1. Preparo das amostras

Volumes contendo 5 µg de proteínas de cada amostra de antígeno bruto e da preparação tipo CFA foram suspensos individualmente em tampão de amostra (Tris-HCl 1 M, pH 6,8; 20 % de SDS; 10 % de glicerol; 0,1 % de azul de bromofenol), adicionados de 2-mercaptoetanol a 5 %, como agente redutor, no momento do uso. As amostras foram fervidas por 3 minutos e aplicadas nas canaletas do gel.

Paralelamente, um padrão de peso molecular foi colocado em cada gel. O padrão de peso molecular utilizado constitui de uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas que variam de 15kDa, a 220kDa. (Invitrogen)

2. Condições de corrida eletroforética

A corrida eletroforética foi realizada a 100 W até que o corante azul de bromofenol chegue até o fim do gel usando tampão de corrida (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; 0,1 % de SDS e pH final 8,3).

3. Preparação da Solução

Tampão de Corrida (pH 8,3-8,5)

TRIS BASE	30,285g
GLICINA.....	144,134g
DODECIL SULFATO DE SÓDIO.....	10g
ÁGUA DESTILADA q.s.p.....	1000mL

4. Coloração pela prata

Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com água bidestilada e corado pela prata, obedecendo as seguintes etapas:

1. Metanol 50 % + Ácido acético 12 % + Formaldeído 0,01 %...15 min.
2. Água bidestilada.....5 min.

3. Etanol 50%.....10 min.
4. Etanol 50%.....10 min.
5. Etanol 50%.....10 min.
6. Água bidestilada.....5 min.
7. Tiosulfato de sódio 0,2 g/L.....10 min.
8. Água bidestilada.....5 min.
9. Nitrato de prata 2 g/L + 700 µL de Formaldeído a 37%10 min.
10. Água bidestilada.....5 min.
11. Carbonato de sódio 60 g/L + Tiosulfato de sódio 4 mg/L + 500µL de Formaldeído a 37 %até revelar as bandas.
12. Água bidestilada.....5 min.
13. Metanol 50 % + ácido acético 12 %.....5 min.
14. Metanol 50 %.....2 min.
15. Água bidestilada.....5 min.

Todos os reagentes foram dissolvidos em água bidestilada e cada etapa realizada sob agitação leve.

3.12.1. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO

- Exoantígeno bruto

Uma suspensão de 3mL de células dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (padrão 0.5 da escala de McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ células) foi semeada em 30 mL de caldo YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) e mantida sob agitação constante (50 rpm), a 37°C durante 7 dias. Após este período, para verificar se houve contaminação bacteriana, foi preparado um esfregaço e corado pelo Gram e observado ao microscópio óptico. As culturas foram mortas com adição de mertiolato de sódio. A seguir as células foram separadas do fluido sobrenadante por filtração. O filtrado foi concentrado por evaporação a vácuo a 40°C e deslizado por 48 horas.

3.13. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE - FISH (FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION)

Inicialmente, as células leveduriformes recém-isoladas foram marcadas com calcofluor (10% KOH e 1% calcofluor, Sigma-Aldrich, MO, USA) e com faloidina-rodamina (50µg/ml, Faloidina-TRITC, Sigma-Aldrich, MO, USA) de acordo com instruções do fabricante, para em seguida realizar o protocolo de hibridização. O calcofluor apresenta fluorescência azul e tem afinidade pela quitina (Harrington e Hageage, 2003), marcando a parede do fungo, enquanto que a faloidina é uma toxina fúngica que se liga a F-actina do citoesqueleto (Chazotte, 2010).

O gene *C-MYC* (de *cell myelocytomatosis*), originalmente identificado como homólogo celular do oncogene retroviral *V-MYC* (de *viral avian myelocytomatosis*), é um gene-chave implicado na regulação de várias atividades biológicas como o crescimento e divisão celular, progressão do ciclo celular, metabolismo, apoptose, perda de diferenciação e tumorigênese. Núcleos do agente etiológico da doença de Jorge Lobo foram hibridados com sonda única diretamente marcada para a região do gene *C-MYC* *Vysis LSI Spectrum Green Probe* e *Vysis LSI Spectrum Orange Probe*. O protocolo utilizado foi o de Pinkel et al (1986) (Pinkel, Straume e Gray, 1986) com modificações (Calcagno et al., 2005). As etapas da hibridização estão descritas de forma detalhada na **Tabela 2**. A hibridização foi visualizada por microscópio de fluorescência Olympus BX41 com filtro triplo DAPI/FITC/TRITC e um sistema captura e análise de imagem Applied Spectral Imaging® (**Figura 4**).

Tabela 2. Etapas da Hibridização fluorescente *in situ*.

Etapa	
Preparação da lâmina	<ul style="list-style-type: none">- Lavagem em 2xSSC, TA^a, por 2'.- Desidratação em etanol 70%, 80% e 95% , TA^a, 2'cada.- Secagem ao ar livre.
Preparação da sonda	<ul style="list-style-type: none">- Remoção do -20°C para TA^a, uniformizar.- 10 µL /test, sendo 3µL cada sonda + 7 µL solução de hibridização (Hibrizol).
Desnaturação	<ul style="list-style-type: none">- Pré-aquecer lâmina a 37°C por 5'.- Aplicar 10 µL de sonda, 24 x 24 mm.- Selar com cimento rubber.- Amostra e sonda em placa quente à 75°C por 2'.
Hibridização	<ul style="list-style-type: none">- De 1h até overnight, 37°C, em câmara úmida, sem luz.
Lavagem pós-hibridização	<ul style="list-style-type: none">- Remover lamínula, tirar todo cimento.- Lavar lâmina em 0,25X SSC, 72°C, pH7, 2' sem agitar.- Lavar lâmina em 2X SSC/0,05% Tween 20, TA^a, pH 7, 30" sem agitar.
Contra-coloração	<ul style="list-style-type: none">- Aplicar 10 µL de DAPI/Antifade.- Aplicar lamínula, manter no escuro por 10'.

^{TA} - Temperatura ambiente.

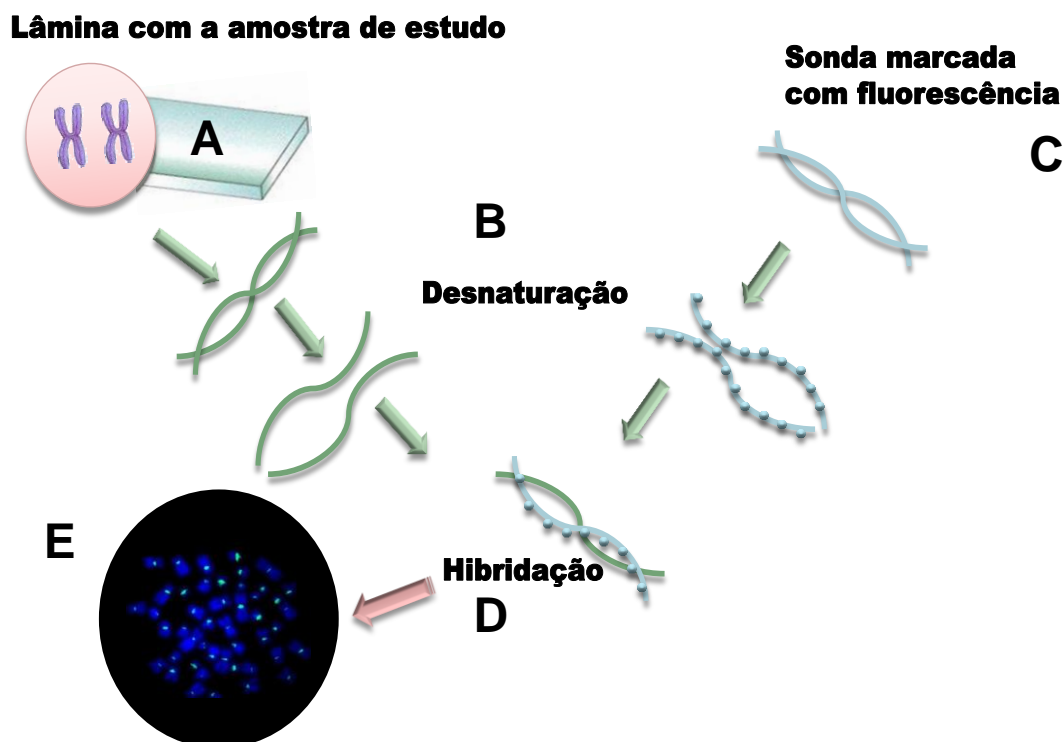


Figura 4. Principais etapas da Hibridização fluorescente *in situ*. Lâminas com amostra do fungo agente causador da doença de Jorge Lobo (A). Co-desnaturação do DNA de interesse e da sonda (B e C). Hibridização do DNA de interesse e da sonda (D). Visualização em microscópio de fluorescência (E).

FONTE: Laboratório de Dermato-Imunologia.

3.14. EXTRAÇÃO DE DNA DE CÉLULAS LEVEDURIFORMES RECÉM-ISOLADAS, OBTIDAS DE PELE LESIONAL DE UM PACIENTE DE DOENÇA DE JORGE LOBO

Os processos de extração e sequenciamento de DNA foram realizados no laboratório de genética de microrganismos da UFPA. Para caracterização molecular foi realizada extração de DNA genômico de células leveduriformes recém- isoladas pelo método enzimático e obtidas de biópsia do paciente nº 48194.

A extração do DNA das células leveduriformes recém isoladas de biópsia foi realizado utilizando Kit de extração IQ (DNA IQ™ System Promega) seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de DNA extraído foi medida por espectrofotometria (Qubit, Invitrogen USA).

3.15. SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE CÉLULAS LEVEDURIFORMES ISOLADAS PELO MÉTODO ENZIMÁTICO

O DNA genômico das células leveduriformes foi submetido ao sequenciamento de acordo com o protocolo disponibilizado para ION Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation (Life Technologies), utilizando o kit ION Xpress™ Plus fragment Library. A fragmentação do DNA foi realizada pela enzima ION Shear Enzyme Mix II, obtendo-se fragmentos de ~400 pares de bases (pb), sendo estes purificados com Agencourt AMPure XP reagent (Beckman) e em seguida depositados em um chip de 318v2 de acordo com o protocolo ION PGM™ Sequencing 400 kits para realização do sequenciamento no equipamento Ion Torrent PGM™.

3.15.1. MONTAGEM E ANOTAÇÃO FUNCIONAL DO GENOMA DE CÉLULAS LEVEDURIFORMES

Para se obter uma maior confiabilidade na montagem do genoma, os dados obtidos no sequenciamento foram submetidos a avaliação de qualidade das bases utilizando o programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A montagem foi feita por abordagem *de novo* usando-se os programas Mira (<http://sourceforge.net/projects/mira-assembly/>) e SPADES (Bankevich et al., 2012) e parâmetros *default* para obtenção de sequências contíguas (*contigs*), que constituem o *draft* do genoma.

A anotação do *draft* do genoma foi feita de forma automática e visou identificar elementos estruturais como CDs (*coding sequences*), ou seja, exons, rRNA (RNA ribossomal) e tRNA (RNA transportador) com o uso de alguns programas de bioinformática, como: *web server* Augustus (Stanke et al., 2004), RNAmmer (Lagesen et al., 2007) e tRNAscan-SE (Schattner, Brooks e Lowe, 2005), respectivamente.

As CDs preditas foram submetidas ao programa Blast2GO (www.blast2go.org/) a fim de inferir informações biológicas através da utilização de um banco de dados de ontologia gênica (GO), inserindo-as em um contexto celular como: funções moleculares, que descrevem o papel bioquímico da proteína; localização subcelular (citoplasma, periplasma, membrana, etc.), e processos que participam como vias metabólicas (Médigue e Moszer, 2007).

Para análise de similaridade selecionou-se alguns genes e regiões consideradas como marcadores filogenéticos e que já estão disponíveis na base de dados GenBank para a comparação com as sequências do genoma em estudo utilizando a ferramenta Blast.

4. RESULTADOS

4.1. COMPILAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE PACIENTES E GOLFINHOS COM DOENÇA DE JORGE LOBO NO MUNDO, ATÉ O ANO DE 2015 E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DEMOGRÁFICO, CLÍNICO E A TERAPÊUTICA DOS PACIENTES COM DOENÇA DE JORGE LOBO ATENDIDOS NA UNIDADE DE REFERENCIA MARCELLO CANDIA.

Desde a descrição do primeiro caso da doença de Jorge Lobo em 1931 até hoje foram descritos mais de 700 casos em humanos (Elsayed et al., 2004; Brito e Quaresma, 2007; Woods, Belone Ade, et al., 2010), a maioria deles na Região Amazônica, enquanto que os poucos casos descritos em países industrializados foram relatados como casos importados, com exceção de um caso detectado em um tratador de golfinhos em um aquário na França, residente na Holanda (Symmers, 1983) e de um morador da Grécia (Papadavid et al., 2012) (**Figura 5**). No ano de 1971 foi descrito o primeiro caso de possível doença de Jorge Lobo em um golfinho capturado na costa da Florida, EUA. Nos anos seguintes, a presença de lesões nodulares similares àquelas encontradas em humanos foram relatadas em golfinhos em diferentes regiões do planeta. No entanto, em razão das dificuldades na identificação do agente etiológico, essa doença em golfinhos tem sido definida como “Lobomycosis-Like Disease (LLD)”, ou seja, doença de Jorge Lobo símile (Van Bresse et al., 2015) (**Figura 5**).

Distribuição mundial da doença de Jorge Lobo em humanos e em golfinhos.

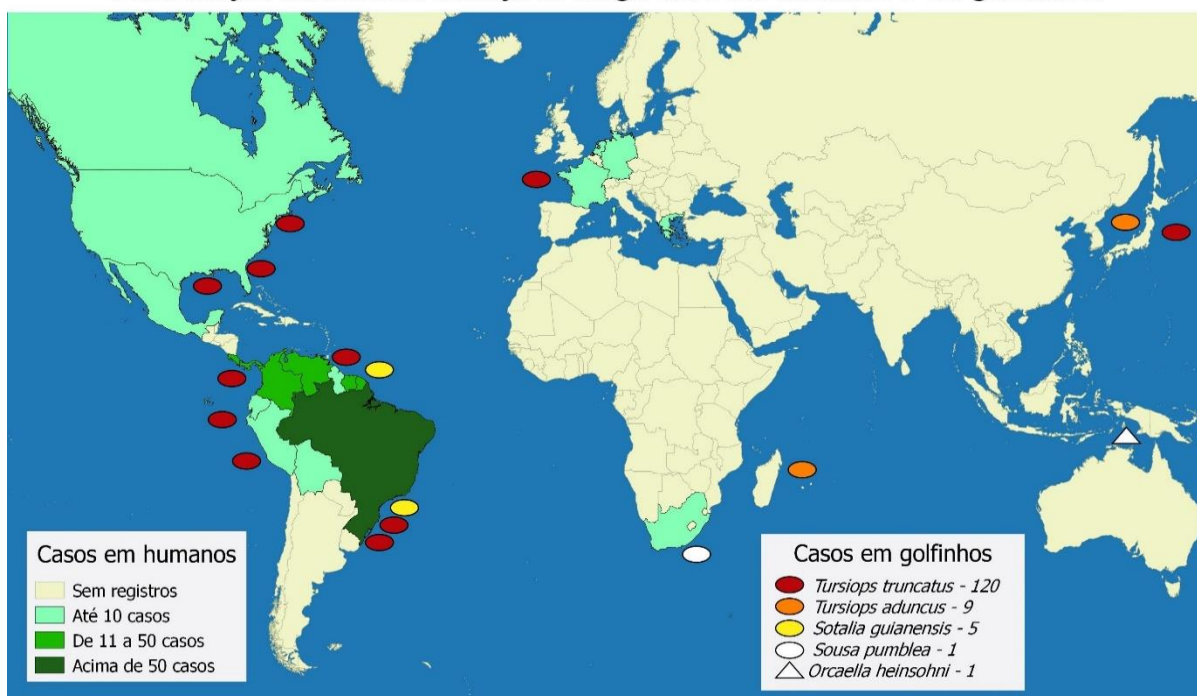


FIGURA 5. Mapa de distribuição geográfica dos casos de Doença de Jorge Lobo em humanos e Jorge Lobo *símile* em golfinhos. Os casos em humanos estão concentrados na Região Amazônica, principalmente na Amazônia Brasileira, enquanto os casos em golfinhos foram relatados em todos os oceanos, com um maior número de achados nas regiões costeiras do continente americano.

Na Unidade de Referência em Dermatologia do Estado do Pará “Dr. Marcello Candia” foram diagnosticados 23 casos de doença de Jorge Lobo no período de 8 anos. Destes, dois (8.7%) eram mulheres e 21 (91.3%) homens (**Tabela 3**). A média de idade no período do diagnóstico foi de 66 anos, tendo o paciente mais novo 14 anos e o mais velho 80 anos. As principais atividades profissionais identificadas entre os pacientes atendidos foram: lavrador 11 (47.83%) e outros 12 (52.17%) (**Tabela 4**). Em relação a distribuição geográfica, os pacientes atendidos na URE eram provenientes de 19 municípios do Estado do Pará, e que a maioria é oriundo do nordeste paraense. A **Figura 6** mostra a distribuição dos casos da doença de Jorge Lobo nos municípios do estado do Pará.

TABELA 3. DISTRIBUIÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE ACORDO COM O GÊNERO

GÊNERO	Número absoluto	%
MASCULINO	21	91.3
FEMININO	2	8.7
TOTAL	23	100

TABELA 4. DISTRIBUIÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE ACORDO COM A ATIVIDADE PROFISSIONAL

ATIVIDADE PROFISSIONAL	Número absoluto	%
LAVRADOR	11	47.83
OUTROS (APOSENTADOS PESCADOR, BRAÇAL, ETC)	12	52.17
TOTAL	23	100

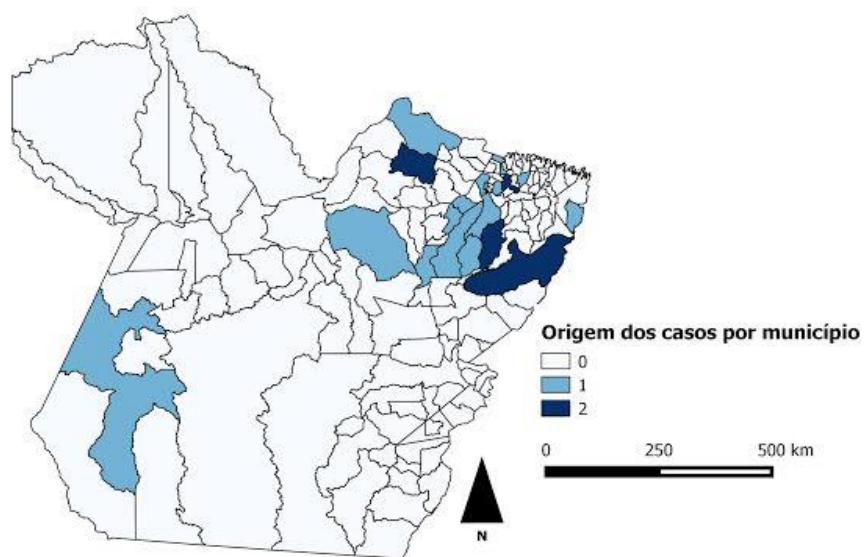


FIGURA 6. Mapa de distribuição geográfica dos casos de Doença de Jorge Lobo no Estado do Pará. A concentração de indivíduos com a doença de Jorge Lobo no estado do Pará se encontra na região nordeste do estado.

4.2.ASPECTOS CLÍNICOS

Todos os pacientes atendidos na URE Marcello Candia apresentavam lesões nodulares, queloidiformes, sendo que em três casos foi observada a presença de lesões verrucosas e em dois, lesões ulceradas (**Figura 7**).

A maioria dos pacientes (20; 86.95%) possuíam lesões localizadas e foram classificados como portadores de doença de Jorge Lobo cutânea localizada. Três (13.04%) pacientes apresentaram a forma cutâneo-difusa, com lesões em mais de um sítio anatômico. Considerando apenas os 20 casos com doença de Jorge Lobo cutânea localizada, os principais sítios anatômicos acometidos foram os membros inferiores (10; 50.00%), pavilhões auriculares (5; 25.00%), membros superiores (3; 15.00%), face (1; 5.00%) e tórax (1; 5.00%).



Figura 7. Aspectos clínicos das lesões da doença de Jorge Lobo. Lesões de aspecto nodular, queloidiformes, no pavilhão auricular direito (**A**). Lesões nodulares, queloidiformes, em placas, no dorso e membro superior esquerdo (**B**). Lesões nodulares, ulceradas, agrupadas no tornozelo direito (**C**). Lesões nodulares, ulceradas, sangrantes, associadas a atrofia cutânea na perna direita (**D**).

4.3.EXAME MICOLÓGICO DIRETO E HISTOPATOLÓGICO

O diagnóstico dos pacientes foi realizado pelo exame micológico direto com KOH à 10%, onde observou-se riqueza de células leveduriformes de parede refrigente, com 8 a 11 µm de diâmetro, isoladas ou agrupadas, formando cadeias ramificadas ou não e unidas por um tubo conector, característico do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. A partir de secção de tecidos corados pela hematoxilina-eosina, visualizamos histiócitos e células gigantes multinucleadas englobando células fúngicas catenuladas. Células arredondadas em grande quantidade, em cadeias, com brotamento simples ou múltiplos e parede celular negra corada pela prata-metanamina (Gomori-Grocot) também podem ser observadas (**Figura 8**).

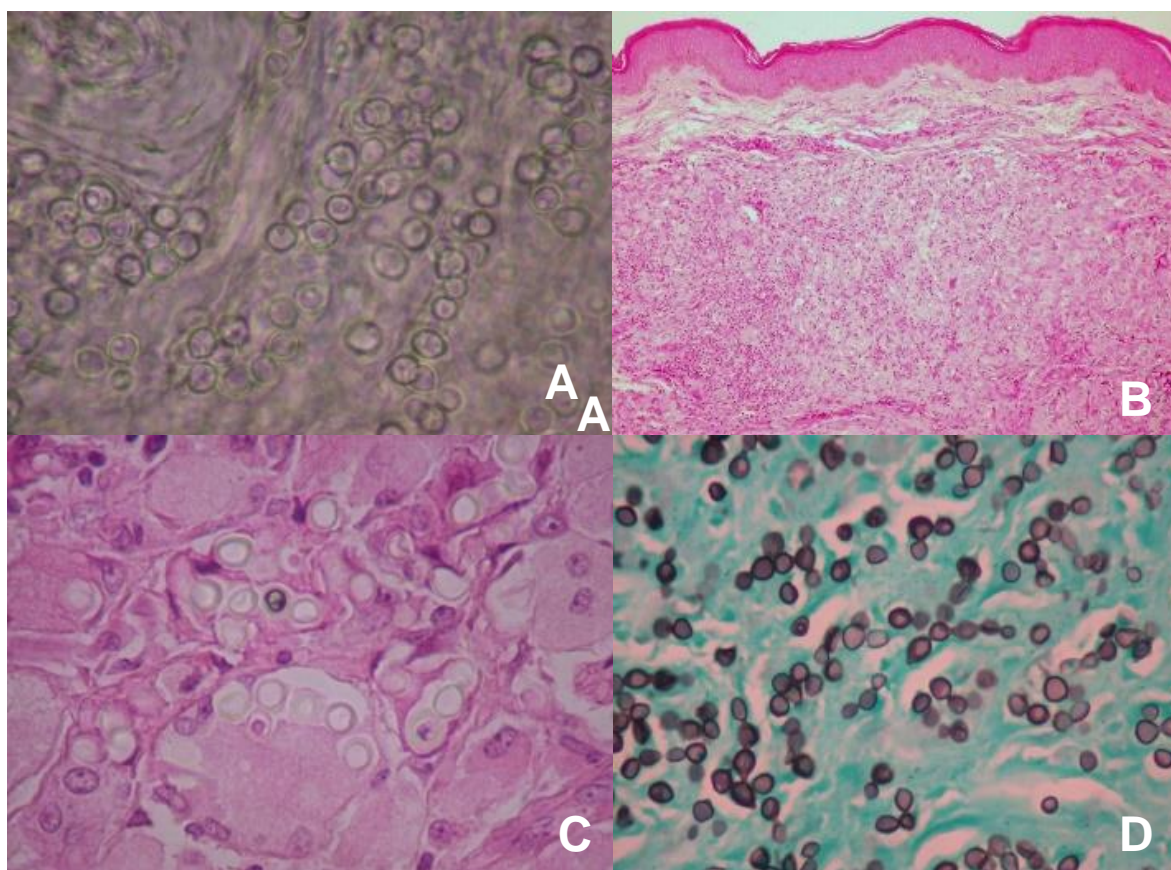


Figura 8. Exame micológico direto e histologia para diagnóstico da doença de Jorge Lobo. Exame micológico direto demonstrando riqueza de células leveduriformes, catenuladas, de parede refringente (**A**). Secção de tecido corada pela hematoxilina e eosina apresentando infiltrado inflamatório granulomatoso. É possível observar a zona Grenz na derme papilar, com a epiderme adelgada e retificada (**B**). Em maior aumento, células leveduriformes catenuladas, algumas no interior de células gigantes multinucleadas, além de macrófagos xantomizados (**C**). A coloração pela prata (Gomori-Grocot) evidencia os fungos em grande quantidade na derme (**D**). (**A**): 400x; (**B**): 40x; (**C**): 400x; (**D**): 400x

4.4. TRATAMENTO DOS PACIENTES COM ITRACONAZOL

Dezesseis (69.56%) pacientes foram tratados com itraconazol por um período de 2 a 6 anos. Destes dezesseis, apenas uma (6.25%) paciente recebeu alta por cura após 6 anos de uso contínuo de itraconazol na dose de 200mg/dia, enquanto os outros 15 (93.75%) pacientes encontram-se em tratamento.

Para as formas cutâneas localizadas, o tratamento prescrito foi de 200mg/dia, enquanto que para as formas cutâneo-difusas a dose foi de 400mg/dia. Em todos os casos houve melhora lenta e gradual com diminuição do tamanho e da consistência das lesões, evoluindo com atrofia nas áreas de regressão (**Figura 9**). Neste período, dois (12.50%) pacientes foram à óbito por causas desconhecidas, e dois (12.50%) pacientes abandonaram o tratamento, também por causa desconhecida.



Figura 9. Evolução do tratamento de pacientes com itraconazol 200mg/dia. Lesão nodular, queloidiforme, em placa, com cerca de 5cm de diâmetro, na região peitoral E (A). Evolução com atrofia após 48 meses de tratamento (B). Lesões nodulares, queloidiformes, agrupadas na hemiface E (C). Evolução com regressão de algumas lesões após 12 meses de tratamento (D). Cura clínica após 72 meses de tratamento, com cicatrizes e atrofia (E).

4.5. INOCULAÇÃO EM PATA DE CAMUNDONGO COM CÉLULAS RECÉM-ISOLADAS PELO MÉTODO ENZIMÁTICO

Na semana seguinte à inoculação das células fúngicas recém-isoladas nas patas dos camundongos Balb/c, foi observado um aumento do volume da pata que recebeu o inóculo, com sinais característicos de inflamação, como eritema e edema (dados não mostrados). Mesmo sem o uso de medicamentos, o processo inflamatório regrediu em duas a três semanas e a pata voltou ao seu volume e forma normais.

Após 12 meses, quatro dos cinco camundongos utilizados no experimento apresentaram aumento visível do volume da pata inoculada, com lesão nodular, infiltrativa e levemente endurecida (**Figura 10 A**). A histopatologia da lesão revelou a presença de um infiltrado inflamatório crônico granulomatoso de partes moles, poupando o tecido ósseo, rico em histiócitos e células gigantes, contendo em seu interior células leveduriformes catenuladas, compatíveis com o agente etiológico da doença de Jorge Lobo (**Figura 10 B-E**).

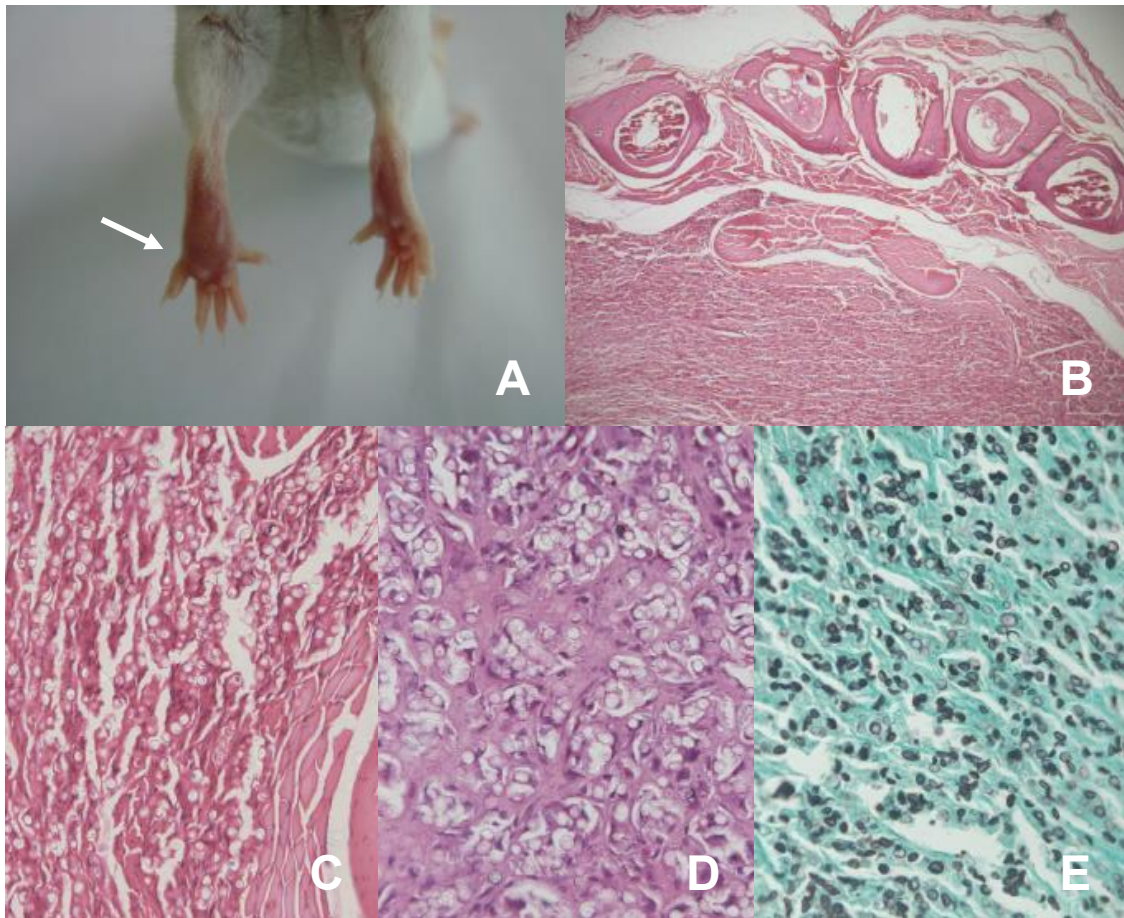


Figura 10. Inoculação em pata de camundongo. A inoculação das formas teciduais do agente etiológico da doença de Jorge Lobo na pata traseira esquerda demonstrou, após 12 meses, um aumento de volume da pata inoculada (seta) em relação ao membro contra-lateral (A). O corte histopatológico no plano ósseo dos artelhos demonstra uma grande quantidade de fungos infiltrando as partes moles da pata (B). Em grande aumento, é possível observar os fungos com a parede corada pelo PAS, formando cadeias e poupando o tecido ósseo (C), bem como a formação de um processo granulomatoso, com células gigantes e alguns linfócitos de permeio (D). A coloração pela prata permite a melhor observação das células fúngicas no tecido afetado (E). (A): 1x; (B): 40x; (C), (D) e (E): 400x.

4.6. CÉLULAS LEVEDURIFORMES OBTIDAS APÓS ISOLAMENTO ENZIMÁTICO E CULTIVO EM MEIO ARTIFICIAL

Um total de 25 biópsias de pele lesional (21 pacientes da URE Marcello Candia e 4 índios Caiabi) foi submetida a processamento enzimático para isolamento e cultura do fungo. O material isolado apresentou morfologia característica do fungo causador da doença de Jorge Lobo, com presença de células catenuladas, de parede espessa e refringente (**Figura 11 A**). Apesar do tamanho similar nas células catenuladas, foi possível observar células menores, em brotamento, na porção terminal da cadeia de células fúngicas (**Figura 11 C e D, seta**). A observação em imersão evidenciou ainda mais a espessa parede celular, com aspecto de duplo contorno e estruturas em forma de fimbrias no seu exterior (**Figura 11 B e D**). Internamente, apresentaram estruturas globulares pequenas, de quantidade variada (**Figura 11 B, C e D**) e com intensa movimentação. Em algumas células, foi observada a presença de outra estrutura em forma de bastão (**Figura 11 B, C e D**), que também se movimentava intensamente.

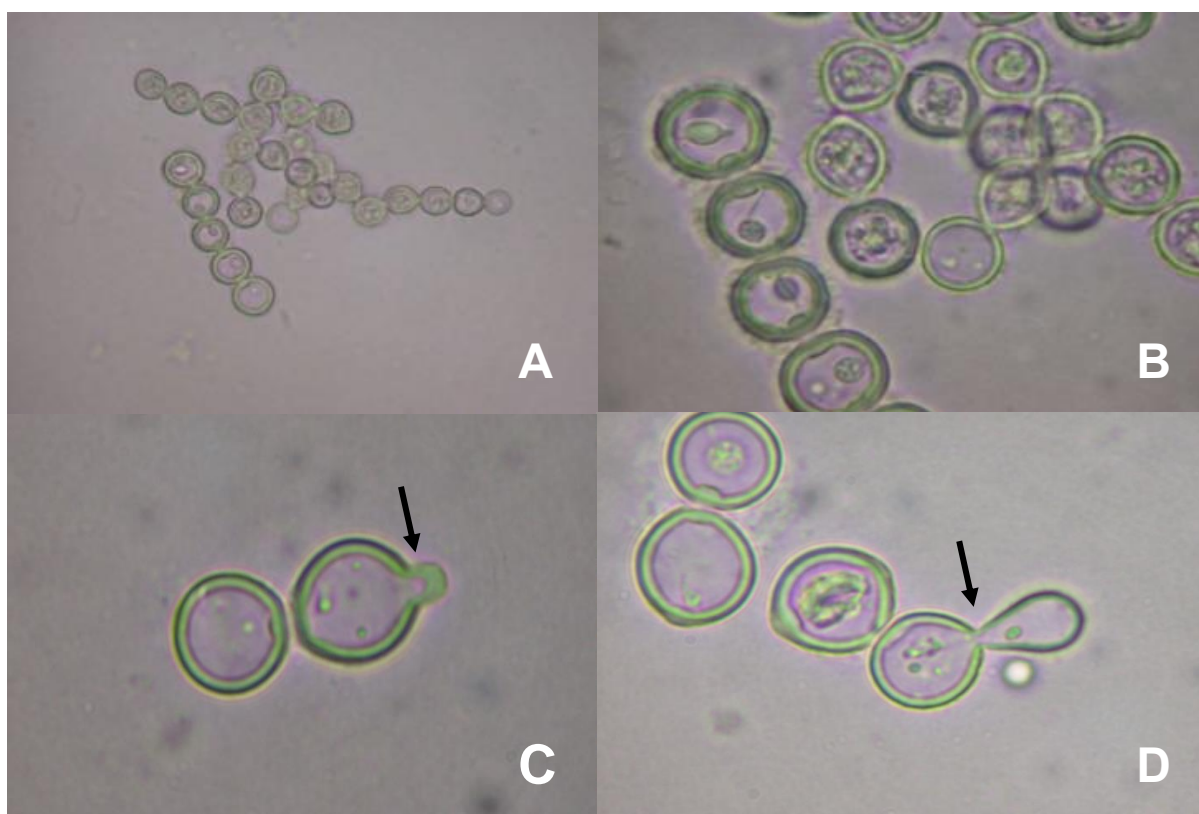


Figura 11. Material biológico proveniente de pacientes com doença de Jorge Lobo após tratamento enzimático. As células recém-isoladas mantidas em RPMI 1640 após 7 dias apresentaram estruturas unicelulares com reprodução por brotamento (seta preta), resultando na sequência de células de aspecto catenulado (**A**), (**C**) e (**D**), é possível observar finas projeções como fimbrias na porção externa da parede celular (**B**) e (**D**). (**A**) 400x; (**B**), (**C**) e (**D**) 1000x.

As células fúngicas isoladas foram semeadas na quantidade de $1,5 \times 10^8$ (40 μ L) em três diferentes meios de cultura, ágar Fava Netto, ágar Sabouraud dextrose e ágar infusão cérebro coração, porém em nenhum dos meios houve crescimento após um período observado de até 90 dias. A mesma quantidade de células foi semeada em RPMI1640 suplementado e caldo Fava Netto e mantidas e renovadas por um período de até seis meses. Durante este período foi observado aumento do número de células evidenciado pela turvação dos meios líquidos (**Figura 12**).

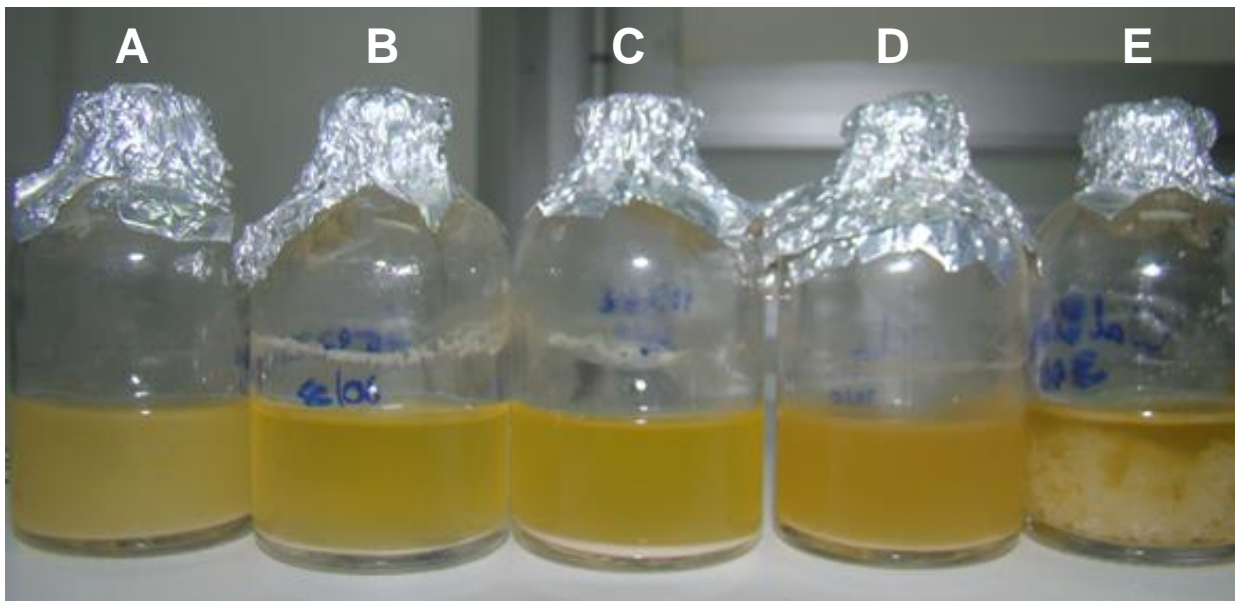


Figura 12. Amostra de Crescimento em caldo Fava Netto a 37° C de isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Cultura do agente etiológico da doença de Jorge Lobo com crescimento no número de células observado pela turvação do meio. (A-C). *Candida tropicalis* (D). *Candida albicans* (E).

As células obtidas após o crescimento em Caldo Fava Netto e RPMI 1640 suplementado foram então novamente semeadas em ágar Fava Netto, ágar Sabouraud dextrose e ágar infusão cérebro coração. Lâminas coradas pelo Gram foram preparadas para descartar possível contaminação bacteriana antes de semear (dados não mostrados). Os meios sólidos semeados foram incubados à temperatura ambiente e a 37° C por um período de 10 dias, e desta vez foi observado crescimento (**Figura 13**).

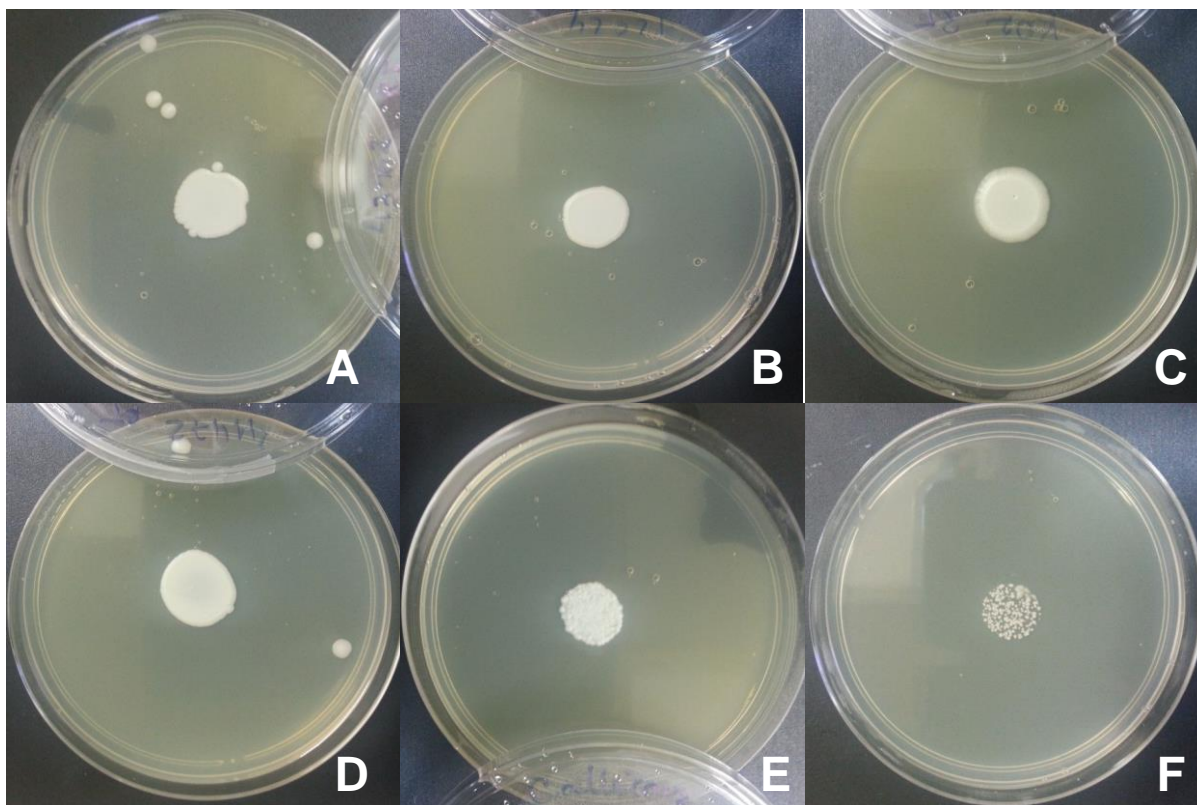


Figura 13. Amostras de cultura após 5 dias de crescimento em ágar Sabouraud-dextrose. Colônias de células obtidas a partir de meio líquido do agente etiológico da doença de Jorge Lobo apresentam aspecto cremoso (A – D). Do mesmo modo, colônias de aspecto cremoso podem ser observadas no cultivo de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (E, F).

Na análise do diâmetro das colônias durante 5 dias de crescimento em meio sólido, não foi observada diferença significativa em relação ao tamanho das colônias de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e o agente etiológico da doença de Jorge Lobo quando cultivados nos meios ágar Sabouraud dextrose e ágar BHI a temperatura ambiente e a 27° C. No entanto, a diferença entre o tamanho do diâmetro da colônia do agente etiológico da doença de Jorge Lobo em relação ao de *Candida albicans* em meio ágar Fava Netto foi estatisticamente significativo (**Figura 14**). Já a diferença do diâmetro da colônia entre os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo e *C. tropicalis* nas duas temperaturas não foi significativo.

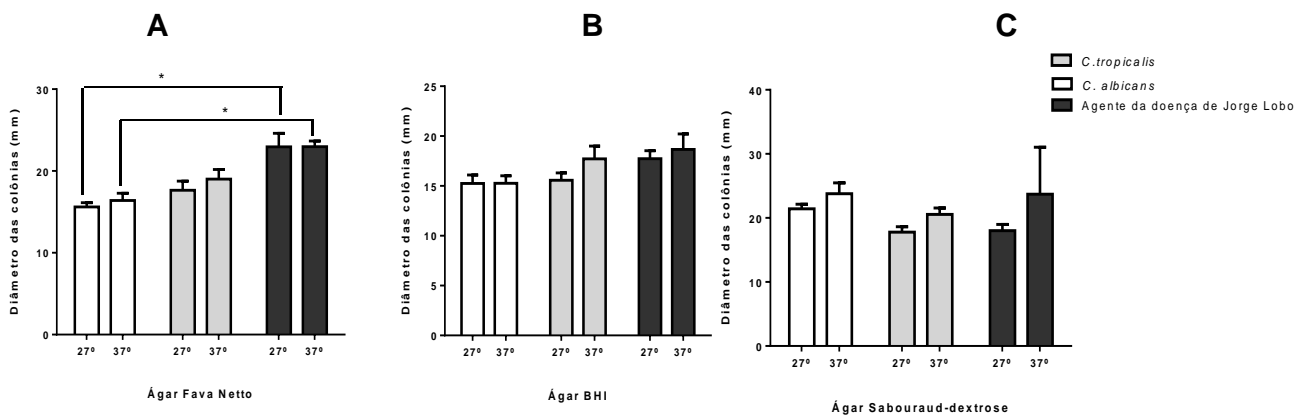


Figura 14. Relação do tamanho do diâmetro das colônias do agente etiológico da doença de Jorge Lobo, *Candida tropicalis* e *Candida albicans* em meio de cultura artificial em diferentes temperaturas. O diâmetro das colônias do agente etiológico da doença de Jorge Lobo e *C. albicans* à 27° C ou a 37° C, em ágar Fava-Netto, apresentou diferença estatística significativa, com valores maiores para o agente etiológico da doença de Jorge Lobo (A), enquanto que diâmetro das colônias dos três isolados nos meios ágar BHI e ágar Sabouraud-dextrose foi similar (B, C). *Teste t de student: $p < 0,05$.

4.7. DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA LEVEDURA CULTIVADA EM MEIO ARTIFICIAL

4.7.1. Descrição macroscópica e de microscopia óptica das colônias.

O tempo de crescimento ou aparecimento da colônia variou entre 4 e 10 dias. O aspecto das colônias nos diferentes meios apresentou variações, com colônias de textura membranosa, às vezes glabras de aspecto compacto, superfície irregular, topografia lisa, às vezes cerebriforme, coloração branca a bege, sem produção de pigmentos difundidos no meio (Figura 15). Em culturas com tempo de crescimento longo (20 dias ou superior) as colônias apresentam consistência mucoide, compacta, semelhante a uma densa película. A RT a colônia apresenta aspecto cremoso semelhantes as colônias a 37°C, porém no meio ágar Fava Netto (modificado) a colônia apresenta aspecto lanuginoso de coloração branca (Figura 15).

A cepa padrão é a LDI33621 que foi apresentada e depositada na coleção de fungos patogênicos do Instituto Nacional de controle de qualidade em saúde (INCQS/FIOCRUZ) sob o número de acesso CFP 00519 (ANEXO A).

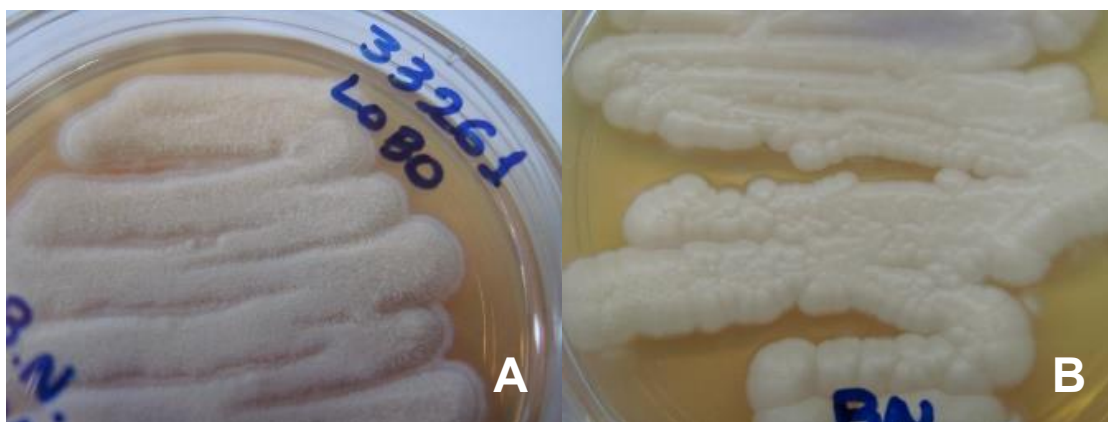


Figura 15. Características macroscópicas das colônias. O crescimento das colônias em meio sólido pode apresentar aspecto lanuginoso em ágar Fava-Netto (A) ou cremoso em ágar infusão cérebro-corção BHI (B). Em ambas, a coloração é esbranquiçada e não apresenta pigmentação.

Após o crescimento por um período de até 6 meses em meio líquido, a avaliação destas culturas nos permitiu observar alterações morfológicas gradativas das estruturas celulares do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. As células recém isoladas, que apresentavam morfologia arredondada de parede refrigente, com conteúdo intracitoplasmático denso, medindo de 7 a 8 μm de diâmetro e formando cadeias, modificaram a sua morfologia. Foi observada a fragmentação da parede celular, com liberação do seu conteúdo interno, resultando em um aspecto de células senescentes ou degeneradas (**Figura 16**).

Com a fragmentação das células originárias do tecido do hospedeiro, à medida em que a quantidade de células clássicas da doença de Jorge Lobo diminuiu, surgiram estruturas menores, em média 1,9 μm de diâmetro, arredondadas, que aumentaram em volume e número com o tempo em cultivo, chegando a alcançar a média de 2,6 μm de diâmetro. As novas células eram arredondadas ou alongadas, unicelulares, com reprodução por brotamento simples ou múltiplo. Foi observado também a diferenciação das novas células arredondadas em pseudohifas e hifas verdadeiras delgadas, septadas, hialinas, que deram origem a novos conídios arredondados, às vezes alongados, emergindo da própria hifa, com conidiação do tipo blástica (**Figura 17**). O teste de formação do tubo germinativo e clamidósporo foi realizado, porém foram negativos para os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (dados não mostrados).

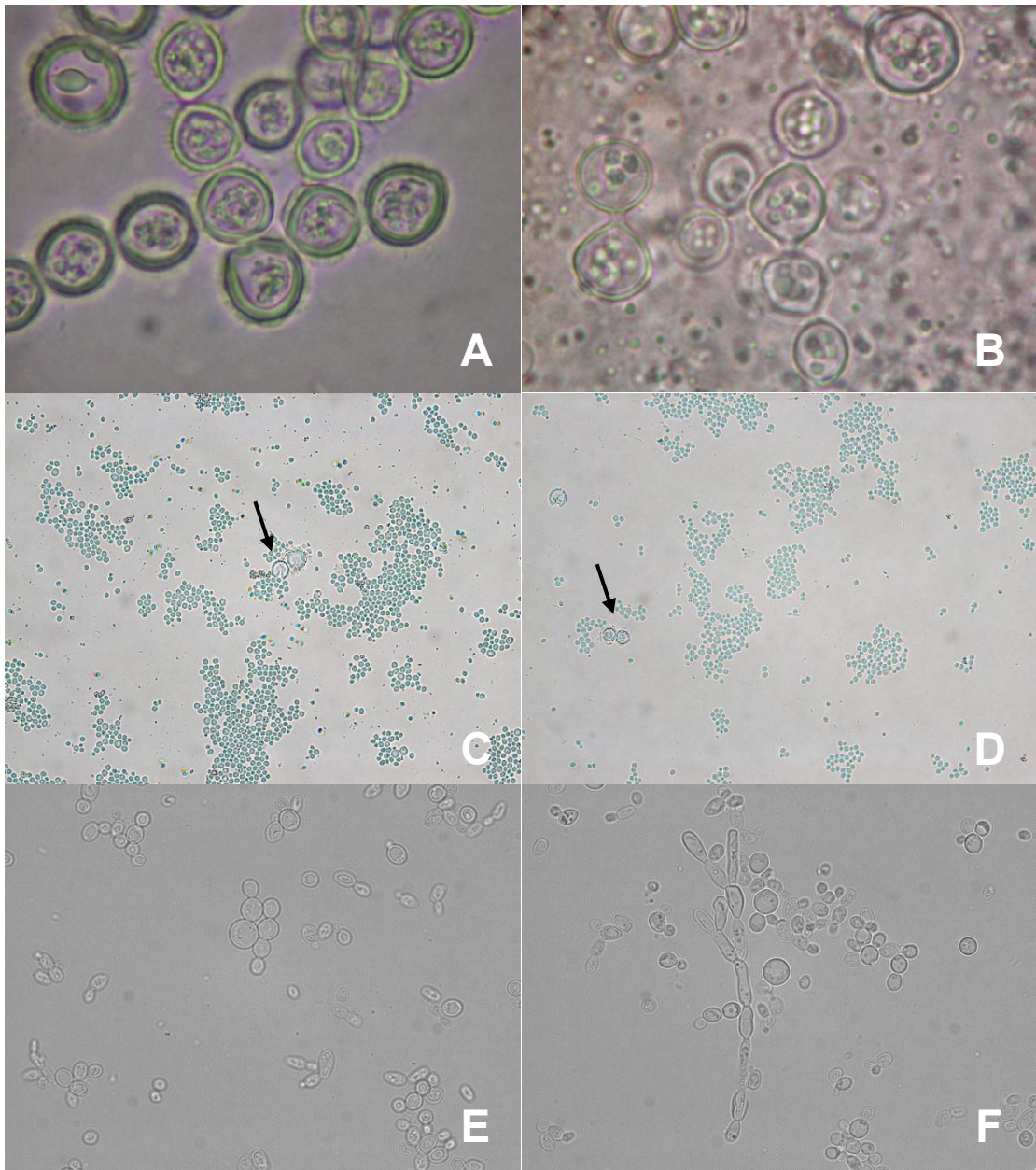


Figura 16. Modificações morfológicas das células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo quando cultivadas em meios de cultura artificiais. Células leveduriformes, catenuladas, com parede refrigente, recém-isoladas pelo método enzimático (A), após algumas semanas em meio de cultura líquido, se fragmentam e liberam novas células menores no meio de cultura (B). A manutenção destas células em meio líquido nos permite observar a sua proliferação, e as células originais podem ser observadas em degeneração (setas) (C e D). A evolução da célula cultivada é evidenciada pelo aumento no tamanho das leveduras, com reprodução por brotamento simples ou múltiplo (E), associadas à pseudohifas que dão origem a conídios (F). (A) e (B) 1000x, (C) e (D) 100x, (E) e (F) 400x.

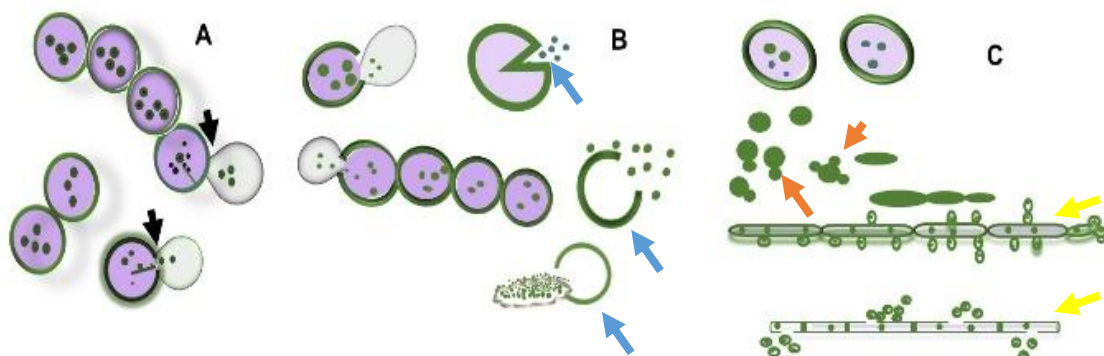


Figura 17. Esquema de modificações morfológicas das células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo quando cultivadas em meios de cultura artificiais. As células recém-isoladas pelo método enzimático são leveduriformes, de parede refrigente, com reprodução por brotamento simples (seta preta) e catenuladas (**A**). As células cultivadas em meio líquido por um período de até 6 meses podem apresentar ainda catenulação e reprodução por brotamento, porém observamos novas células que medem inicialmente 1,6 μm de diâmetro associadas a células degeneradas ou senescentes, liberando conteúdo intracitoplasmático, e restos da parede celular original (seta azul) (**B**). Após seis meses de cultivo, verificamos a presença de células isoladas, sem refringência na parede, arredondadas, com reprodução por brotamento simples ou múltiplo (seta vermelha) e células mais alongadas que se diferenciam em pseudohifas e hifas verdadeiras, de onde se originam

4.8. DESCRIÇÃO ULTRAESTRUTURAL

4.8.1. Microscopia eletrônica de varredura

Nas células fúngicas recém-isoladas, a microscopia óptica demonstra a presença de estruturas leveduriformes, em catenulação, com evidente formação de brotamentos, o que pode ser observado em maior detalhe pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além dos brotamentos e da catenulação, pode ser observada ainda pela MEV a presença de cicatrizes e de células degeneradas, apresentando alteração da morfologia globosa para um aspecto achatado (**Figura 18**).

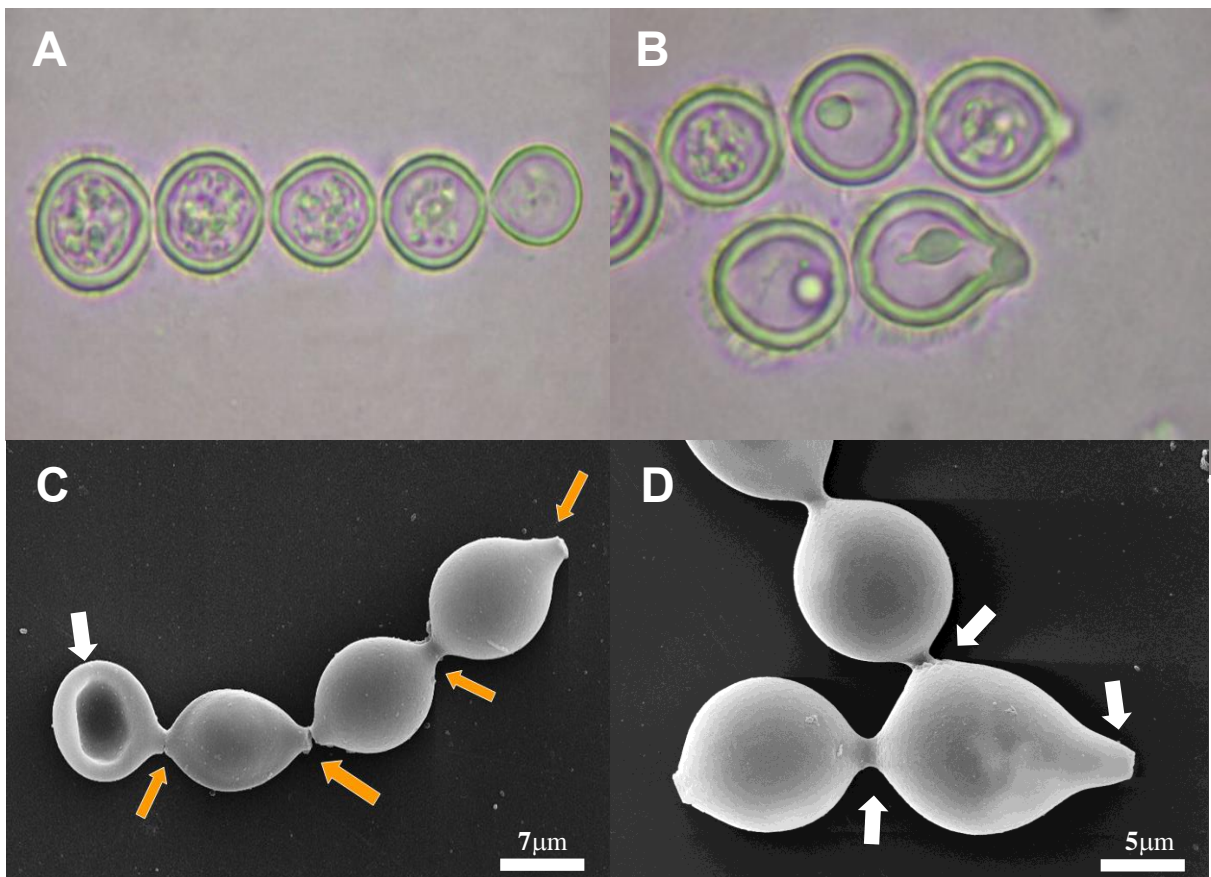


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura de células leveduriformes recém-isoladas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Na microscopia óptica podem ser observadas células leveduriformes, catenuladas, com brotamento (A, B). A MEV demonstra células leveduriformes, catenuladas, com brotamento simples (setas laranjas). Adicionalmente, uma das células (seta branca) apresenta-se degenerada, com uma mudança de seu aspecto globoso para uma morfologia achatada (C). Além do brotamento simples, algumas células fúngicas também podem apresentar brotamento múltiplo (setas) (D). (A) e (B)1000x

À MEV, as células leveduriformes do cultivo apresentam-se organizadas em cadeias. São observadas ainda, células leveduriformes de diferentes tamanhos, apresentando cicatrizes de desarticulação distribuídas na superfície celular. São visualizados também os filamentos micelianos e células leveduriformes degeneradas, apresentando alteração da morfologia globosa para um aspecto achatado (**Figura 19**).

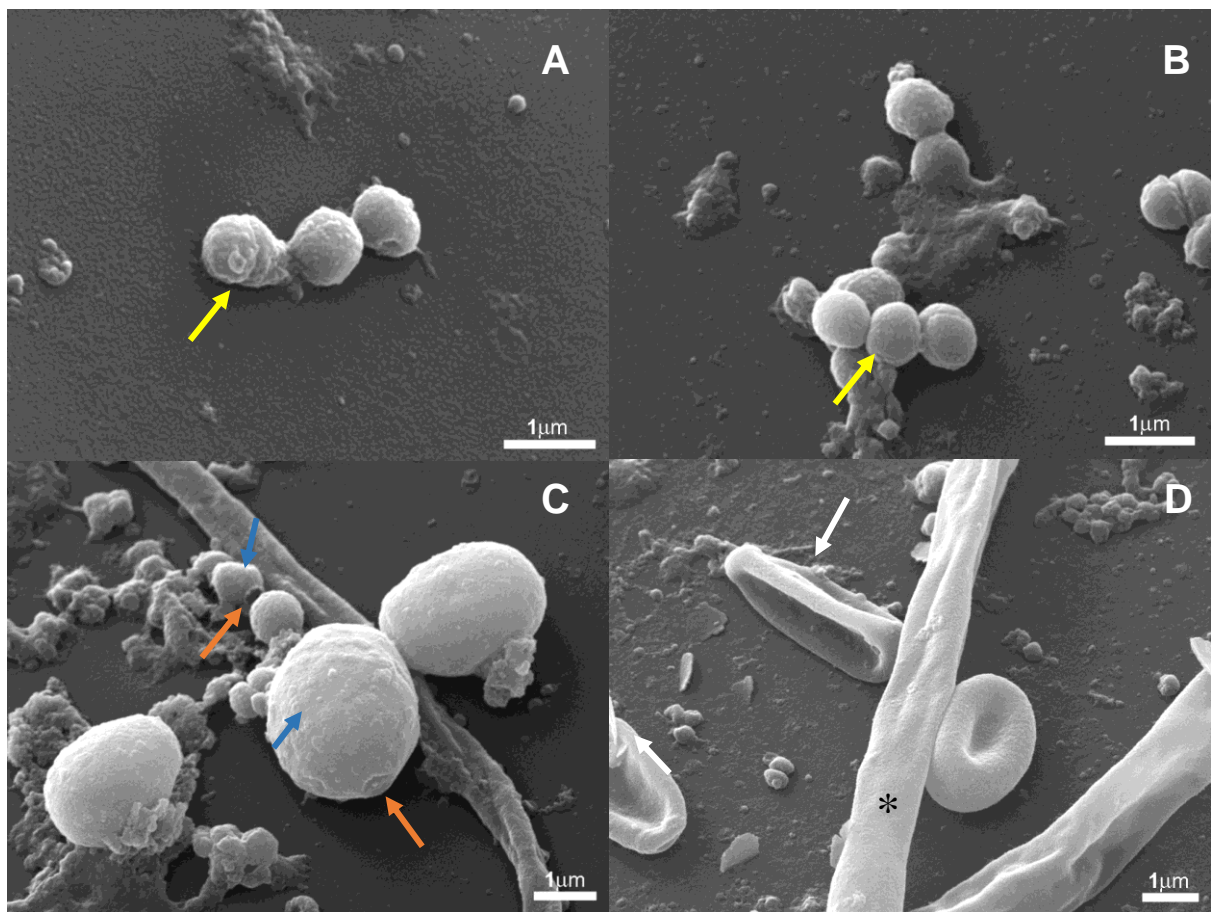


Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura de células leveduriformes obtidas de cultura do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Na MEV são observadas células leveduriformes, catenuladas (seta amarela), de pequeno tamanho, com brotamento simples (**A**, **B**). Células leveduriformes com diferentes tamanhos (seta azul) e presença de cicatrizes de desarticulação (seta laranja) (**C**). Além das células globosas leveduriformes, são observados filamentos micelianos (asterisco) e células morfologicamente alteradas (seta branca) (**D**).

4.8.2. Microscopia eletrônica de transmissão

As células leveduriformes obtidas da cultura observadas pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) se apresentaram heterogêneas em suas estruturas internas, porém sempre com parede celular espessa. Exibiram membrana plasmática com invaginações, inúmeros vacúolos e estruturas eletrodensas e eletrolucentes. As células leveduriformes catenuladas, apresentaram reprodução por brotamento evidenciado pela formação de um broto ou blastosporos e a formação de filamentos micelianos septados. (**Figura 20**).

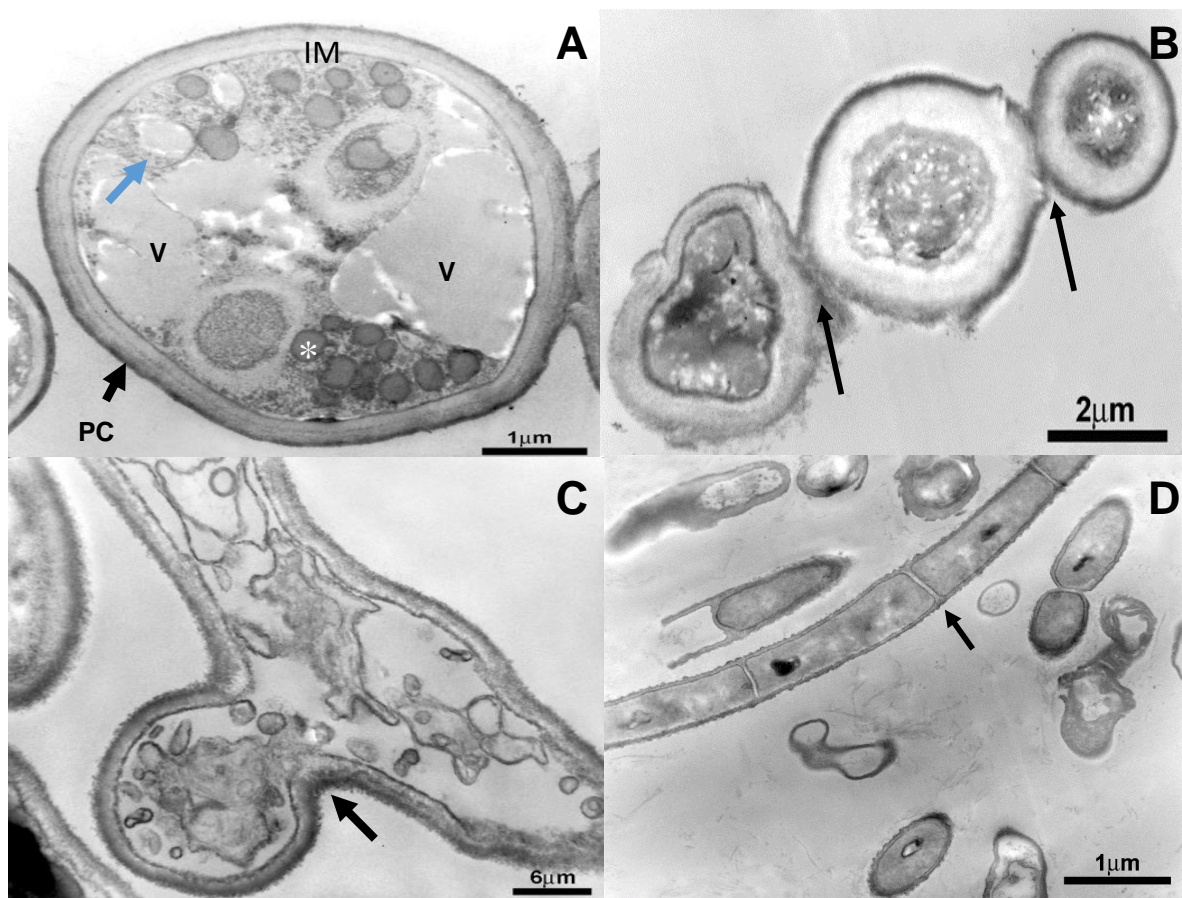


Figura 20. Microscopia eletrônica de transmissão de células leveduriformes obtidas de cultura do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Além da parede celular (PC), podem ser observadas invaginações da membrana plasmática (IM), múltiplos vacúolos (V), estruturas eletrodensas (*) e eletrolucentes (seta azul) (A). Células de pequeno tamanho apresentam constrição entre a célula mãe e os brotos e a disposição catenular característica das células do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (seta), além de parede celular espessa (B). Verifica-se ainda, a formação de blastosporos (C) e a presença de uma hifa septada (seta) (D).

4.9. PERFIL BIOQUÍMICO DAS CÉLULAS LEVEDURIFORMES ATRAVÉS DO SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK 2

Dos 10 isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo analisados neste teste, 2 (18316, 33621) exibiram perfil exatamente similar a cepa controle *C. tropicalis* (seta azul); 5 (25152, 29362, 33791, 37869, 42671) dos isolados apresentaram diferença em pelo menos um substrato (setas vermelhas), e 3 (12024, 41472, 43962) isolados apresentaram um perfil variando em mais de cinco substrato quando comparado com a cepa padrão (**tabela 5**).

Com perfil dos isolados 12024, 43962 obtivemos o percentual de probabilidade de 99%, com excelente confiança de identificação para *C. parapsilosis*. Para o isolado 25152 houve baixa discriminação na identificação do microrganismo apresentando perfil para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. O isolado 41472 apresentou perfil diferente de todos os outros isolados não sendo, portanto, identificado como nenhum microrganismo conhecido ou reconhecido pelo sistema.

Bioquimicamente, as cepas assimilam galactose, glucose, maltose, sucrose, manose, turanose, acetato, 2-keto-gluconato e D-gluconato. Não assimila lactose, gentiobiose, rafinose, melibiose, melezitose, sorbose, raminose, nitrato. São urease, beta-n-acetil-glucosaminidase, gama-glutamil-transferase e lisina-arilamidase negativa. Alfa glucosidase, leucina-arilamidase positiva. As cepas apresentaram variação de assimilação de trealose, sorbitol, n-acetil-glucosamina e hidrólise da esculina.

O perfil completo de assimilação dos substratos de carboidrato e atividade enzimática de cada cepa está em anexo (**ANEXO B**).

TABELA 5: Representação do Perfil de assimilação de fonte de carbono e atividade enzimática dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo obtido através do método automatizado Sistema Vitek 2.

Isolados	<i>C. tropicalis</i> INCQS	<i>L. loboi</i> 12024*	<i>L. loboi</i> 18316	<i>L. loboi</i> § 25152	<i>L. loboi</i> 29362	<i>L. loboi</i> 33621	<i>L. loboi</i> 33791	<i>L. loboi</i> 37869	<i>L. lobo</i> ¶ 41472	<i>L. loboi</i> 42671	<i>L. loboi</i> * 43962
<i>LysA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>IMLTa</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>LeuA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ARG</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ERYa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>GLYL</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>TyrA</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>BNAG</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ARBa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>AMYa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dGALa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>GENa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>dGLUa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>LACa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>MAdGa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>dCELa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>GGT</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dMALa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>dRAFa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>NAGA1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dMNEa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>dMELa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dMLZa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>ISBEa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>IRHAa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>XLTa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>dSORa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>SACa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>URE</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>AGLU</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>dTURa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>dTREa</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>NO3a</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>IARAa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>dGATa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ESC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>IGLTa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>dXYLa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>LATa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ACEa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>CITa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>GRTas</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>IPROa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>2KGa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>NAGa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>dGNTa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.10. IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS A PARTIR DE MEIOS SELETIVOS: CHROMagar® candida e ÁGAR NIGER

Do isolado identificados pelo meio cromogênico CHROMagar® candida foi observado que o comportamento do isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo diferem, pois dos 11 isolados testados no meio cromogênicos; 7 isolados adquiriram a coloração azul e 4 não apresentaram alteração na coloração de suas colônias (**Figura 21**).

Para verificar a ação da phenoxidase, enzima produzida pelo fungo, em substratos fenólicos para a síntese de melanina, 03 isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo foram semeados em Ágar Niger. Nos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo não se observou atividade enzimática, pois nenhuma das colônias mostrou coloração escura, como observado na colônia de *Cryptococcus* utilizada como controle (**Figura 22**).

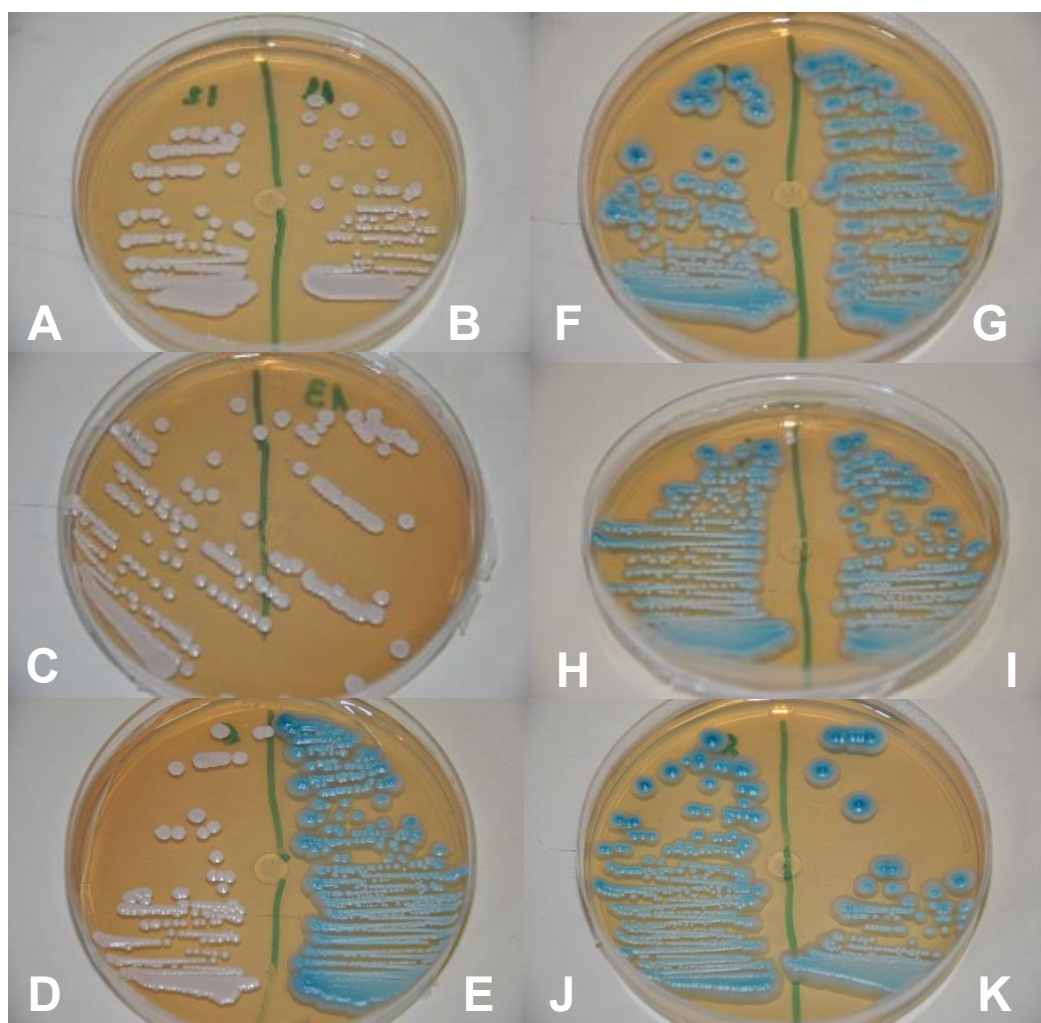


Figura 21. Identificação dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo pelo CHROMagar® candida. Placas com colônia do agente etiológico da doença de Jorge Lobo que não degradaram o substrato cromogênico mantendo a cor original da colônia (A – D). Colônias do agente etiológico da doença de Jorge Lobo com degradação do substrato cromogênico apresentam mudança da coloração da colônia para azul (E), *Candida tropicalis* - controle positivo (K).

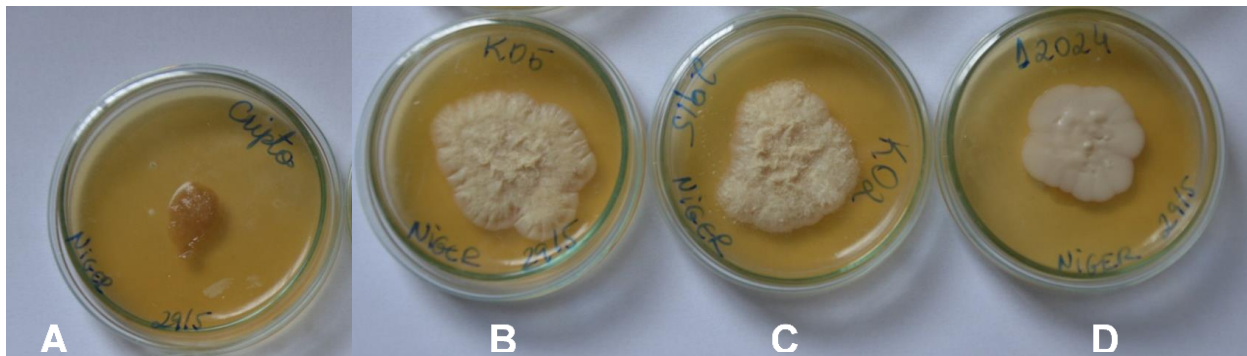


Figura 22. Cultura em ágar niger dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge. Isolado de *Cryptococcus sp.* degrada compostos fenólicos pela ação de enzima phenoloxidase obtendo colônia de coloração acastanhada - Controle positivo(A). Os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo phenoloxidase negativo. (B – D).

4.11. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL EXOENZIMÁTICO DO AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE JORGE LOBO

Para traçar o perfil de atividade enzimática foram realizados oito (08) testes com seis (06) isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo e como controle cepas INCQS de *Candida tropicalis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus* sp. para caracterização. A quantidade de células semeada nas culturas para teste foi de 1.5×10^8 que corresponde a 0.5 da escala de Mc Farland.

Os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo apresentaram padrão hemolítico do tipo gama, ou seja, nenhum dos isolados apresentou atividade hemolítica assim como as duas amostras de *Candida*. Para a produção de DNase, caseinase e gelatinase todos os testes foram negativos (dados não mostrados).

O teste da urease mostrou intensidade fraca da produção desta enzima, como observado na **Figura 23**.

A produção de proteinase todas as amostras apresentaram atividade enzimática com $PZ \geq 0,64 < 1$, os microrganismos utilizados na experimentação são produtores da enzima sendo demonstrado pela formação de um halo transparente ao redor da colônia (**Figura 24**).

O resultado do teste de lipase mostrou a presença de um halo de precipitação para todos os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo, *C. albicans* e *C.tropicalis* (**Figura25**). O resultado obtido com o teste da fosfolipase mostrou que os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (**Figura 26 A – C**) apresentaram a formação de um halo de precipitação de aspecto leitoso, assim com *C. albicans*, (**Figura 26 D**), porém não observado para *C. tropicalis* (**Figura 26 E**). O resumo dos resultados obtidos das provas é observado no quadro 1.

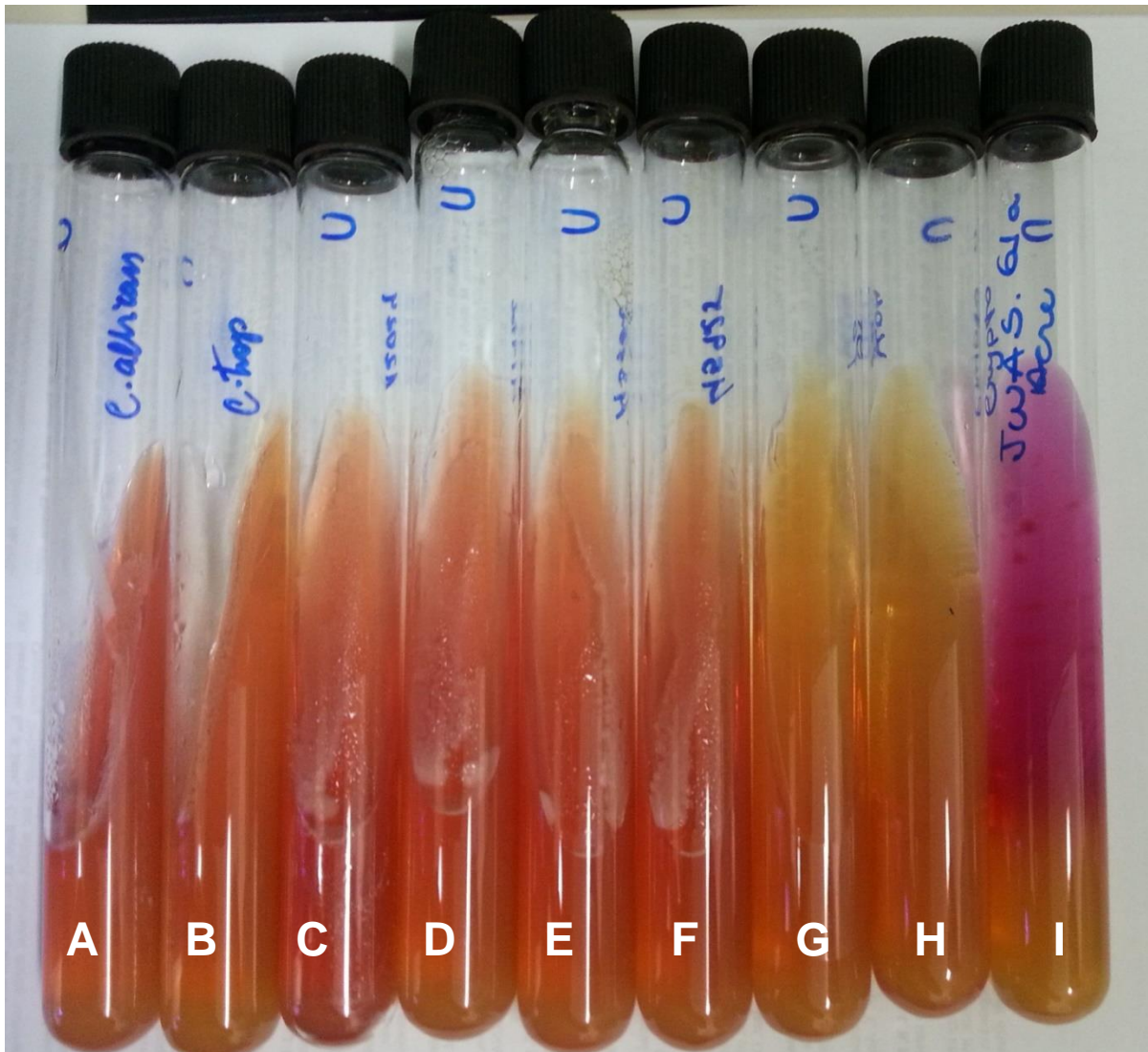


Figura 23. Teste da urease. Teste negativo na produção da enzima para os isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* (A-B). Teste negativo na produção da enzima para os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (C-H). *Cryptococcus sp.*- Controle positivo (I).

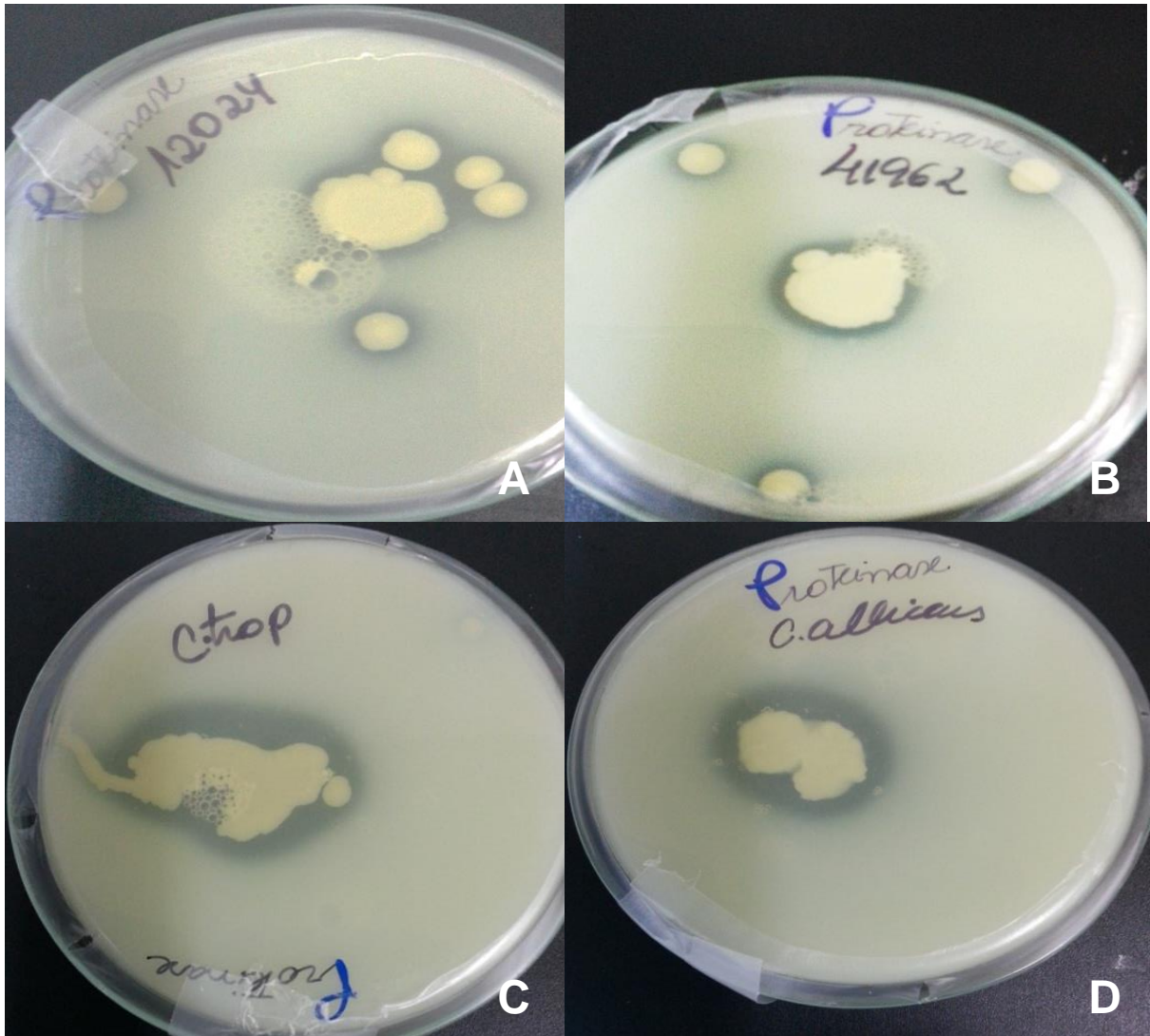


Figura 24. Teste de proteinase. Teste positivo com a formação do halo transparente ao redor da colônia para os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (A –B) e para *Candida tropicalis* e *Candida albicans*(C, D).

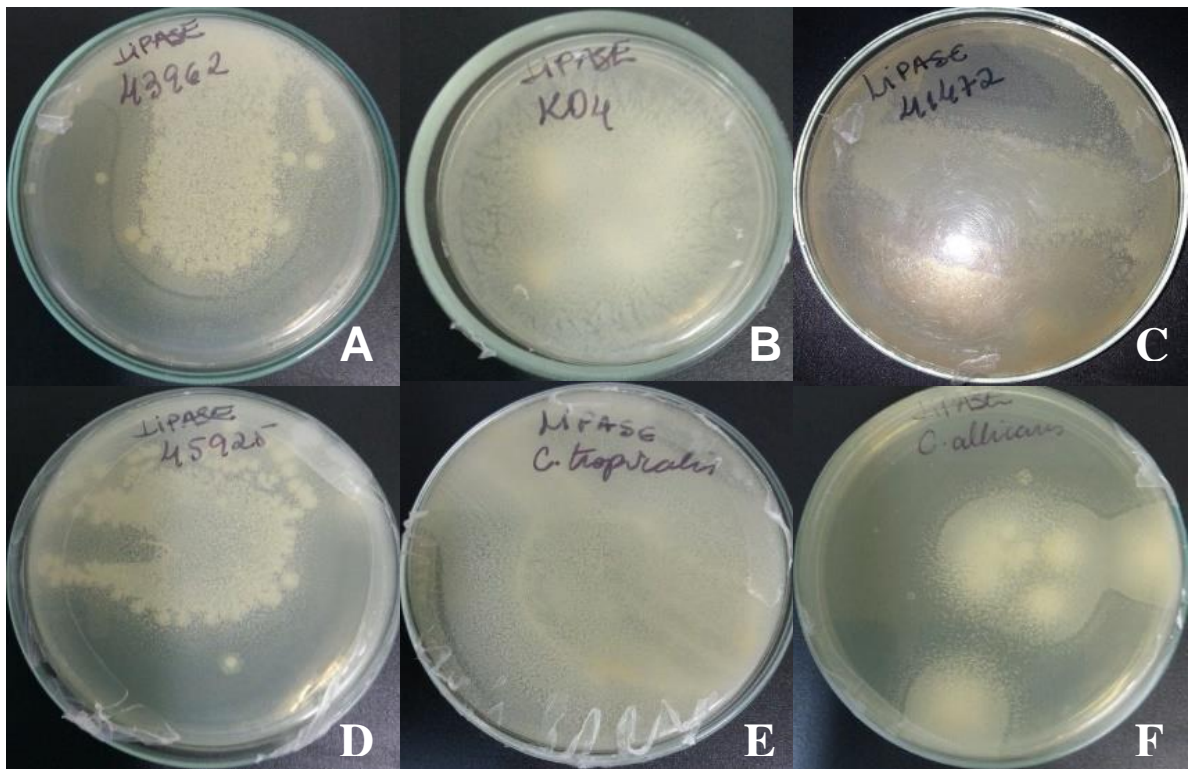


Figura 25. Teste da lipase. Formação de halo de precipitação para isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. (A – D). Formação de halo de precipitação para isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* (E – F).

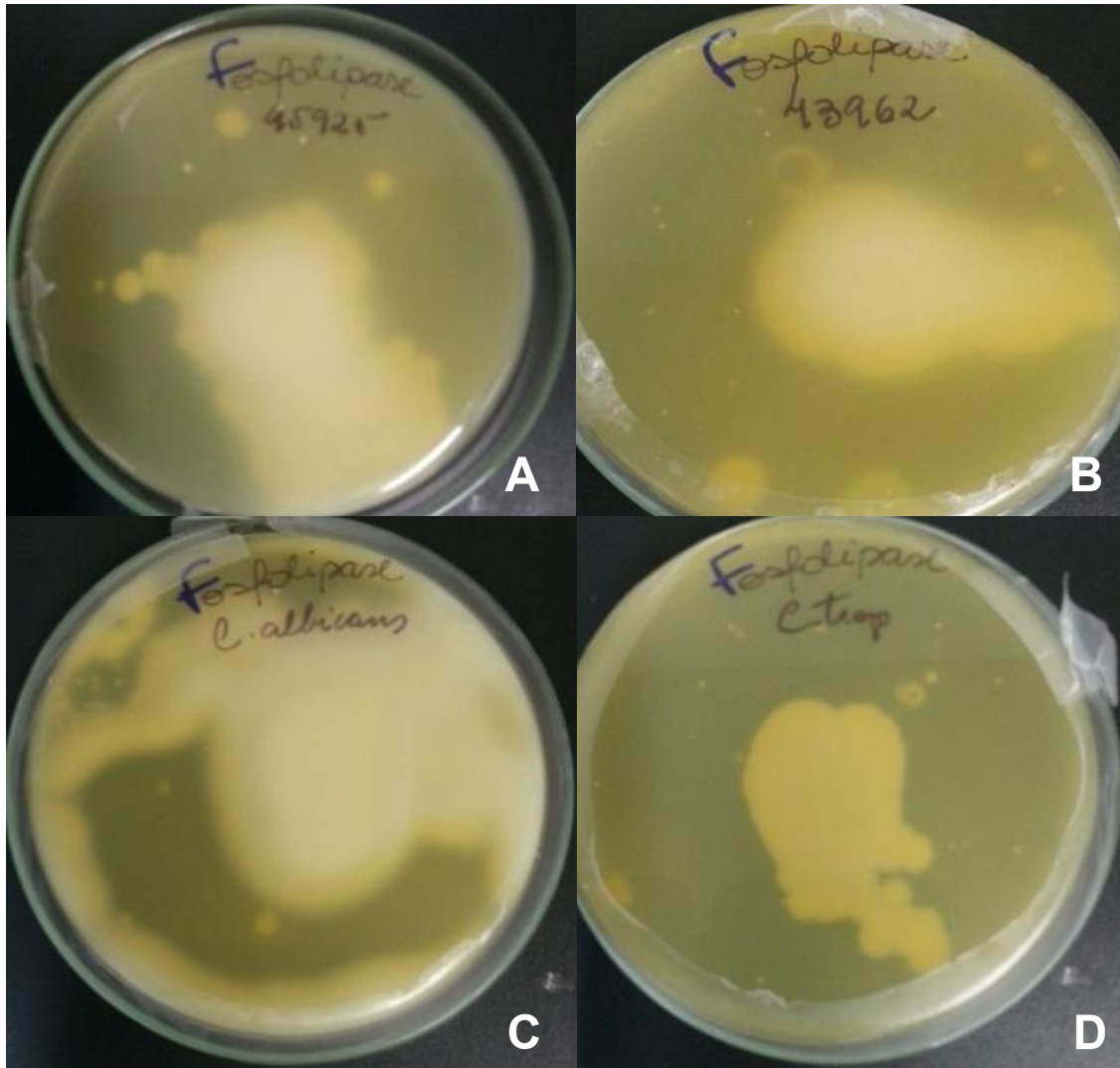


Figura 26. Teste da fosfolipase. Formação do halo de precipitação leitoso para os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (A –B). Formação do halo de precipitação leitoso para o isolado de *C. albicans* (C). Ausência do halo de precipitação para o isolado de *C. tropicalis* (D).

QUADRO 1. Perfil exoenzimático dos isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo, *C. tropicalis* e *C. albicans*

Isolados	LDI 12024	LDI 41472	LDI 43962	LDI 45925	LDI K01	<i>C.tropicalis</i> INCQS	<i>C.albicans</i> INCQS
Provas							
Hemolisina 48 h	Hemólise	Hemólise	Hemólise	Hemólise	Hemólise	Hemólise	Hemólise
Urease 7 dia	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Proteinase 7 dias	$PZ \geq 0,64 < 1$	$PZ \geq 0,64 < 1$	$PZ \geq 0,64 < 1$	$PZ \geq 0,64 < 1$	$PZ \geq 0,64 < 1$	$PZ \geq 0,64 < 1$	$PZ \geq 0,64 < 1$
DNase 7 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Lipase 10 dias	Halo precipitação intensa	Halo precipitação intensa	Halo precipitação intensa	Halo precipitação intensa	Halo precipitação intensa	Halo precipitação intensa	Halo precipitação fraco
Fosfolipase 10 dias	Halo precipitado intenso	Halo precipitado intenso	Halo precipitado intenso	Halo precipitado intenso	Halo precipitado Intenso	sem halo de precipitação	Halo precipitado intenso
Caseinase 15 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Gelatinase 15 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

4.12. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) PARA OBTER O PERFIL PROTEICO DE ANTÍGENO BRUTO DAS CÉLULAS FÚNGICAS CULTIVADAS

4.12.1. Exoantígeno bruto

Quando o exoantígeno da cultura do agente etiológico da doença de Jorge Lobo foi submetido à eletroforese de proteínas, verificamos bandas com massas moleculares variando de 20 kDa a 220 kDa, com uma distribuição padronizada, como pode ser observado nas amostras de cultivo (5 a 9), em comparação com *P. brasiliensis* (4), *C. tropicalis* (3) e *C. albicans* (2). Para a cepa de *C. tropicalis* (3) observamos uma forte expressão da proteína com massa molecular entre 25-30 kDa, que está ausente nas outras cepas testadas (**Figura 27**).

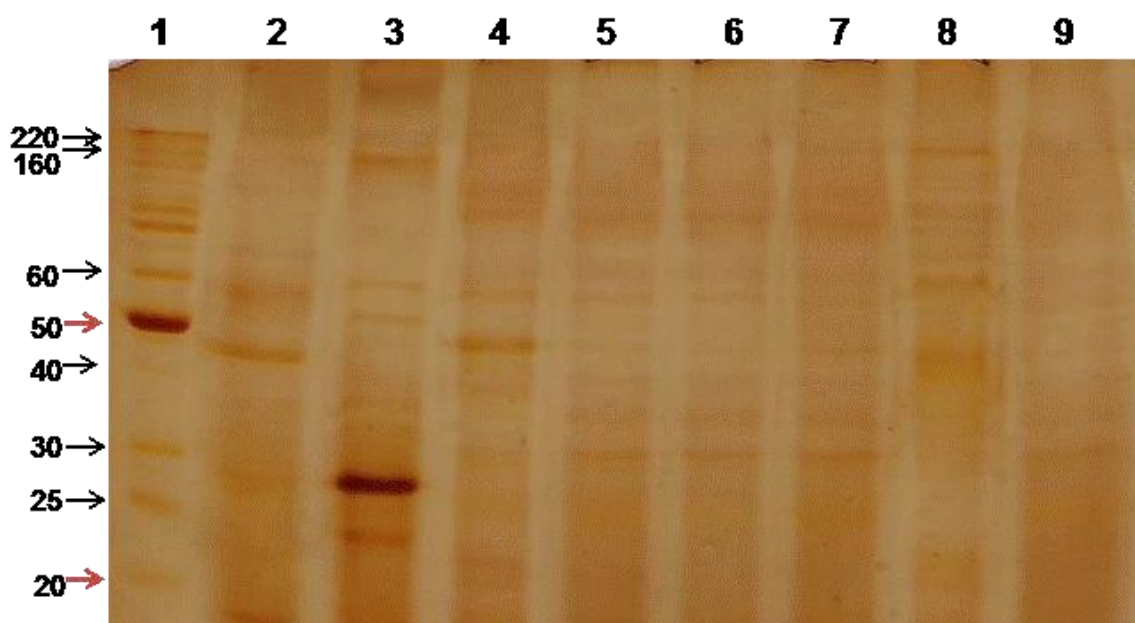


Figura 27. Gel de SDS PAGE de antígeno de células de cultura do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. O padrão de bandas de exoantígenos do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (5-9) é diferente dos padrões apresentados pelo *P. brasiliensis* (4), *C. tropicalis* (3) e *C. albicans* (2).

4.13. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* - FISH (FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION)

Na caracterização de ploidia da célula do agente etiológico da doença de Jorge Lobo logo após o isolamento, identificamos a presença de células haplóides, considerando a marcação única para o gene C-MYC, ou seja, a célula apresentou apenas um alelo do gene (**Figura 28**). Além da definição de haploidia, verificou-se também uma forte marcação interna para o citoesqueleto pela faloidina, além da visualização da parede celular espessa dos fungos pelo calcofluor.

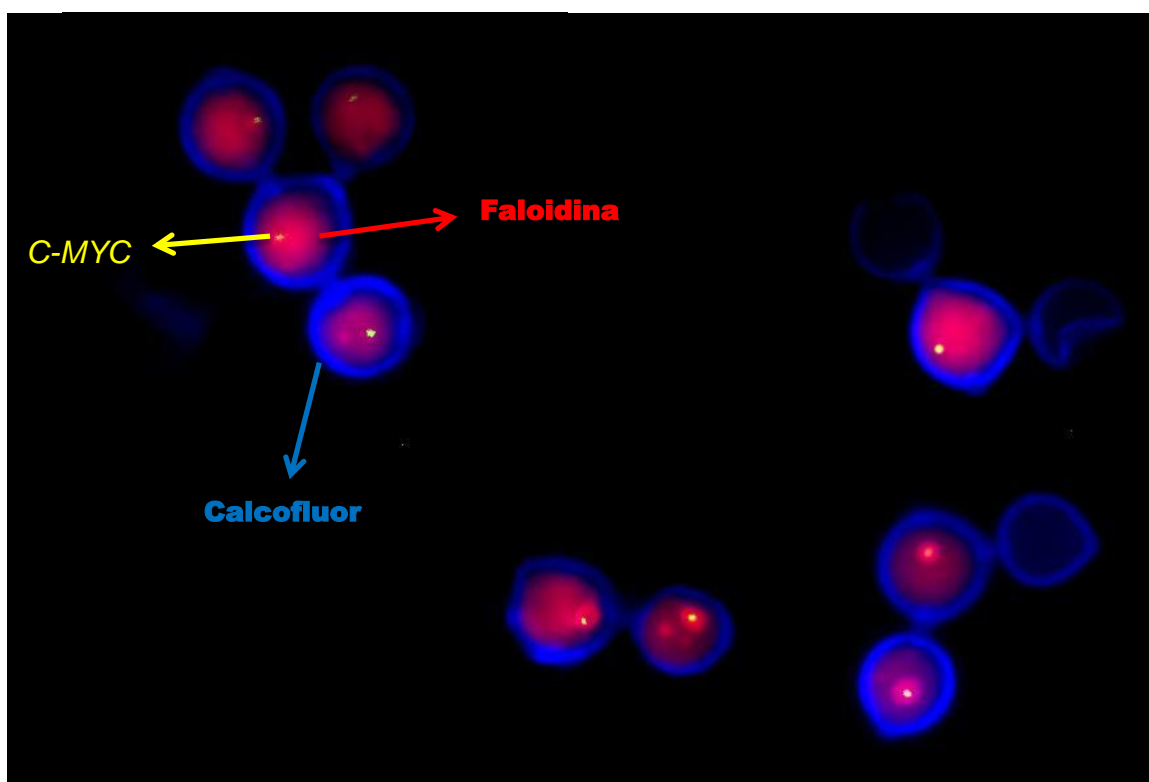


Figura 28. Hibridização Fluorescente *in situ* de células do agente etiológico da doença de **Jorge Lobo**. O gene C-MYC positivo está marcado em verde (*Vysis LSI Spectrum Green Probe*) (seta amarela), caracterizando haploidia celular. O citoesqueleto das células fúngicas foi marcado em vermelho (faloidina-rodamina) (seta vermelha) e a parede celular do fungo marcada em azul (calcofluor) (seta azul) (C). 1000x

4.14. SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE CÉLULAS RECÉM-ISOLADAS DO PACIENTES

Para a obtenção do genoma do agente etiológico da doença de Jorge Lobo foram realizados três sequenciamentos, os quais produziram 965.916, 953.226 e 4.378.245 de leituras. Considerando-se que o genoma tenha um tamanho de ~14 megabases (Megabases) de acordo com os dados de espécies já disponíveis no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), o genoma foi representado em 66x de cobertura.

Após remoção dos adaptadores e análise de qualidades das leituras, os dados foram concatenados e montados através do programa Mira e SPADES, o que gerou 367 *contigs* com um total de 13.991.467 pb.

A predição gênica realizada nos 367 *contigs* do agente etiológico da doença de Jorge Lobo, identificou 7103 CDSs, 6 genes de rRNA (8S/18S/28S) e 147 tRNAs. Na análise funcional por Blast2GO, 5990 proteínas foram anotadas e de acordo com o terceiro nível de classificação do GO, os processos biológicos mais representativos foram os de processos celulares, metabólicos e resposta a estímulos. Além disto, nos resultados de Blast gerados pela ferramenta Blast2GO, observou-se que as CDS do agente etiológico da doença de Jorge Lobo apresentaram similaridade com sequências das espécies *C. albicans*, *Meyerozyma guilliermondii*, *C. tropicalis*, *Millerozyma farinosa*, *C. maltosa*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* (**Figura 29 A**), porém as CDS do agente etiológico da doença de Jorge Lobo apresentaram maior homologia com as sequências de *C. tropicalis* (**Figura 29 B**).

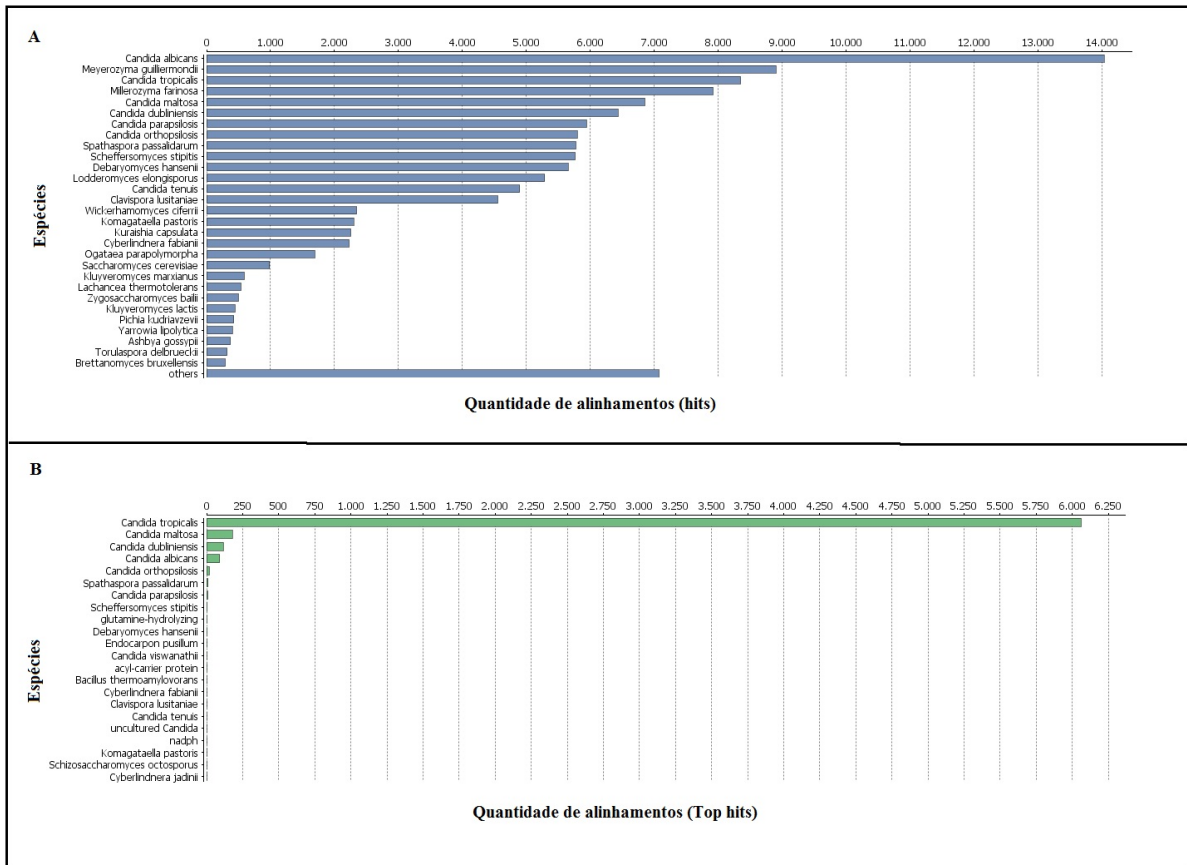


Figura 29. Resultado de Blast das CDS do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Distribuição das espécies que apresentaram similaridade com sequências proteicas do agente etiológico da doença de Jorge Lobo (A). Distribuição das espécies de acordo com o melhor alinhamento para todos os CDS do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. Blast: *Basic Local Alignment Search Tool* (B).

A partir dos resultados observados na figura 28, selecionou-se 5 genes e as regiões *internal transcribed spacer* (ITS), *external transcribed spacer 1*(ETS1) e *non-transcribed spacer 2*(NTS2) de *C. tropicalis* CBS94 e *C. tropicalis* ATCC750 disponíveis na base de dados Genbank, por serem considerados marcadores filogenéticos, a fim de ratificar a alta homologia desta espécie com o agente etiológico da doença de Jorge Lobo em estudo. O quadro 2 mostra o resultado dos alinhamentos por Blastn e pode-se observar que as sequências da espécie em estudo possuem alta identidade com *C. tropicalis*, porém os genes 18S/ 5S e regiões ETS1/NTS2 apresentaram algumas diferenças na porcentagem de identidade, número de bases alinhadas e *gaps*. Devido a estas diferenças moleculares, as sequências do genoma do agente etiológico da doença de Jorge Lobo foram registradas no Genbank como *Candida* sp. LDI48194, Bioprojeto PRJNA2657 (ANEXO C).

Quadro 2. Resultado de Blastn das sequências de marcadores filogenéticos de *Candida tropicalis* e *Candida* sp. (LDI48194). As sequências dos genes marcadores filogenéticos são de *Candida tropicalis* CBS94 e *Candida tropicalis* ATCC750.

RPB2: *RNA polymerase II second largest subunit*.

Gene name	ACTIN	ACTIN	RPB2	18S rRNA	28S rRNA	28S rRNA	ITS	ITS	5S, Região NTS2&ETS1
Query lenght	979	489	1056	1096	865	660	518	493	2134
Query accession	AJ508499	AY497587	AY497626	AY497767	KJ651194	AY497695	KJ651200	NR_111250	FN554382
Genome táxon:									
<i>Candida tropicalis</i> MYA3404	1.000 979 0**	1.000 489 0	1.000 1056 0	0.999 1095 0	1.000 862 0	1.000 660 0	0.998 517 1	0.998 492 1	0.992 2117 2
<i>Candida</i> sp LDI48194	1.000 979 0	1.000 489 0	0.997 1053 1	0.997 1094 2	1.000 862 0	1.000 660 0	1.000 518 0	1.000 493 0	0.983 2100 7
<i>Candida dubliniensis</i>	0.940 920 0	0.939 459 0	0.833 879 16	0.992 1089 2	0.956 826 3	0.962 636 1	0.847 460 35	0.840 435 35	0.834 372 12

** Identity fraction - identical bases - gaps

5. DISCUSSÃO

A idéia inicial da possibilidade do isolamento e cultivo do agente etiológico da doença de Jorge Lobo teve origem há alguns anos no Laboratório de Dermato-Imunologia, durante experimentos que buscavam separar a derme da epiderme de pacientes com doença de Jorge Lobo, a fim de isolar e purificar células de Langerhans a partir das lesões nodulares e/ou queloidiformes observadas nestes pacientes.

Àquela altura tínhamos em nosso registro ativo 11 pacientes, dois deles apresentando a forma clínica cutâneo-difusa, forma polar e rara, e o restante com doença de Jorge Lobo cutânea localizada nodular, que é a forma mais descrita na literatura (Talhari et al., 2008; Paniz-Mondolfi et al., 2012). A presença de lesões nos pavilhões auriculares deve ser ressaltada, considerando que a teoria mais aceita para esta localização seria a inoculação percutânea do fungo no próprio local da lesão (Moraes, 1962; Leite, Dias e Araújo, 1971; Brito e Quaresma, 2007). No entanto, 5 (21,7%) pacientes apresentaram lesões nesta região, o que difere significativamente da nossa casuística com cromoblastomicose, onde raras vezes observamos lesões nos pavilhões auriculares. De fato, em 152 pacientes de cromoblastomicose do nosso registro ativo, apenas 1 (0,6%) apresentou lesões em um dos pavilhões auriculares (dados não publicados).

Esta constatação, associada a observação de lesões da doença de Jorge Lobo nos pavilhões auriculares de pacientes descritos em outros trabalhos, assim como o fato de doenças como hanseníase Virchowiana (Opromolla, D. V. A. et al., 1999; Salgado e Barreto, 2012) e leishmaniose cutâneo-difusa (Silveira, 2009) também terem lesões nos pavilhões auriculares, independente da inoculação percutânea do *Mycobacterium leprae* ou da *Leishmania (L.) amazonensis*, nos faz pensar em outras hipóteses para esta localização peculiar das lesões.

As células fúngicas em cultivo apresentaram a média de 1,9 μm de diâmetro, o que possibilitaria a sua circulação sanguínea e/ou linfática e, caso tenham ligantes para receptores de células da pele, poderiam se fixar aos tecidos dos pavilhões auriculares, assim como ocorre na hanseníase Virchowiana e na leishmaniose cutâneo-difusa. Novos estudos são necessários para testar esta hipótese.

A expressão clínica da doença de Jorge Lobo, além de apresentar lesões polimórficas, parece ser também uma doença espectral, variando desde a forma clínica cutâneo-difusa, rara, que seria a forma polar com pouca resposta imune efetiva para controlar a doença, até as formas cutâneas localizadas. Não há descrição do envolvimento de órgãos internos.

A descrição da patologia (Lobo, 1933)

”Tenho a honra de apresentar um caso de blastomicose diferente dos habitualmente estudadas no Brasil, pelo seu aspecto clinico, histológico e micológico – Como se sabe, este termo de blastomicose, impróprio, por ser fundado sob a designação de blastomiceto criado por Franck, e, que serve para mencionar todos os cogumelos, que abroham em um período de sua evolução, ainda vai ser usado nesse caso, porque é ele, como diz Langeron, o que ainda mais satisfaz para evitar confusões”.

Considerando as características clínicas da doença de Jorge Lobo, Fonseca e Lacaz escreveram (Fonseca e Lacaz, 1971)

“Que as informações obtidas sobre a micose como o estudo das lesões cutâneas, dados epidemiológicos, infectividade para animais de laboratório e algumas provas imunológicas justifica considerar a doença de Jorge Lobo como micose autônoma, diferente da Paracoccidioidomicose com a qual alguns pesquisadores comparam-na”.

A doença de Jorge Lobo encontra-se entre as doenças emergentes e negligenciadas. A expansão da doença é bem evidenciada com o surgimento de novos casos em humanos fora da região Amazônica (Al-Daraji, Husain e Robson, 2008; Arju et al., 2014), bem como com a identificação de novos casos em mamíferos marinhos examinados em todos os oceanos (Van Bresse et al., 2015).

Os dados epidemiológicos resultantes do estudo mostram que o principal grupo acometido pela doença de Jorge Lobo é composto por indivíduos adultos do sexo masculino, que exercem atividades de lavrador, fator facilitador para traumatismo que parece ser a forma de infecção do patógeno. A idade dos pacientes atendidos variou de 14 a 80 anos, indicando que casos novos continuam surgindo, o que corrobora com a endemia em expansão. O fato da incidência da doença de Jorge Lobo ser maior em homens pode ser devido muito mais a estreita relação com o meio ambiente do que a fatores hormonais ou genéticos (Elsayed et al., 2004; Xavier et al., 2008; Bermudez et al., 2009). Existem relatos da ocorrência em indígena caiabi de 5 anos (Machado e Silveira, 1966) e em idoso de 83 anos (Brun, 1999).

No Serviço de Dermatologia do Acre foram diagnosticados no período de 10 anos, 30 mulheres e 219 homens com a doença de Jorge Lobo, com idade variando de 14 a 96 anos (Woods, Belone Ade, et al., 2010). Dentre os principais sítios anatômicos acometidos estão os pavilhões auriculares, com 94 (37,7%) casos, corroborando com a nossa hipótese de disseminação do fungo pela circulação sanguínea e/ou linfática, e os membros superiores, com 77 casos (30,9%), o que difere da nossa casuística que possui mais casos com lesões nos

membros inferiores. Uma das possibilidades para explicar esta diferença anatômica seria a ocupação dos pacientes. Enquanto a maioria dos nossos pacientes trabalha como lavradores, muitos dos pacientes do Acre trabalham em seringais, portanto, pelo manuseio dos vegetais, com muito mais possibilidade de implantação do fungo nos membros superiores (Woods, Belone Ade, et al., 2010).

Para o diagnóstico diferencial da doença de Jorge Lobo deve-se levar em consideração que as lesões com aspecto verrucoso, nodular ou vegetante podem ser confundidas com outras micoses como a esporotricose, cromoblastomicose, paracoccidiodomicose ou com processos neoplásicos. As lesões tipo placa infiltrativa podem ser confundidas com hanseníase ou leishmaniose cutânea difusa.

Em relação à candidíase, as características clínicas da doença causada por *Candida tropicalis* vão depender do sítio de infecção, que varia desde infecções cutâneas de orofaringe a candidíase pulmonar, candidíase gastrointestinal, disseminada e candidemia, envolvendo fluidos e órgãos internos. As infecções por *C. tropicalis* tem aumentado consideravelmente no mundo, passando este fungo a ser considerado um patógeno emergente (Kothavade et al., 2010). A *C. tropicalis* apresenta potencial de invasão maior do que a *C. albicans* e estima-se que 50-60% dos pacientes com condições predisponentes, como câncer e pacientes neutropênicos, desenvolvam candidíase invasiva quando colonizado por esta espécie (Cantón, Viudes e Pemán, 2001). Portanto, há uma nítida separação da clínica da doença de Jorge Lobo com os sinais e sintomas desenvolvidos por pacientes com candidíase por *C. tropicalis*, indicando realmente se tratar o agente da doença de Jorge Lobo uma nova espécie de *Candida*.

De volta aos experimentos para separar a epiderme da derme destes pacientes a partir de biópsias das lesões, começamos a observar que a derme das biópsias coletadas, quando deixadas imersas em solução de dispase em meio líquido RPMI1640, apresentava uma desagregação celular, associada a liberação de células fúngicas parasitárias nos poços das placas de cultura. Esta observação nos alertou para a possibilidade de isolarmos a forma parasitária do agente da doença de Jorge Lobo do tecido humano, e assim podermos ter células fúngicas em grande quantidade para estudos *in vitro*, o que poderia nos trazer novas informações sobre este fungo. A técnica do isolamento realmente nos trouxe novas informações, que foram publicadas pelo nosso grupo em 2009 (Salgado et al., 2009).

Naquele momento, uma vez que o fungo havia sido isolado, em tese poderia ser mantido *in vitro* por um período indeterminado de tempo, tornando mais próxima a hipótese

do cultivo laboratorial do fungo, apesar da sugestão de que a impossibilidade em cultivar este fungo estaria ligada a alterações genômicas, como mutações em vias metabólicas (Mendoza et al., 2005) e que o fungo perderia a sua viabilidade rapidamente, do momento da aquisição da amostra até a inoculação final em um animal de laboratório, tornando sua cultura *in vitro* impossível (Rosa et al., 2010).

Caso não pudéssemos cultivar como uma outra forma, filamentosa ou leveduriforme, que possibilitasse o cultivo em meio sólido ou semi-sólido, seria possível pelo menos mantê-lo na sua forma parasitária por longos períodos no meio de cultura líquido em que havia sido isolado? Para responder a isto, tentamos utilizar técnicas convencionais de avaliação de morte celular, como azul tripan ou iodeto de propídio, acetato de fluoresceína e brometo de etídio, sempre com dificuldades para definir se realmente as células estavam viáveis, considerando inclusive a descrição de manutenção da viabilidade celular em 4°C (Vilani-Moreno e Opromolla, 1997) em contraste com a sua diminuição quando mantidos à 37°C, já que a nossa proposta era o uso da enzima dispase II por pelo menos 7 dias, à 37°C, em estufa de CO₂, para separar o fungo do tecido humano. Desta forma, partimos para a inoculação do material isolado em pata de camundongo logo após o isolamento, o que nos possibilitaria ter uma prova definitiva de que o fungo estaria viável, o que acabou sendo confirmado. Não apenas o fungo permaneceu viável e em multiplicação, como após 6 a 12 meses da inoculação, era possível isolá-lo novamente das patas dos camundongos, e a sua morfologia, bem como o aspecto clínico da lesão das patas era idêntico ao encontrado em humanos, conforme demonstrado na clínica e histopatologia da lesão em Balb/c.

Ao mesmo tempo em que inoculamos nas patas dos camundongos uma parte do material obtido, deixamos o restante em meio líquido RPMI1640 5% SFB, em estufa de 5% CO₂.

Desde a sua primeira descrição em 1931, a caracterização morfológica do agente etiológico da doença de Jorge Lobo esteve ligada a espécie *Paracoccidioides brasiliensis* e baseado nestas semelhanças recebeu a denominação de *Paracoccidioides lobo* (Fonseca e Lacaz, 1971). Por este motivo o *P. brasiliensis* foi a espécie utilizada em várias publicações para a comparação das características do agente etiológico da doença de Jorge Lobo.

Na tentativa de cultivar o fungo, vários experimentos foram realizados continuamente. Ao cultivarmos as células obtidas do isolamento enzimático em diferentes meios de cultura, como ágar Sabouraud, BHI, Fava Netto à 25° C e à 37°C, diferente de outras espécies fúngicas, não observávamos crescimento. JORGE LOBO (1933) acreditou ter isolado o fungo em meio Sabouraud e relatou que as culturas à 26° C à 30°C eram obtidas com muita

dificuldade. Dias et al (1970) na tentativa de cultivar o fungo, semearam material obtido do raspado de lesões em ágar Sabouraud-dextrose, com resultado negativo após 60 dias. No entanto, quando semeou macerados de escamas da superfície de biópsias e fragmentos inteiros retirados da lesão em solução salina, acrescida de glicerol (50:50) ou água de coco com glicerol (50:50), entre lâmina e lamínula por um período de 3 meses à temperatura ambiente, observou o crescimento do fungo por brotamento simples ou múltiplo, semelhante ao observado no tecido retirado da lesão.

Ainda na tentativa de cultivar o fungo, Sampaio (1974) em uma nota refere que semeou material proveniente de paciente com doença de Jorge Lobo em meio contendo soro fetal bovino, penicilina, anfotericina B e fitohemaglutinina. Após um período de 20 dias de cultivo à 37° C, observou crescimento de colônia esbranquiçada com grande quantidade de fungos e acreditou ter cultivado o agente etiológico da doença de Jorge Lobo.

Silva e Brito, (1994) semeou material de biópsia rico em parasito, em meio líquido contendo soro fisiológico glicerinado a 30%, acrescido de vitamina B, à 4° C. Relata que o fungo tem crescimento muito lento, de modo que após 3 meses, o esgotamento do meio o que dificulta o crescimento do fungo. Algumas tentativas de semeio diretamente em ágar foram realizadas, porém sem sucesso.

Fonseca e Lacaz (1971) estudaram 5 amostras isoladas de pacientes com doença de Jorge Lobo, que foram semeadas em ágar Sabouraud, ágar Czapeck e caldo Sabouraud. Concluíram que duas delas eram da espécie *Aspergillus penicilioides*, uma *Paracoccidioides brasiliensis*, uma identificada como uma levedura do ambiente denominada *Sterigmatomyces halophilus* e outra não identificada. Vilela et al.(2007) através de estudos moleculares demonstrou que este fungo não identificado por Fonseca e Lacaz em 1971 era uma cepa filogeneticamente idêntica a sequências de *P. brasiliensis*, mas significativamente diferente de sequências de *L.loboi* disponíveis no NCBI, concluindo que o agente causador da doença ainda não havia sido isolado.

Retornando para nosso estudo, observamos que não havia crescimento das células recém-isoladas e diretamente cultivadas em ágar, em contraste com o crescimento observado em meios líquidos, mantidos à 37° C, 5% CO₂, e diferentes fatores parecem contribuir para isto: o isolamento do fungo com a sua separação do tecido humano, o cultivo em meio líquido e a utilização da enzima dispase II.

Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade dos fungos em ajustarem a quantidade de soluto intracelular em resposta às alterações no meio ambiente, como as variações de

disponibilidade de água (Kuehn e Suberkropp, 1998). Diferentes genes de resposta ao estresse osmótico são ativados em *C. albicans* (Marotta et al., 2013) ao mesmo tempo em que há uma rede de regulação e controle de detecção e captação de nitrogênio do meio externo (Ramachandra et al., 2014). O isolamento do agente etiológico da doença de Jorge Lobo, com o consequente cultivo em meio líquido faz com que ele seja transferido de uma situação adversa no tecido humano, para um meio rico em nutrientes, incluindo vitaminas e proteínas, o que deve facilitar a transição da sua forma parasitária para a forma sapróbia provavelmente encontrada na natureza. Talvez o meio sólido não consiga fazer esta sinalização do modo adequado, inibindo esta transição, ou o tempo necessário para isso aconteça talvez seja maior que o tempo de esgotamento do meio.

A dispase age na desagregação tecidual atuando sobre a fibronectina e colágenos tipo IV (Stenn et al., 1989), e pode ser aqui um fator importante para estimular a diferenciação do fungo. Uma possibilidade é a enzima ter ação sobre a parede celular, que de alguma forma desestabiliza, ativa ou rompe seus constituintes. A parede celular determina a forma do fungo e uma vez removida por tratamento enzimático leva a liberação de seu protoplasma, essa é a via de crescimento dos fungos, seja como hifa ou levedura. O crescimento é determinado por componentes da parede e de como esses componentes estão organizados e ligados uns aos outros (Deacon, 1997).

Domingos Barbosa da Silva diz: que “o aspecto do parasito é idêntico nos tecidos, porém modifica-se totalmente nas culturas, o que o afasta evidentemente do grupo das blastomicoses verdadeiras”(Silva e Macedo, 1997). Madeira et al.(2003) mostram que a célula parasitária de fato se multiplica por brotamento, pois após 4 meses de inoculação experimental houve aumento do tamanho do infiltrado e do número de células no tecido.

Um outro aspecto observado à microscopia óptica foi uma movimentação intensa dos componentes intracelulares nas células fúngicas recém-isoladas, que poderia estar sendo realizada pelo citoesqueleto do agente etiológico da doença de Jorge Lobo. A presença de vesículas citoplasmáticas em íntima associação com o citoesqueleto de células fúngicas é reconhecida há algum tempo, e parece estar relacionada com a formação da parede celular (Howard, 1981).

Para analisar a presença do citoesqueleto nas células fúngicas recém-isoladas, resolvemos utilizar a faloidina associada ao corante fluorescente vermelho rodamina. Assim, poderíamos ao mesmo tempo visualizar a presença do citoesqueleto em vermelho, com a parede celular em azul utilizando o calcofluor e a definição de ploidia pela técnica de FISH,

usando uma sonda verde. A intensa coloração observada indicou a presença do citoesqueleto nas células fúngicas recém-isoladas, e como demonstrado em outros fungos (Adams e Pringle, 1984), a F-actina, que é o sítio de ligação da faloidina, deve estar envolvida na polarização da divisão celular e na deposição de componentes da parede durante a multiplicação do fungo.

Em relação à ultraestrutura, a análise das células recém-isoladas por MEV apenas confirmou a morfologia observada na microscopia óptica, composta por células leveduriformes, catenuladas, que se multiplicam por brotamento. Os trabalhos com microscopia eletrônica do agente etiológico da doença de Jorge Lobo são bastante escassos, e todas as imagens disponíveis foram feitas no tecido infectado.

Haubold et al, (2000), faz referência a uma parede porosa, destruída pela reação do hospedeiro, o que não foi observado no nosso estudo. Pelo contrário, a parede celular do fungo parece completamente íntegra, mesmo após vários dias em tratamento enzimático, e a presença dos brotamentos, assim como o crescimento do fungo inoculado na pata dos camundongos indicam viabilidade celular. Adicionalmente, confirmamos a presença de estriações radiadas na porção externa da parede celular (Dias, L. B., Sampaio, M. M. e Silva, D., 1970) à microscopia óptica, que não foram observadas à MEV, talvez em razão de um tratamento extra com KOH antes do processamento para MEV.

A MEV e a MET do cultivo demonstraram que as células de pequeno tamanho observadas na microscopia óptica já apresentavam arranjos catenulados e a parede espessa, característica de células fúngicas (Dornelas-Ribeiro et al., 2012). A MET confirmou ainda a multiplicação por brotamento e a presença de hifas septadas, que só são observadas em três espécies de *Candida*, relacionadas filogeneticamente, *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (Thompson, Carlisle e Kadosh, 2011).

Baseado nas características macroscópicas e microscópicas observadas nos isolados obtidos em nosso estudo, consideramos que o grupo fúngico que apresentava mais semelhança aos nossos isolados eram os do gênero *Candida*, e testes fisiológicos eram necessários para a melhor caracterização dos fungos em cultivo.

Os isolamentos e o crescimento em diferentes meios de cultura continuaram acontecendo durante os anos seguintes, e na tentativa de caracterizar a células leveduriformes que se desenvolviam nos meios artificiais, testes padrões utilizados para identificar as principais leveduras de interesse médico foram realizados.

Dois fenótipos característicos, incluindo a habilidade de produção de clamidósporos e a do tubo germinativo estão associados especificamente a espécies de *Candida*, principalmente

a *C. albicans* e *C. stellatoidea* (Odds, 1988). Os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo, quando cultivados em soro humano à 37°C por 2h não apresentaram a formação do tubo germinativo e quando cultivados em meio que estimula a esporulação como o ágar batata não observamos a formação de clamidósporos.

Oito provas fisiológicas foram realizadas com 5 amostras das nossas culturas, em comparação com *C. tropicalis* e *C. albicans*, apresentando resultados bastante similares, com exceção da prova de produção da fosfolipase, que foi negativa para a *C. tropicalis*. Negri et al (2010) mostraram que as amostras de *C. tropicalis* isoladas do sangue, urina e cateter produziram hemólise total. Em relação as proteases, estas foram produzidas ou não nos diferentes materiais biológicos e somente um isolado de *C. tropicalis* proveniente de cateter venoso produziu fosfolipases. Os achados de diversos autores mostram que o perfil exoenzimático de isolados fúngicos pode variar de acordo com o material biológico.

Na década de 1990 surgiram os meios cromogênicos com a com o objetivo de isolar e identificar algumas espécies de *Candida* de uma forma mais rápida. A identificação baseia-se na diferença de coloração das colônias produzidas por reações enzimáticas com substrato cromogênico indicador do meio. Enquanto 63.7% das cepas isoladas apresentou a coloração azul similar ao crescimento de *C. tropicalis*, indicando uma proximidade com esta espécie, 33,3% não degradou o substrato cromogênico e, portanto, não alterou a coloração da cultura. Ao mesmo tempo em que a alta especificidade e sensibilidade (>99%) para a identificação de *C. tropicalis* em amostras clínicas (Odds e Bernaerts, 1994) indicaram uma proximidade das nossas amostras com esta espécie, a ausência de degradação do substrato em quase 35% das cepas tornava obrigatória a realização de outros testes fisiológicos.

O sistema automatizado VITEK-2 consegue identificar corretamente até 98% das cepas de leveduras obtidas de espécimes clínicos (Sanguinetti et al., 2007). Dos nossos isolados clínicos do agente etiológico da doença de Jorge Lobo mantidos em cultura, o VITEK-2 identificou 20% como *C. parapsilosis* e 20% como *C. tropicalis*, porém, não conseguiu definir nenhuma espécie conhecida em 60% das cepas, sugerindo desta forma que estes isolados apresentam características próprias.

A produção de melanina por leveduras do gênero *Cryptococcus* em meios com substrato fenólicos é bastante utilizada para identificação deste gênero em laboratórios clínicos. Os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo foram semeados em ágar niger e não apresentaram a coloração negra ou acastanhada característico da cultura de *Cryptococcus* quando cultivados neste meio. Tabora et al (1999), porém, utilizando a técnica de coloração

histoquímica de Fontana-Masson afirma que o *L. loboi* apresenta melanina constitutiva em sua parede celular. No entanto, Liu mostra em *Cryptococcus neoformans* que o produto na parede do fungo evidenciado pela técnica de Fontana-Masson é diferente da melanina podendo ser o produto da oxidação de catecolaminas (Liu et al., 1999). Desta forma, Franco em 1999 propõe uma nova avaliação quanto a produção de melanina pelo agente etiológico da doença de Jorge Lobo (Franco, 1999).

A análise do perfil proteico e glicoproteico tem permitido a identificação e classificação de várias cepas, gêneros e espécies de leveduras em estudos taxonômicos e epidemiológicos. A avaliação dos resultados obtidos no SDS-PAGE para 5 das nossas amostras revelaram uma distribuição padronizada de bandas entre 30 e 220 kDa nas cinco cepas estudadas, que diferenciou as nossas amostras das cepas padrão INCQS de *C. albicans* e *C. tropicalis*, assim como de uma cepa de *P. brasiliensis* isolado de um paciente local. O padrão de bandas obtidas para *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentou similaridade com o trabalho de (Duran et al., 2007).

Em relação à ploidia celular, a técnica de FISH demonstrou que os fungos isolados eram haploides, o que à princípio diferencia o agente etiológico da doença de Jorge Lobo de algumas espécies de *Candida* sabidamente diplóides, como a *Candida albicans* e a *Candida tropicalis* (Butler et al., 2009). Este resultado, em conjunto com os outros dados morfológicos e fisiológicos discutidos acima parecem corroborar a definição do agente etiológico da doença de Jorge Lobo como uma nova espécie de *Candida*. No entanto, mesmo com todos os dados morfológicos e fisiológicos avaliados, ainda precisávamos de análises moleculares para definir a espécie.

A taxonomia fúngica é baseada principalmente nas características morfológicas e fisiológicas, porém entre os fungos existem muitas características comuns, o que dificulta a caracterização. Por isso, cada vez mais a utilização de testes moleculares está sendo empregada para a identificação e definição taxonômica dos fungos. Exemplos clássicos de mudanças taxonômicas são o *Pneumocystis carinni*, até recentemente considerado um protozoário e que após análise da sequência de genes do RNA ribossomal foi demonstrado estar mais relacionado aos fungos (Edman et al., 1988; Wakefield et al., 1992), e o *Rhinosporidium seeberi*, inicialmente considerado como fungo e que após análise de rRNA 18S passou a ser agrupado em um novo clado de parasitas aquáticos protistas (Fredricks et al., 2000).

Baseados na análise da morfologia do fungo em 35 amostras de casos clínicos da doença de Jorge lobo, (Taborda, P. R., Taborda, V. A. e Mcginnis, M. R., 1999), propuseram a criação do novo gênero *Lacazia*, com uma única espécie, *Lacazia loboi*, ao invés da nomenclatura definida anteriormente por Lacaz, como *Paracoccidioides loboi* (Fonseca e Lacaz, 1971). A partir de 1999, com a utilização deste novo gênero, quatro trabalhos (Herr et al., 2001; Vilela et al., 2005; Vilela et al., 2007; Vilela et al., 2009) com a amplificação dos genes 18S rDNA, CS-2 e gp-43 colocaram o gênero *Lacazia* dentro da ordem Onygenales. No entanto, estes quatro trabalhos utilizaram material de parte da biópsia de pacientes, sem isolar o fungo do tecido humano, além de usar a técnica de fenol-clorofórmio para extração do DNA, que em nossas mãos, mesmo com o fungo isolado do tecido humano, permite a obtenção de uma quantidade muito pequena de DNA. Um quinto trabalho, do nosso grupo inclusive (Salgado et al., 2009), utilizando também a técnica de fenol-clorofórmio, ainda nos primórdios da técnica de isolamento enzimático destes fungos, obteve resultados similares, que a nosso ver necessitam ser reavaliados, considerando a ampla experiência adquirida por este grupo com o isolamento enzimático, obtendo fungos com alta pureza e a utilização de kits comerciais para extração de DNA de células de difícil fragmentação, que resultam na obtenção de DNA em maior quantidade e com maior qualidade.

Em nosso estudo atual, como os isolados do agente etiológico da doença de Jorge Lobo apresentaram morfologia e testes fisiológicos similares aos do gênero *Candida*, em especial *C. tropicalis*, apenas através de testes moleculares poderíamos definir a classificação deste fungo. Assim, o sequenciamento do genoma foi realizado e revelou que a organização do genoma do agente etiológico da doença de Jorge Lobo apresentou grande similaridade com sequências do genoma de *C. tropicalis*, seguida pelos genomas de *C. albicans*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Millerozyma farinosa*, *C. maltosa*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. No entanto, o percentual de fração de identidade de 0,997 e 2 gaps no gene 18S e de 0,983 e 7 gaps nas regiões ETS1/NTS2 do gene 5S na comparação com duas cepas padrão de *Candida tropicalis*, permitiu o registro da nossa amostra no NCBI como *Candida* sp. LDI48194, ao invés de *Candida tropicalis*. A associação dos dados clínicos, com a morfologia, a fisiologia e o genoma nos permitem propor a utilização da nomenclatura *Candida loboi* para melhor definir o agente etiológico da doença de Jorge Lobo em humanos.

6. CONCLUSÕES

1. A doença de Jorge Lobo acomete principalmente homens, lavradores acima de 40 anos.
2. A técnica de isolamento das células parasitárias possibilitou novos estudos com o fungo.
3. A inoculação em patas de camundongos confirmou a viabilidade das células fúngicas recém-isoladas.
4. É possível cultivar *in vitro* o agente etiológico da doença de Jorge Lobo.
5. As características macro e microscópicas e a fisiologia dos isolados se assemelharam aos fungos do gênero *Candida*.
6. O genoma do agente etiológico da doença de Jorge Lobo em humanos pertence ao gênero *Candida*, e os achados clínicos, morfológicos e fisiológicos aqui demonstrados fornecem forte evidência de que este fungo constitui uma nova espécie dentro do gênero *Candida*, para a qual propomos a utilização da nomenclatura *Candida lobo*.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, W. M.; MIRANDA, J. L. Microscopia eletrônica scanning: agente da micose de Jorge Lobo. **An Bras de Derm**, v. 47, p. 115-124, 1972.

ADAMS, A. E.; PRINGLE, J. R. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol**, v. 98, n. 3, p. 934-45, Mar 1984. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6365931>>.

AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Eur J Epidemiol**, v. 1, n. 3, p. 160-5, Sep 1985. ISSN 0393-2990 (Print)0393-2990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

AL-DARAJI, W. I.; HUSAIN, E.; ROBSON, A. Lobomycosis in African patients. **Br J Dermatol**, v. 159, n. 1, p. 234-6, Jul 2008. ISSN 1365-2133. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460023>>.

ARJU, R. et al. Jorge Lobo's disease: a case of keloidal blastomycosis (lobomycosis) in a nonendemic area. **Ther Adv Infect Dis**, v. 2, p. 91-96, 2014.

AZULAY, R. D. et al. Keloidal blastomycosis (Lobo's disease) with lymphatic involvement: a case report. **Int J Dermatol**, v. 15, n. 1, p. 40-2, Jan-Feb 1976. ISSN 0011-9059 (Print)0011-9059. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455-77, 2012.

BARUZZI, R. G.; AZEVEDO, R. A. Doença de Jorge Lobo. In: INTERLIVROS (Ed.). **Clínica de doenças tropicais e infecciosas** 1991. p.299-306.

BARUZZI, R. G. et al. Occurrence of Lobo's blastomycosis among "Caiabi," Brazilian Indians. **Int J Dermatol**, v. 12, n. 2, p. 95-9, Mar-Apr 1973. ISSN 0011-9059 (Print)0011-9059. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

_____. Ocorrência de blastomicose queloideana entre índios Caiabi. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 9, p. 135-42., 1967.

BARUZZI, R. G.; LACAZ, C. S.; SOUZA, F. A. A. História natural de doença de Jorge Lobo: ocorrência entre os índios Caiabi (Brasil Central). **Rev. Med. Trop. São Paulo.**, v. 21, p. 302-38. , 1979.

BELONE, A. F. et al. Experimental reproduction of the Jorge Lobo's disease in BALB/c mice inoculated with *Lacazia loboi* obtained from a previously infected mouse. **Mycopathologia**, v. 155, n. 4, p. 191-4, 2002. ISSN 0301-486X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12650594>>.

BERMUDEZ, L. et al. Lobomycosis in man and lobomycosis-like disease in bottlenose dolphin, Venezuela. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. 1301-3, Aug 2009. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1508.090347>>.

BORELLI, D. *Aspergillus*. Sorpresas en micopatología. **Bol Venez Lab Clin** v. 3, p. 47-48, 1958.

_____. Lobomycosis experimental. **Dermatol Venez**, v. 3, p. 72-82, 1961.

_____. [The reservoir area of lobomycosis. Comments on the work of Dr. Carlos Pena on 2 Colombian cases]. **Mycopathol Mycol Appl**, v. 37, n. 2, p. 145-9, Mar 28 1969. ISSN 0027-5530 (Print)0027-5530. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

BOSSART, G. D. Suspected acquired immunodeficiency in an Atlantic bottlenosed dolphin with chronic-active hepatitis and lobomycosis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 185, n. 11, p. 1413-4, Dec 1 1984. ISSN 0003-1488 (Print)0003-1488. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

_____. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Oceanography**, v. 19, p. 134-137, 2006.

BOSSART, G. D. et al. Mucocutaneous lesions in free-ranging Atlantic bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from the southeastern USA. **DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS**, v. 115, p. 175-184., 2015.

BRITO, C. A.; QUARESMA, J. A. Lacaziose (Jorge Lobo's diseases): review and update. **An Bras Dermat**, v. 82, p. 461-74, 2007.

BRUN, A. M. Lobomycosis in three Venezuelan patients. **Int J Dermatol**, v. 38, n. 4, p. 302-5, Apr 1999. ISSN 0011-9059 (Print)0011-9059. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

BURNS, R. A. et al. Report of the first human case of lobomycosis in the United States. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 3, p. 1283-5, Mar 2000. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

BUTLER, G. et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657-62, Jun 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465905>>.

CALCAGNO, D. Q. et al. Aneuploidy of chromosome 8 and *C-MYC* amplification in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. **Anticancer Research** v. 25, p. 4069-4074, 2005.

CALDWELL, D. K. et al. Lobomycosis as a disease of the Atlantic bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821). **Am J Trop Med Hyg**, v. 24, n. 1, p. 105-14, Jan 1975. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637.

CAMARGO, Z. P. et al. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. **Med Mycol**, v. 36, n. 6, p. 413-7, Dec 1998. ISSN 1369-3786 (Print)1369-3786. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

CAMPOS-AASEN, I. Blastomycosis queiloideana o enfermedad de Jorge Lobo em Venezuela. **Dermatol Venez**, v. 1, p. 215-40, 1958.

CANTÓN, E.; VIUDES, A.; PEMÁN, J. **Infección sistémica nosocomial por levaduras**. *Rev Iberoam Micol*: 51-55 p. 2001.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-12, May 2008. ISSN 1087-1845. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2008.02.002>>.

CHAZOTTE, B. Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2010, n. 5, p. pdb.prot4947, May 2010. ISSN 1559-6095. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439405>>.

CHRISTENSEN, W. B. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. **J Bacteriol**, v. 52, n. 4, p. 461-6, Oct 1946. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

CIFERRI, R. P. et al. Taxonomy of Jorge Lobo's disease fungus. **Inst Micol. Univ. Recife**, v. 53, p. 1-21., 1956.

CLYTI, E.; SALGADO, C. G. Lobomycose. **EMC (Elsevier Masson SAS, Paris, Maladies Infectieuses)**, v. 1, p. 1-5, 2007.

DE FONSECA, O. J.; LACAZ, C. A. S. [Study of isolated cultures of keloid form blastomycosis (Jorge Lobo's disease). Taxonomy of its etiological agent]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 13, n. 4, p. 225-52, 1971 Jul-Aug 1971. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5132384>>.

DE VRIES, G. A.; LAARMAN, J. A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. **Aquat Mammals**, v. 1, p. 26-33, 1973.

DEACON, J. W. **Introduction to Modern Mycology**. 3, ilustrada, reimpressão. 1997. 303.

DIAS, L. B.; SAMPAIO, M. M.; SILVA, D. Jorge Lobo's disease. Observations on its epidemiology and some unusual morphological forms of the fungus. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, n. 12, p. 8-15, 1970.

_____. Jorge Lobo's disease. Observations on its epidemiology and some unusual morphological forms of the fungus. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 12, n. 1, p. 8-15, 1970 Jan-Feb 1970. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5535344>>.

DISALVO, A. F.; FICKLING, A. M.; AJELLO, L. Infection caused by *Penicillium marneffei*: description of first natural infection in man. **Am J Clin Pathol**, v. 60, n. 2, p. 259-63, Aug 1973. ISSN 0002-9173 (Print)0002-9173. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

DORNELAS-RIBEIRO, M. et al. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 31 - 38, 2012.

DURAN, N. et al. Numerical analysis of *Candida* species from uriner system infections based on SDS-PAGE and detection of antifungal resistance. **European Journal of General Medicine**, v. 4, n. 3, p. 100-106, 2007.

EDMAN, J. C. et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. **Nature**, v. 334, p. 519 - 522, 1988.

ELSAYED, S. et al. Human case of lobomycosis. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 4, p. 715-8, Apr 2004. ISSN 1080-6040 (Print)1080-6040. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1004.030416>>.

FISCHER, M. et al. [Sucessful treatment with clofazimine and itraconazole in a 46 year old patient after 32 years duration of disease]. **Hautarzt**, v. 53, n. 10, p. 677-81, Oct 2002. ISSN 0017-8470 (Print)0017-8470. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00105-002-0351-y>>.

FONSECA FILHO, O.; AREA LEÃO, A. E. Contribuição para o conhecimento das granulomatoses blastomycoides: o agente etiológico da Doença de Jorge Lobo. **Rev Med Cirurg Brasil**, v. 48, p. 147-58., 1940.

FONSECA, O. J. M.; LACAZ, C. S. **Estudo de culturas isoladas de blastomicose queloidiforme (Doença de Jorge Lobo)**. Denominação do seu agente etiológico. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 13: 225-251 p. 1971.

FRANCO, M. F. Re: "Constitutive melanin in the cell wall of the etiologic agent of Lobo's disease". **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 41, n. 3, p. 209, May 1999. ISSN 0036-4665.

FREDRICKS, D. N. et al. *Rhinosporidium seeberi*: A Human Pathogen from a Novel Group of Aquatic Protistan Parasites. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. 273-282, 2000.

FUCHS, J.; MILBRADT, R.; PECHER, S. A. Lobomycosis (keloidal blastomycosis): case reports and overview. **Cutis**, v. 46, n. 3, p. 227-34, Sep 1990. ISSN 0011-4162 (Print)0011-4162. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

FURLANETO- MAIA, L. et al. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida spp* obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathology**, v. 166, p. 209-217, 2008.

FURTADO, A. N. et al. Doença de Jorge Lobo: Relato de caso e revisão de literatura. **Rev Patol Trop**, v. 42, p. 459-467, 2013.

FURTADO, J. S.; DE BRITO, T.; FREYMULLER, E. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. **Sabouraudia**, v. 5, n. 3, p. 226-9, Feb 1967. ISSN 0036-2174 (Print)0036-2174. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

GULLAND, F. M. D.; HALL, A. J. Is marine mammal health deteriorating? Trends in the global reporting of marine mammal disease. **EcoHealth**, v. 4, p. 135-150, 2007.

HARRINGTON, B. J.; HAGEAGE, G. J. Calcofluor White: A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology. **laboratory medicine**, v. 34, n. 5, p. 361 -367, 2003.

HAUBOLD, E. M. et al. Isolation of fungal rDNA from bottlenose dolphin skin infected with *Loboa lobi*. **Med Mycol**, v. 36, n. 5, p. 263-7, Oct 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075494>>.

_____. Comparative morphology of *Lacazia lobi* (syn. *Loboa lobi*) in dolphins and humans. **Med Mycol**, v. 38, n. 1, p. 9-14, Feb 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746221>>.

HERR, R. A. et al. Phylogenetic analysis of *Lacazia lobi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 309-14, Jan 2001. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.1.309-314.2001>>.

HOWARD, R. J. Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkorper, cytoskeleton and endomembranes after freeze substitution. **J. Cell Sci.**, v. 48, p. 89 - 103, 1981.

KEIICHI, U. et al. Two Cases of Lacaziosis in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in Japan. **Case Reports in Veterinary Medicine**, v. 2013, p. 9, 2013.

KOTHAVADE, R. J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole **Journal of Medical Microbiology**, n. 59, p. 873–880 2010.

KUEHN, A. K., P F; SUBERKROPP, K. Osmoregulatory Responses of Fungi Inhabiting Standing Litter of the Freshwater Emergent Macrophyte *Juncus effusus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 607 - 612, 1998.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeast, a taxonomic study**. Elsevier, 1998.

LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; ROSA, M. C. B. **Doença de Jorge Lôbo**. 1986.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia médica**. 9. São Paulo: 2002. 1104.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

LAGESEN, K. et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 9, p. 3100–3108, 2007.

LANGERON, M.; VANBREUSEGHEM, R. **Precis de mycologie. Mycologie generale: mycologie humaine et animale techniques**. , p. 490–1., 1952.

LEITE, J. M.; DIAS, L. B.; ARAÚJO, R. Blastomicose queloidiana na amazônia (Doença de Jorge Lobo). **Rev Univ Fed Pará.**, v. 1, p. 281-98., 1971.

LIU, L. et al. Catecholamine oxidative products, but not melanin, are produced by *Cryptococcus neoformans* during neuropathogenesis in mice. . **Infect. Immun.**, v. 67, p. 108-112., 1999.

LOBO, J. Um caso de blastomicose, produzido por uma espécie nova, encontrada em Recife. **Rev Med Pernamb.** 1: 763-75. p. 1931.

_____. Contribuição ao estudo das blastomicoses. **Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia**, v. 8, n. 4, p. 43 - 57, 1933.

LOPEZ-MARTINEZ, R. et al. Exoenzimas de dermatifitos aislados de tiñas agudas y crónicas. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.** 36: 17-20 p. 1994.

MACHADO, P. A.; SILVEIRA, D. F. Piraip, a falsa lepra dos Caiabis. **Rev Bras Leprol.** 34: 60 p. 1966.

MADEIRA, S. et al. Comparative experimental infection of *Lacazia loboi* in BALB/c and B10.A mice. **Rev Iberoam Micol:** 55-59 p. 2003.

MAROTTA, D. H. et al. Genome-wide transcriptional profiling and enrichment mapping reveal divergent and conserved roles of Sko1 in the *Candida albicans* osmotic stress response. **Genomics**, v. 102, n. 4, p. 362-371, 2013.

MARSOLLIER, L. et al. Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 10, p. 6296-8, Oct 2004. ISSN 0099-2240 (Print)0099-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.10.6296-6298.2004> >.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006. ISSN 0737-4038 (Print)0737-4038. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msj008> >.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; TAYLOR, J. W. The taxonomic status of *Lacazia loboi* and *Rhinosporidium seeberi* has been finally resolved with the use of molecular tools. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 3, p. 95-8, Sep 2001. ISSN 1130-1406 (Print)1130-1406. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

MENDOZA, L. et al. Use of sera from humans and dolphins with lacaziosis and sera from experimentally infected mice for Western Blot analyses of *Lacazia loboi* antigens. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 1, p. 164-7, Jan 2008. ISSN 1556-679X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959822>>.

_____. *Lacazia loboi* and *Rhinosporidium seeberi*: a genomic perspective. **Rev Iberoamerican Micol:** 213-216 p. 2005.

- MIGAKI, G. et al. Lobo's disease in an atlantic bottle-nosed dolphin. **J Am Vet Med Assoc**, v. 159, n. 5, p. 578-82, Sep 1971. ISSN 0003-1488 (Print)0003-1488. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- MILLER, G. F.; OWENS, J. W. Ultrastructural characterization of the agent of systemic yeast infection of owl monkeys. **Med Mycol**, v. 37, n. 2, p. 139-45, Apr 1999. ISSN 1369-3786 (Print)1369-3786. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- MORAES, M. A. P. Blastomicose tipo Jorge Lobo. Seis casos novos encontrados no estado do Amazonas, Brasil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 4, p. 187-97., 1962.
- MOSI, L. et al. Persistent association of *Mycobacterium ulcerans* with West African predaceous insects of the family belostomatidae. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 22, p. 7036-42, Nov 2008. ISSN 0099-2240. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/aem.01234-08>>.
- MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOON, A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, v. 40, n. 11-12, p. 465-9, Dec 1997. ISSN 0933-7407 (Print)0933-7407. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- MURDOCH, M. E. et al. Lobomycosis in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian River Lagoon, Florida: estimation of prevalence, temporal trends, and spatial distribution. **Ecohealth**, v. 5, n. 3, p. 289-97, Sep 2008. ISSN 1612-9202. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10393-008-0187-8>>.
- MÉDIGUE, C.; MOSZER, I. Annotation, comparison and databases for hundreds of bacterial genomes. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 10, p. 724-736, 2007.
- NEGRI, M. et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, n. 169, p. 175-82. , 2010.
- ODDS, F. C. **Candida e Candidosis**. 2nd edition. Bailliere Tindall, London, UK: 1988. 468.
- ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida Species* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, 1994.
- OPROMOLLA, D. V. et al. Lymph node involvement in Jorge Lobo's disease: report of two cases. **Int J Dermatol**, v. 42, n. 12, p. 938-41, Dec 2003. ISSN 0011-9059. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636186>>.
- _____. Jorge Lobo's disease: experimental inoculation in Swiss mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 41, n. 6, p. 359-64, 1999 Nov-Dec 1999. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10671289>>.
- OPROMOLLA, D. V. A. et al. Lobomycose: relato de 40 casos novos. **An Bras Dermatol**, v. 74, p. 135-41., 1999.

PALIWAL, D. K.; RANDHAVA, H. S. Evaluation of a Simplified *Guizotia abyssinica* Seed Medium for Differentiation of *Cryptococcus neoformans* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 346-348, 1978.

PANIZ-MONDOLFI, A. et al. Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. **Mycoses**, v. 55, n. 4, p. 298-309, Jul 2012. ISSN 1439-0507. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429689>>.

PANIZ-MONDOLFI, A. E.; REYES JAIMES, O.; DAVILA JONES, L. Lobomycosis in Venezuela. **Int J Dermatol**, v. 46, n. 2, p. 180-5, Feb 2007. ISSN 0011-9059 (Print)0011-9059. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.02937.x>>.

PANIZ-MONDOLFI, A. E.; SANDER-HOFFMANN, L. Lobomycosis in inshore and estuarine dolphins. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 672-3, Apr 2009. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.080955>>.

PAPADAVID, E. et al. Lobomycosis: A case from Southeastern Europe and review of the literature. **J Dermatol Case Rep**, v. 6, n. 3, p. 65-9, Sep 28 2012. ISSN 1898-7249. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3315/jdcr.2012.1104>>.

PAUTLER, K. B.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L. Imported penicilliosis marneffeii in the United States: report of a second human infection. **Sabouraudia**, v. 22, n. 5, p. 433-8, 1984. ISSN 0036-2174 (Print)0036-2174. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

PECHER, S. A.; CROCE, J.; FERRI, R. G. Study of humoral and cellular immunity in lobomycosis. **Allergol Immunopathol (Madr)**, v. 7, n. 6, p. 439-44, 1979 Nov-Dec 1979. ISSN 0301-0546. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/539528>>.

PECHER, S. A.; FUCHS, J. Cellular immunity in lobomycosis (keloidal blastomycosis). **Allergol Immunopathol (Madr)**, v. 16, n. 6, p. 413-5, 1988 Nov-Dec 1988. ISSN 0301-0546. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3242380>>.

PIEHL, M. R.; KAPLAN, R. L.; HABER, M. H. Disseminated penicilliosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Arch Pathol Lab Med**, v. 112, n. 12, p. 1262-4, Dec 1988. ISSN 0003-9985 (Print)0003-9985. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

POELMA, F. G. et al. Lobomycosis in an Atlantic bottle-nosed dolphin in the Dolphinarium Harderwijk. **Aquatic Mammals**, 1974.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14, Mar 1982. ISSN 0036-2174 (Print)0036-2174. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

RAMACHANDRA, S. et al. Regulatory Networks Controlling Nitrogen Sensing and Uptake in *Candida albicans* **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-11, 2014.

- RAMOS-E-SILVA, M. et al. Lobomycosis. Literature review and future perspectives. **Actas Dermosifiliogr**, v. 100 Suppl 1, p. 92-100, Nov 2009. ISSN 0001-7310. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096202>>.
- RAPPORT, D. J. What constitutes ecosystem health? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 33, p. 120-132, 1989.
- RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270., 1950.
- RODRIGUEZ-TORO, G.; TELLEZ, N. Lobomycosis in Colombian Amer Indian patients. **Mycopathologia**, v. 120, n. 1, p. 5-9, Oct 1992. ISSN 0301-486X (Print)0301-486x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- ROSA, P. S. et al. Fine-needle aspiration may replace skin biopsy for the collection of material for experimental infection of mice with *Mycobacterium leprae* and *Lacazia loboi*. **Int J Infect Dis**, v. 14 Suppl 3, p. e49-53, Sep 2010. ISSN 1878-3511. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149978> >.
- ROSS, P. S.; BIRNBAUM, L. S. Integrating human and ecological risk assessment: a case of persistent organic pollutants (POPs) in humans and wildlife. **Human Ecology and Risk Assessment**, v. 9, p. 303-324, 2003.
- RUCHEL, R. et al. *Candida* acid proteinases. **Journal of Medical and Veterinary Mycology** v. 30 (suppl 1), p. 123-132, 1992.
- SALGADO, C. G.; BARRETO, J. G. Leonine Facies: Lepromatous Leprosy. **New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1433-1433., 2012.
- SALGADO, C. G. et al. Enzymatic isolation of *Lacazia loboi* cells from skin lesions of lobomycosis. **Med Mycol**, v. 47, n. 2, p. 119-23, Mar 2009. ISSN 1369-3786 (Print)1369-3786. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/13693780802127177>>.
- SAMPAIO, M. M. A note on the cultivation of the aetiological agent of Jorge Lobo's disease in 199 T.C. medium containing phytohaemagglutinin. Preliminary report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 16, n. 2, p. 121-2, Mar 1974. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4845459>>.
- SANGUINETTI, M. et al. Evaluation of VITEK 2 and RapID Yeast Plus Systems for Yeast Species Identification: Experience at a Large Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1343-1346, 2007.
- SCHATTNER, P.; BROOKS, A. N.; LOWE, T. M. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W686-W689, 2005.
- SESSO, A.; AZEVEDO, R. A.; BARUZZI, R. G. Lanthanum nitrate labelling of the outer cell wall surface of phagocytized *Paracoccidioides loboi* in human lobomycosis. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v. 20, n. 4, p. 769-72, Oct 1988. ISSN 1122-9497 (Print)1122-9497. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

SESSO, A.; BARUZZI, R. G. Interaction between macrophage and parasite cells in lobomycosis. The thickened cell wall of *Paracoccidioides lobo* exhibits apertures to the extracellular milieu. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v. 20, n. 3, p. 537-48, Jul 1988. ISSN 1122-9497 (Print)1122-9497. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

SHORE, R. N. et al. African histoplasmosis in the United States. **Jama**, v. 245, n. 7, p. 734, Feb 20 1981. ISSN 0098-7484 (Print)0098-7484. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1. Guanabara Koogan, 2004. 396.

SILVA, D.; BRITO, A. Formas clínicas não usuais de micose de lobo. **An Bras Dermatol**, v. 69, p. 133 – 6, 1994.

SILVA, D. B.; MACEDO, R. C. Doença de Jorge Lobo. In: LEÃO, R. N. Q. (Ed.). **Doenças infecciosas e Parasitárias Enfoque Amazônico: Doença de Jorge Lobo**. Pará: CEJUP, 1997. p.759-765.

SILVA, M. E.; KAPLAN, W.; MIRANDA, J. L. Antigenic relationships between *Paracoccidioides lobo* and other pathogenic fungi determined by immunofluorescence. **Mycopathologia**, v. 36, n. 2, p. 97- 106, 1968.

SILVEIRA, F. T. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: Aspectos clínicos e epidemiológicos. **Gazeta Médica da Bahia.**, v. 79, p. 25 - 29, 2009.

SILVERINE, R. et al. La blastomycose cheloidienne ou meladie de Jorge lobo en Guyane Francaise. **Bull Soc Pathol Exot**. 56: 29-35. p. 1963.

SIMÕSE-LOPES, P. C. et al. FIRST CASE OF LOBOMYCOSIS IN A BOTTLENOSE DOLPHIN FROM SOUTHERN BRAZIL. **Marine Mammal Science**, v. 9, n. 3, p. 329-331, 1993. ISSN 1748-7692. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-7692.1993.tb00462.x/abstract>>.Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-7692.1993.tb00462.x/pdf>>.

STANKE, M. et al. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. **Nucl. Acids Res.**, v. 32, n. Web Server issue W309–W312, 2004.

STENN, K. S. et al. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. **J Invest Dermatol**, v. 93, n. 2, p. 287-90, Aug 1989. ISSN 0022-202X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2546994>>.

SYMMERS, W. S. A possible case of Lobo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 76, n. 5 Pt 2, p. 777-84, Dec 1983a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

_____. A possible case of Lobo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 76, n. 5 Pt 2, p. 777-84, Dec 1983b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6231133>>.

TABORDA, P. R.; TABORDA, V. A.; MCGINNIS, M. R. Lacazia lobo gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 2031-3, Jun 1999. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

TABORDA, V. B.; TABORDA, P. R.; MCGINNIS, M. R. Constitutive melanin in the cell wall of the etiologic agent of Lobo's disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 41, n. 1, p. 9-12, 1999 Jan-Feb 1999. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436664>>.

TAJIMA, Y. et al. A case of stranded Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*) with lobomycosis-like skin lesions in Kinko-wan, Kagoshima, Japan. **J. Vet. Med. Sci**, v. 77, n. 8, p. 989–992, 2015.

TALHARI, C. et al. Disseminated lobomycosis. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 6, p. 582-3, Jun 2008. ISSN 1365-4632. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18477148>>.

TALHARI, S. et al. Micoses profundas na Amazônia - Estudo dos casos diagnosticados em Manaus, estado do Amazonas, no período de 1973 a 1978. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 55, n. 3, p. 133-6, 1980.

TALHARI, S.; TALHARI, C. Lobomycosis. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 4, p. 420-4, Jul-Aug 2012. ISSN 0738-081x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.09.014>>.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1173 - 1182, 2011.

TUBILLA, L. H. M. et al. Lacaziosis mimicking borderline tuberculoid leprosy. **An. Bras. Dermatol.**, v. 83, n. 3, p. 261-263, 06/2008 2008. ISSN 0365-0596. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0365-05962008000300011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

VAN BRESSEM, M. F. et al. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. **Dis Aquat Organ**, v. 86, n. 2, p. 143-57, Sep 23 2009. ISSN 0177-5103 (Print)0177-5103. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3354/dao02101>>.

VAN BRESSEM, M. F.; SANTOS, M. C.; OSHIMA, J. E. Skin diseases in Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Paranagua estuary, Brazil: a possible indicator of a compromised marine environment. **Mar Environ Res**, v. 67, n. 2, p. 63-8, Mar 2009. ISSN 0141-1136 (Print)0141-1136. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.11.002>>.

VAN BRESSEM, M. F. et al. Epidemiology of lobomycosis-like disease in bottlenose dolphins *Tursiops* ssp. from South America and southern Africa. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 117, n. 1, p. 59-75, 2015.

_____. A preliminary overview of skin and skeletal diseases and traumata in small cetaceans from South American waters. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 6, n. 1, p. 7-42, 2007.

VILANI-MORENO, F. R.; OPROMOLLA, D. V. A. Determinação da viabilidade do *Paracoccidioides loboi* em biópsias de pacientes portadores de doença de Jorge Lobo. **An. Bras. Dermatol.** 72: 433-437 p. 1997.

VILELA, R. et al. Molecular study of archival fungal strains isolated from cases of lacaziosis (Jorge Lobo's disease). **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 470-4, Nov 2007. ISSN 0933-7407. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17944708>>.

_____. Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia loboi*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 3657-61, Aug 2005. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.43.8.3657-3661.2005>>.

_____. Molecular phylogeny of animal pathogen *Lacazia loboi* inferred from rDNA and DNA coding sequences. **Mycol Res**, v. 113, n. Pt 8, p. 851-7, Aug 2009. ISSN 0953-7562. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2009.04.007>>.

WAKEFIELD, A. E. et al. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. **Mol Microbiol**, v. 6, n. 14, p. 1903-11., 1992.

WOODARD, J. C. Electron microscopic study of lobomycosis (*Loboa loboi*). **Lab Invest**, v. 27, n. 6, p. 606-12, Dec 1972. ISSN 0023-6837 (Print)0023-6837. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

WOODS, W. J. et al. Ten years experience with Jorge Lobo's disease in the state of Acre, Amazon region, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 52, n. 5, p. 273-8, Sep-Oct 2010. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

_____. Ten years experience with Jorge Lobo's disease in the state of Acre, Amazon region, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 52, n. 5, p. 273-8, 2010 Sep-Oct 2010. ISSN 1678-9946. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049233>>.

XAVIER, M. B. et al. Macrophage and TGF-beta immunohistochemical expression in Jorge Lobo's disease. **Hum Pathol**, v. 39, n. 2, p. 269-74, Feb 2008. ISSN 0046-8177. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959227>>.

Anexo A - Depósito da cepa padrão na coleção de fungos patogênicos do Instituto Nacional de controle de qualidade em saúde (INCQS/FIOCRUZ)



Ministério da Saúde

CFP/INI

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia
Laboratório de Micologia
Coleção de Fungos Patogênicos

LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO/AUTENTICAÇÃO

Nº da Solicitação: 24/2014

DADOS DO SOLICITANTE

Nome	Claudio Guedes Salgado
Cargo	Professor Associado 2
Laboratório/Departamento	Lab. de Dermato-Imunologia
Instituição	UFPA
Documento de Identificação (tipo, número e órgão emissor)	RG: 1562414, SSP/Pa
Endereço completo	Av. João Paulo II, 113, Bairro Dom Aristides. Marituba – Pará
Endereço eletrônico institucional	csalgado@ufpa.br
Telefone e FAX	091 32569097

TESTES REALIZADOS

Nº de origem: LDI 33621
Cultivo Sabouraud: VITEK 2 Exame direto

RESULTADO

Candida tropicalis

Nº DE ACESSO

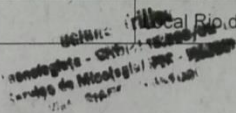
(apenas em caso de solicitação de depósito)

CFP 00519

OBSERVAÇÕES

Depositado como *Lacazia loboi* pela identificação do depositante (seqüenciamento)

Curador	<i>Duriana T. de Lencastre</i>	Local: Rio de Janeiro	Em 03/10/2014
---------	--------------------------------	-----------------------	---------------



Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia (INI) / FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos Rio de Janeiro - RJ Brasil – CEP: 21040-900
Contatos: cfp@fiocruz.br. Tel: +55 (21) 3865-9652 / 9537 Fax: +55 (21) 3865-9657

Anexo B - Relatório do Perfil completo de assimilação dos substratos de carboidrato e atividade enzimática - VITEK 2

VTK-IEC

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:08 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: C tropicalis-1

ID do Doente:

Bionúmero: 6112544245323771
Microorganismo Seleccionado: Candida tropicalis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta: YST	Nº de Lote: 243297410	Data de Validade: 4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído: 22/Ago/2014 03:13 CDT	Estado: Final	Hora da Análise: 18,25 Horas
Microorganismo Seleccionado	98% Probabilidade Candida tropicalis		
	Bionúmero: 6112544245323771	Confiança:	Excelente identificação
Microorganismo FRS			
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:			
Mensagens da Análise:			
Contradizem o(s) Perfí(l)(s) Biológico(s) Típico(s)			
Candida tropicalis TyrA(21),			

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	+	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARaA	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Página 1 de 1

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:05 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 12024-1

ID do Doente:

Bionúmero: 4502544645133771

Microorganismo Seleccionado: Candida parapsilosis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta:	YST	Nº de Lote:	243297410	Data de Validade:	4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído:	22/Ago/2014 03:11 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	99% Probabilidade		Candida parapsilosis		Bionúmero:	4502544645133771
					Confiança:	Excelente identificação
Microrganismo FRS						
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:						
Mensagens da Análise:						
Contradizem o(s) Perfi(l)(s) Biológico(s) Típico(s)						

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	(-)	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	IMAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	+
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARaA	+	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:05 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 18316-1

ID do Doente:

Bionúmero: 6112544245323771
Microorganismo Seleccionado: Candida tropicalis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta:	YST	Nº de Lote:	243297410	Data de Validade:	4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído:	22/Ago/2014 03:11 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	98% Probabilidade		Candida tropicalis		Bionúmero:	6112544245323771
Microrganismo FRS					Confiança:	Excelente identificação
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:						
Mensagens da Análise:						
Contradizem o(s) Perfí(l)(s) Biológico(s) Típico(s)						
Candida tropicalis TyrA(21),						

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	+	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	(-)	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARa	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMérieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:06 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 25152-1

ID do Doente:

Bionúmero: 6512544245323771

Microorganismo Seleccionado: Low Discrimination

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta: YST	Nº de Lote: 243297410	Data de Validade: 4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído: 22/Ago/2014 03:11 CDT	Estado: Final	Hora da Análise: 18,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	Low Discrimination		
	Bionúmero: 6512544245323771	Confiança: Baixa Discriminação	
Microrganismo FRS			
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:			
Low Discrimination Organism			
Candida parapsilosis dMALf(0),			
Candida tropicalis dMALf(100),			
Mensagens da Análise:			
Contradizem o(s) Perfi(l)(s) Biológico(s) Típico(s)			
Candida parapsilosis IMLTa(17),IARAA(88),			
Candida tropicalis TyrA(21),GLYLa(3),			

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	+	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARAA	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:06 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 29362-1

ID do Doente:

Bionúmero: 6102544245323771

Microorganismo Seleccionado: Candida tropicalis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta:	YST	Nº de Lote:	243297410	Data de Validade:	4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído:	22/Ago/2014 03:10 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	99% Probabilidade		Candida tropicalis		Bionúmero:	6102544245323771
					Confiança:	Excelente identificação
Microrganismo FRS						
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:						
Mensagens da Análise:						
Contradizem o(s) Perfi(l)(s) Biológico(s) Típico(s)						

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARa	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:07 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 33621-1

ID do Doente:

Bionúmero: 6112544245323771
Microorganismo Seleccionado: Candida tropicalis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta: YST	Nº de Lote: 243297410	Data de Validade: 4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído: 22/Ago/2014 03:09 CDT	Estado: Final	Hora da Análise: 18,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	98% Probabilidade Candida tropicalis		
	Bionúmero: 6112544245323771	Confiança: Excelente identificação	
Microrganismo FRS			
Microrganismos de Análise e Testes a Separar:			
Mensagens da Análise:			
Contradizem o(s) Perfí(l)(s) Biológico(s) Típico(s)			
Candida tropicalis TyrA(21),			

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	+	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	JARa	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	(+)	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:07 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 33791-1

ID do Doente:

Bionúmero: 6102544245323771
Microorganismo Seleccionado: Candida tropicalis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta:	YST	Nº de Lote:	243297410	Data de Validade:	4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído:	22/Ago/2014 03:10 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	99% Probabilidade		Candida tropicalis		Bionúmero:	6102544245323771
					Confiança:	Excelente identificação
Microrganismo FRS						
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:						
Mensagens da Análise:						
Contradizem o(s) Perfi(l)(s) Biológico(s) Típico(s)						

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARa	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:07 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 37869-1

ID do Doente:

Bionúmero: 6102544245323771

Microorganismo Seleccionado: Candida tropicalis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta:	YST	Nº de Lote:	243297410	Data de Validade:	4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído:	22/Ago/2014 03:11 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	99% Probabilidade		Candida tropicalis			
	Bionúmero:	6102544245323771	Confiança:	Excelente identificação		
Microrganismo FRS						
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:						
Mensagens da Análise:						
Contradizem o(s) Perfi(l)(s) Biológico(s) Típico(s)						

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARaA	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:08 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 41472-1

ID do Doente:

Bionúmero: 4556154035361521

Microorganismo Seleccionado: Unidentified Organism

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta:	YST	Nº de Lote:	243297410	Data de Validade:	4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído:	22/Ago/2014 03:10 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas
Microorganismo Seleccionado	Unidentified Organism					
Microorganismo FRS	Bionúmero: 4556154035361521					
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:						
Mensagens da Análise:						
Contradizem o(s) Perfí(l)s Biológico(s) Típico(s)						

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	+	14	BNAG	-	15	ARBa	+	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	+
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	-	26	dCELa	+	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-
39	IRHAa	+	40	XLTa	+	42	dSORa	-	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARa	-	52	dGATa	+	53	ESC	+
54	IGLTa	+	55	dXYLa	-	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	-	60	GRTas	+
61	IPROa	-	62	2KGa	+	63	NAGa	-	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:08 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 42671-1

ID do Doente:

Bionúmero: 6102544245323771

Microorganismo Seleccionado: Candida tropicalis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta:	YST	Nº de Lote:	243297410	Data de Validade:	4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído:	22/Ago/2014 03:11 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	99% Probabilidade		Candida tropicalis		Bionúmero:	6102544245323771
Microrganismo FRS					Confiança:	Excelente identificação
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:						
Mensagens da Análise:						
Contradizem o(s) Perfi(l)(s) Biológico(s) Típico(s)						

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARaA	-	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Cliente bioMerieux:
Nº do Sistema: VK2C3525

Relatório do Laboratório

Impresso a 22/Ago/2014 11:08 CDT
Impresso por: LabAdmin

Nome do Doente:
Grupo de Isolados: 43962-1

ID do Doente:

Bionúmero: 4512544645133731
Microorganismo Seleccionado: Candida parapsilosis

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta:	YST	Nº de Lote:	243297410	Data de Validade:	4/Fev/2015 12:00 CST
	Concluído:	22/Ago/2014 03:10 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas
Microorganismo Seleccionado	98% Probabilidade		Candida parapsilosis			
	Bionúmero:	4512544645133731	Confiança:	Excelente identificação		
Microorganismo FRS						
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:						
Mensagens da Análise:						
Contradizem o(s) Perfí(l)(s) Biológico(s) Típico(s)						
Candida parapsilosis NAGa(78),						

Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	+	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	+
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARa	+	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTa	+
61	iPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	-	64	dGNTa	+						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 06.01
Norma de Interpretação CMI:
Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
Último Parâmetro AES Modificado:

Anexo C - Bioprojeto NCBI PRJNA282657 *Candida sp.* LDI48194

14/12/2015

Candida sp. LDI48194 (ID 282657) - BioProject - NCBI

BioProject

Display Settings: ▾

***Candida sp.* LDI48194**

Accession: PRJNA282657 ID: 282657

Isolation and in vitro culture of *Lacazia loboi*: morphology, physiology and complete genome sequencing

Lobomycosis is a dermal mycosis, presenting nodular, keloid-like, single or multiple, cutaneous diffuse lesions on the skin of affected patients. Since the report of the first case, in 1931, described by Dr. Jorge Lobo in an Amazonian rubber tapper, this disease was thought to be restricted to humans living at the Amazon Region. However, in 1971, the first case in an Atlantic bottle-nosed dolphin was described, and in 2008 the first two autochthonous African cases were described. During the last decade, it became clear that lobomycosis is an emerging human and dolphin disease, not restricted to the Amazon Region, and possibly related to environmental stressors, which could lead to the death of some dolphins. The inability to cultivate the causative agent of lobomycosis impaired research on the biology of the fungus, creating different nomenclatures over the years, varying from *Glenosporella loboi*, through *Paracoccidioides loboi* (Fonseca Filho & Arêa Leão, 1940), and more recently *Lacazia loboi*; on the classification of the disease, leading to terms as lobomycosis like-disease (LLD); and on the development of new drugs, resulting in the absence of a drug-of-choice for the treatment of lobomycosis. We cultivated this fungus in vitro, and based on its in vitro and in vivo behavior, on cellular biology data and on the complete genome sequence assembly of one of our strains it is possible to conclude that *Lacazia loboi* is related in fact to the another already know genera *Candida* under the phylum Ascomycota, and therefore, based on our complete genome data, the new nomenclature *Candida loboi* is proposed.

See Genome Information for *Candida sp.* LDI48194

LDI48194 is an isolate from a lobomycosis case. The strain was submitted for DNA extraction one week after isolation and purification from human biopsy material, presenting globose and spherical or lemon-shaped, hyaline, yeast-like cells (8 to 11 µm in diameter), with thick walls, which can be strongly stained by the Grocott-methenamine silver stain or calcofluor white fluorescent technique. Fungal cells were isolated, grouped or in chains, the latter were linked at one or more points by thin tubular connections, a characteristic attributed to *L. loboi* in parasitism.. Less...

Accession	PRJNA282657
Data Type	Genome sequencing
Scope	Monoisolate
Organism	<i>Candida sp.</i> LDI48194 [Taxonomy ID: 1759314] Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Debaryomycetaceae; <i>Candida/Lodderomyces</i> clade; <i>Candida</i> ; <i>Candida sp.</i> LDI48194
Submission	Registration date: 8-May-2015 Universidade Federal do Para
Relevance	Medical

Project Data:

Resource Name	Number of Links
SEQUENCE DATA	
Nucleotide (WGS master)	1

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA282657>

1/2

14/12/2015

Candida sp. LD148194 (ID 282657) - BioProject - NCBI

OTHER DATASETS	
BioSample	1
Assembly	1

▼ Assembly details:

Assembly	Level	WGS	BioSample	Taxonomy
GCA_001005365.1	Contig	LBNG00000000	SAMN03573713	Candida sp. LD148194 (ascomycetes)