

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

DARLY GOMES SOARES DELFINO

**ESTUDO DA DIVISÃO NUCLEAR EM *RHINOSPORIDIUM SEEBERI* UTILIZANDO
MARCADORES ESPECÍFICOS DE FLUORESCENCIA AVALIADOS POR
MICROSCOPIA CONFOCAL**

Belo Horizonte – MG

2015

DARLY GOMES SOARES DELFINO

**ESTUDO DA DIVISÃO NUCLEAR EM *RHINOSPORIDIUM SEEBERI* UTILIZANDO
MARCADORES ESPECÍFICOS DE FLUORESCÊNCIA AVALIADOS POR
MICROSCOPIA CONFOCAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Virgínia
Rocha Vilela - UFMG

Belo Horizonte - MG

2015

D349e Delfino, Darly Gomes Soares.
Estudo da divisão nuclear em *Rhinosporidium Seeberi* utilizando marcadores específicos de fluorescência Avaliados por microscopia confocal / Darly Gomes Soares Delfino. – 2015.

138 f. il.

Orientadora: Raquel Virgínia Rocha Vilela.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Fungos patogênicos – Teses. 2. Rinosporidiose – Teses. 3. Citocinese – Teses. 4. Microscopia confocal – Teses. I. Vilela, Raquel Virgínia Rocha. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:616.969



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo da divisão nuclear em *Rhinosporidium seeberi* utilizando marcadores específicos de fluorescência avaliados por microscopia confocal

DARLY GOMES SOARES DELFINO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 14 de agosto de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Profª. Raquel Virginia Rocha Vilela (Orientadora)

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Daniel de Assis Santos

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Alberto Leonel Mendoza

Michigan State University (EUA)

Belo Horizonte, 14 de agosto de 2015.

Dedico este trabalho a Deus, à minha família, em especial aos meus pais, Lucy e Kleber, e ao meu marido, Samuel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos dias de chuva e pelos dias de sol; Ele não criaria nada inutilmente.

À minha querida orientadora e amiga, Prof^a. Dr^a. Raquel Virgínia Rocha Vilela, pela confiança, apoio, dedicação, compreensão e pelos ensinamentos. Obrigada por me impulsionar a voar mais alto e me ajudar a concretizar planos que aos meus olhos eram quase impossíveis.

Ao Prof. Dr. Leonel Mendoza, pela imensurável paciência, compreensão e por ser um exemplo de pesquisador ávido por conhecimento, em busca do bem comum. Obrigada por me acolher em terras distantes.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Análises e Toxicológicas, Prof. Dr. Vicente Toledo, e à funcionária da Secretaria de Pós-Graduação, Ângela, pela prontidão em me auxiliar ao longo de todo esse processo.

Aos meus pais, Lucy e Kleber, pelo apoio, confiança e pelos ensinamentos. Obrigada por sempre se esforçarem para me proporcionar as melhores oportunidades.

Ao meu marido, Samuel, pelo amor, companheirismo e grande incentivo. Você tornou essa caminhada mais leve.

Aos familiares e amigos, pelo apoio, carinho e torcida.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biomedical Laboratory Diagnostic da Michigan State University (EUA), por me receberem com tanta atenção.

À Ana Paula Pôssa, pela amizade inesperada que surgiu logo no fim dessa caminhada. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos.

Às queridas amigas de mestrado, Marcela e Bianca, pelo companheirismo e prontidão em me ajudar sempre que preciso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo investimento financeiro.

*Pensei em um pássaro,
ele voava um pouco inseguro,
pousava em um galho, às vezes
em uma pedra e olhava para trás.*

*Que metáfora mais linda
para um educador, a visão
de um pássaro, ensaiando seu vôo.
Ousei acompanhá-la nesta viagem...
Nada mais prazeroso para alguém que
pensa que ensina...*

De repente observar um vôo solo.

*Parei para ver este espetáculo.
Agradei a Deus a oportunidade e
humildemente aceitei minha limitação.*

*Aventurei em minha fantasia para
pensar que ensinei alguma coisa a você...*

Parabéns pelo lindo vôo!

Raquel Vilela

RESUMO

Rhinosporidium seeberi é um Ichthyosporea incultivável, que causa a rinosporidiose em animais, incluindo humanos. Por ser resistente ao cultivo, seu ciclo de vida pode ser estudado somente em tecidos frescos ou fixados em formalina. Por esta razão, sua posição taxonômica tem sido discutida por mais de 100 anos. Estudos moleculares filogenéticos recentes demonstraram que o *R. seeberi* está localizado em um novo grupo de patógenos de peixes, anfíbios e outros animais, denominado Mesomycetozoa. Muito pouco se sabe acerca do ciclo de vida do *R. seeberi* e muito menos sobre o seu ciclo nuclear nos hospedeiros com rinosporidiose. Estudos recentes mostraram que esse patógeno apresenta divisão nuclear sincronizada sem citocinese. Portanto, para estudar o ciclo nuclear do *R. seeberi* e validar estudos anteriores, utilizamos microscopia confocal e investigar o seu comportamento nuclear em tecidos fixados em formalina marcados por DAPI e faloidina. Observamos que os esporângios juvenis do *R. seeberi* apresentam núcleo marcado por DAPI (5-7 μm) e, à medida que o ciclo celular progride, os núcleos se dividem sincrônica e sem citocinese. Os esporângios intermediários apresentaram numerosos núcleos marcados por DAPI em diferentes estágios mitóticos, com diâmetro entre 3-4 μm , e uma fina camada interna da parede celular que retém fortemente o conjugado de faloidina. Os esporângios maduros apresentaram múltiplos endosporos com diâmetro entre 5-12 μm , cada um contendo núcleo com diâmetro entre 2-4 μm . O conjugado de faloidina não se ligou à camada interna da parede dos esporângios maduros nem dos endosporos. O desenvolvimento de uma “zona germinativa” na camada interna do esporângio maduro contendo centenas de núcleos marcados por DAPI também foi confirmada. O presente estudo estabelece que durante o ciclo de vida do *R. seeberi* ocorrem divisões nucleares sincronizadas resultando na formação de múltiplos núcleos. A citocinese é um evento único e ocorre após a formação de milhares de núcleos, logo antes da formação do esporângio maduro.

Palavras-chave: Ichthyosporea, Mesomycetozoa, *Rhinosporidium seeberi*, rinosporidiose.

ABSTRACT

Rhinosporidium seeberi is an uncultivated Ichthyosporean causing rhinosporidiosis in animals, including humans. For being resistant to culture, its life cycle can be studied only in fresh or formalin fixed tissues. For this reason, its taxonomic position has been discussed for more than 100 years. Recent phylogenetic molecular studies showed that the *R. seeberi* is located in a new group of fish, amphibians and other animals pathogens, called Mesomycetozoa. Very little is known about *R. seeberi* life cycle and much less about its nuclear cycle in the host with rhinosporidiosis. Recent studies have shown that this pathogen has synchronized nuclear division without cytokinesis. Therefore, to study *R. seeberi* nuclear cycle and validate previous studies, we used confocal microscopy to investigate *R. seeberi* nuclear behavior in formalin fixed tissues stained with DAPI and phalloidin. We report that *R. seeberi* juvenile sporangia showed DAPI stained nuclei (5 to 7 μm) and, as the cell cycle progresses, the nuclei synchronously divided without cytokinesis. Intermediary sporangia displayed numerous 3 to 4 μm DAPI stained nuclei at different mitotic stages and a thick inner layer that strongly retain the conjugates of phalloidin. Mature sporangia displayed multiple 5 to 12 μm cell walled endospores each holding 2 to 4 μm in diameter nucleus. The conjugate of phalloidin did not bind to the inner layers of mature sporangia or endospores. The development of a “germinative zone” in the inner layer of mature sporangia containing hundreds of DAPI stained nuclei was also confirmed. This study established that during *R. seeberi* life cycle synchronous nuclear divisions take place resulting in the formation of multiple nuclei. Cytokinesis is one time event and occurs after the formation of thousands of nuclei just before mature sporangia formation.

Keywords: Ichthyosporea, Mesomycetozoa, *Rhinosporidium seeberi*, rhinosporidiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do gênero <i>Microcystis</i> .	26
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Rhinosporidium seeberi</i> .	37
Figura 3 – Endosporos.	39
Figura 4 – Esporângio juvenil.	40
Figura 5 – Esporângios intermediários e corpos laminados.	42
Figura 6 – Esporângios maduros.	43
Figura 7 – Primeira divisão nuclear do <i>R. seeberi</i> .	45
Figura 8 – Arranjos nucleares apresentados pelo <i>R. seeberi</i> ao longo do seu ciclo nuclear.	46
Figura 9 – Fase final da maturação do EI e formação do EM.	48
Figura 10 – Manifestações clínicas da rinosporidiose.	49
Figura 11 – Rinosporidiose ocular.	50
Figura 12 – Manifestações clínicas menos frequentes.	51
Figura 13 – Manifestações clínicas em animais.	53
Figura 14 – Pólipo nasal pediculado após excisão cirúrgica; lesão lobulada, vascularizada e com aspecto de “morango”.	54
Figura 15 – Cortes histológicos corados com H&E.	56
Figura 16 – Cortes histológicos de pólipos apresentando tecido fibromixomatoso e infiltrado inflamatório constituído de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e histiócios.	57
Figura 17 – Esporângios em diferentes fases de desenvolvimento visualizados por exame direto.	58
Figura 18 – Colorações histológicas utilizadas no diagnóstico anatomopatológico da rinosporidiose.	59
Figura 19 – Diagnóstico citológico da rinosporidiose.	61
Figura 20 – Diagnósticos diferenciais da rinosporidiose.	67
Figura 21 – Mecanismo da fluorescência.	71
Figura 22 – Microscópio de epifluorescência convencional.	72
Figura 23 – Grão de pólen marcado com laranja de acridina.	73
Figura 24 – Microscópio confocal projetado por Minsky.	75
Figura 25 – <i>Beam-scanning</i> .	77
Figura 26 – Construção de uma imagem tridimensional.	77

Figura 27 – Configuração básica de um microscópio confocal	78
Figura 28 – Escaneamento por disco giratório acoplado a sistema de microlentes.	79
Figura 29 – Microscópio confocal da Michigan State University.	89
Figura 30 – Controle negativo.	93
Figura 31 – Autofluorescência dos endosporos corados por H&E.	95
Figura 32 – Intensidade da marcação por DAPI em amostras de diferentes hospedeiros.	97
Figura 33 – Endosporos liberados.	98
Figura 34 – EJ marcados por DAPI e faloidina.	100
Figura 35 – EI em estágio inicial da divisão nuclear.	102
Figura 36 – EI em estágio intermediário da divisão nuclear.	103
Figura 37 – EI em estágio final da divisão nuclear.	105
Figura 38 – Controle negativo não apresenta autofluorescência na camada interna abaixo da parede celular do EI.	106
Figura 39 – Esporângio maduro.	107
Figura 40 – Núcleos dos endosporos visualizados em diferentes planos.	109
Figura 41 – Endosporos maduros dentro do EM e zona germinativa.	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac.	Anticorpo(s)
AFIP	<i>Armed Forces Institute of Pathology</i>
Ag.	Antígeno(s)
ASD	Ágar Sabouraud dextrose
BG-11	<i>Blue green algae medium</i> – Meio de cultivo para cianobactérias
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	<i>Base pair</i> – pares de bases
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CCD	<i>Charge-coupled device</i> – Dispositivo de carga acoplada
CD	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupo de diferenciação
CD 3	Moléculas expressas em linfócitos T
CD 4	Moléculas expressas em linfócitos T auxiliares
CD 8	Moléculas expressas em linfócitos T citotóxicos
CD 20	Moléculas expressas em linfócitos B
CD 56	Molécula de adesão presente em células <i>Natural killer</i>
CD 57	Moléculas expressas em linfócitos T e células NK
CD 68	Moléculas expressas em macrófagos
CED	Corpos elétron-densos
COEP	Comitê de ética em pesquisa
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DRIP	<i>Dermocystidium, Sphaerothecum destruens, Ichtyophonus e Psorospermium</i>
EI	Esporângio intermediário
EJ	Esporângio juvenil
EM	Esporângio maduro
EUA	Estados Unidos da América

Fig.	Figura
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> – Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
H&E	Hematoxilina e eosina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IML	Inibição da migração de leucócitos
Inc.	<i>Incorporation</i>
ITS	<i>Internal Transcriber Spacer</i>
Jr.	Júnior
KOH	Hidróxido de potássio
KTP	<i>Potassium-titanyl-phosphate laser</i> – Laser fosfato de potássio titanilo
MCEL	Microscópio confocal de escaneamento a laser
mL	Microlitro
µm	Micrômetro
µsec	Microsegundos
MO	Missouri
MTE	Microscopia de transmissão eletrônica
NA	<i>Numerical aperture</i> – Abertura numérica
nm	Nanômetro
NK	<i>Natural killer</i>
n°.	Número
PA	<i>Pennsylvania</i>
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i> – Ácido periódico de Schiff
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase

PMT	<i>Photomultiplier tube</i> – Tubo fotomultiplicador
rDNA	DNA mensageiro
rRNA	RNA ribossomal
s.	Segundos
St.	<i>Saint</i>
TC-199	<i>Tissue culture medium 199</i> – Meio de cultivo tecidual 199
TIFF	<i>Tagged image file format</i>
TRITC	Tetrametilrodamina
UA	Unidade Airy
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
ZG	Zona germinativa
λ	Comprimento de onda
°C	Grau centígrado
\geq	Maior igual a
%	Porcentagem
®	<i>Registered trademark</i> – Marca registrada
™	<i>Trademark</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Histórico da rinosporidiose.....	21
2.2 Histórico cronológico do <i>R. seeberi</i>	21
2.3 Principais hipóteses taxonômicas.....	24
<u>2.3.1 <i>R. seeberi</i> é uma cianobactéria do gênero <i>Microcystis</i>?</u>	24
<u>2.3.2 <i>R. seeberi</i> é um fungo?</u>	27
<u>2.3.3 <i>R. seeberi</i> é um eucarioto pertencente à classe <i>Mesomycetozoea</i>?</u>	29
2.4 Distribuição ecológica e epidemiologia.....	30
<u>2.4.1 Epidemiologia da doença no Brasil</u>	33
<u>2.4.2 Epidemiologia da doença na América Latina</u>	35
<u>2.4.3 Epidemiologia da doença no mundo</u>	35
2.5 Ciclo de vida do <i>R. seeberi</i>	36
<u>2.5.1 Endosporos</u>	37
<u>2.5.2 Esporângio juvenil</u>	40
<u>2.5.3 Esporângio intermediário</u>	41
<u>2.5.4 Esporângio maduro</u>	42
<u>2.5.5 Ciclo nuclear</u>	43
2.6 Manifestações clínicas da rinosporidiose.....	48
<u>2.6.1 Manifestações clínicas em humanos</u>	48
<u>2.6.2 Manifestações clínicas em animais</u>	52
2.7 Patologia.....	53
<u>2.7.1 Aspectos macroscópicos das lesões</u>	53
<u>2.7.2 Aspectos microscópicos das lesões</u>	55
2.8 Diagnóstico laboratorial.....	57

<u>2.8.1 Exame direto</u>	57
<u>2.8.2 Exame anatomopatológico</u>	58
<u>2.8.3 Exame citológico</u>	60
<u>2.8.4 Cultura e inoculação em animais</u>	61
<u>2.8.5 Exame sorológico</u>	63
<u>2.8.6 Biologia molecular</u>	64
<u>2.8.7 Diagnósticos diferenciais</u>	65
2.9 Tratamento	68
2.10 Microscopia confocal	69
<u>2.10.1 Microscópio de fluorescência</u>	70
<u>2.10.2 O primeiro microscópio confocal</u>	74
<u>2.10.3 Microscópio confocal de escaneamento a laser</u>	75
3 OBJETIVOS	80
3.1 Geral	81
3.2 Específicos	81
4 MATERIAIS E MÉTODOS	82
4.1 Amostras	83
<u>4.1.1 Origem das amostras utilizadas no estudo</u>	83
<u>4.1.2 Considerações éticas</u>	83
4.2 Preparo dos blocos para confeccionar as lâminas	83
4.3 Critérios para a definição das marcações e fluorocromos utilizados	84
<u>4.3.1 NucBlue® Fixed Cell Ready Probes® Reagent</u>	84
<u>4.3.2 ActinRed™ 555 Ready Probes® Reagent</u>	85
4.4 Critérios para selecionar as lâminas a serem marcadas	85
4.5 Preparo das lâminas anterior à marcação	85
<u>4.5.1 Protocolo de desparafinização e reidratação dos tecidos</u>	86
4.6 Protocolos das marcações com fluorocromos	86

<u>4.6.1 Protocolo para a detecção do DNA (DAPI)</u>	87
<u>4.6.2 Protocolo para a detecção dos filamentos de actina</u>	87
4.7 Controle positivo	88
4.8 Controle negativo	88
4.9 Microscópio confocal	88
<u>4.9.1 Critérios para a aquisição das fotos</u>	90
5 RESULTADOS	91
5.1 Calibração da intensidade do laser diodo e do laser de estado sólido utilizando o controle negativo	92
5.2 Avaliação da autofluorescência nas amostras coradas com H&E	94
5.3 Detecção do DNA pelo DAPI em amostras de diferentes hospedeiros	96
5.4 Marcação dos endosporos livres (DAPI / faloidina)	98
5.5 Marcação do esporângio juvenil (DAPI / faloidina)	99
5.6 Marcação do esporângio intermediário (DAPI / faloidina)	101
5.7 Marcação do esporângio maduro (DAPI / faloidina)	106
6 DISCUSSÃO	112
7 CONCLUSÃO	119
8 PERSPECTIVAS	121
8.1 Tratamento	122
8.2 Diagnóstico molecular	122
8.3 Caracterização filogenética	122
REFERÊNCIAS	123

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

Há mais de um século o *Rhinosporidium seeberi* tem sido o centro de uma disputa taxonômica que ainda continua um desafio (ASHWORTH, 1923; ARSECULERATNE, 2002; AZEVEDO, 1958; KARUNARATNE, 1964; THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989; VILELA E MENDOZA 2012). O motivo principal para tal indefinição encontra-se na incapacidade de reproduzir o microrganismo em meios de cultivo em laboratório clínico (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Por esta razão, seu nicho ecológico, assim como o seu ciclo de vida fora do hospedeiro, tem permanecido em completo mistério para aqueles que de uma forma ou outra esforçam-se para estudar este patógeno incomum de humanos e animais. Este fato contribuiu para a frustração de alguns pesquisadores na elaboração de propostas exóticas acerca da exata localização taxonômica do *R. seeberi*. Recentemente, Vilela e Mendoza (2012) revisaram os trabalhos que discursavam hipóteses variadas sobre a possível classificação do microrganismo. Nos anos subsequentes à descrição deste patógeno pelo argentino Rodolfo Seeber (1900), numerosas teorias surgiram para explicar o ciclo de vida do *R. seeberi*, sendo que, dentre elas, destacam-se os estudos realizados por Ashworth (1923), Azevedo (1958), Karunaratne (1964) e, mais recentemente, Mendoza e Vilela (2013), indicando que *R. seeberi* é um eucariota com ciclo nuclear definido.

O principal problema destes estudos é que foram realizados a partir de amostras histológicas fixadas em formalina e, os investigadores que são favoráveis às outras teorias que indicam que as estruturas identificadas pelos pesquisadores acima mencionados são, na realidade, estruturas vesiculares do *R. seeberi*. Por exemplo, o estudo desenvolvido por Mendoza e Vilela (2013) mostra que os núcleos de *R. seeberi* se duplicam sincrônicamente sem citocinese. Estes investigadores encontraram a presença de figuras mitóticas classicamente presentes em organismos eucariotas. O problema principal deste estudo é que as estruturas descritas, como por exemplo, núcleo, filamentos de actina e tubulina, podem ser sugeridas como "similares" a formas encontradas em outros eucariotas.

Na busca do esclarecimento da hipótese nuclear mediante as observações histológicas, o presente estudo propõe a utilização de marcadores moleculares fluorescentes específicas para estruturas exibidas na interfase e na fase mitótica, como o DNA nuclear em prófase, metáfase, anáfase, telófase e filamentos de actina.

Para esta visualização propõe-se a utilização da microscopia confocal. Esta metodologia é ideal e altamente específica para demonstrar não somente que *R. seeberi* é um microrganismo eucariota, como também para validar os trabalhos publicados por Ashworth (1923), Azevedo (1958), Karunaratne (1964) e Mendoza e Vilela (2013). O estudo do ciclo de vida, bem como a compreensão do seu ciclo nuclear será fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O presente estudo tem como principal objetivo validar as observações de Vilela e Mendoza (2013), utilizando marcadores específicos e microscopia confocal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico da rinosporidiose

A rinosporidiose é uma doença subcutânea crônica que acomete humanos e animais, caracterizada pelo desenvolvimento de pólipos granulomatosos localizados principalmente na mucosa nasal e em outros sítios do trato respiratório. O agente etiológico é o *Rhinosporidium seeberi*, eucarioto recentemente classificado como membro da classe Mesomycetozoa que inclui parasitas de animais aquáticos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; DAS *et al.*, 2011; THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989; VILELA E MENDOZA, 2012).

O primeiro relato da doença foi publicado na Argentina no ano de 1900 por Guillermo Seeber. O autor observou esta enfermidade pela primeira vez em um jovem trabalhador rural, de 19 anos de idade, que se queixava de dificuldade respiratória. Ao exame físico, o paciente apresentava uma obstrução nasal por uma massa polipoide. Microscopicamente, Seeber descreveu um microrganismo semelhante àqueles da classe Coccidia, mas não sugeriu um nome específico. Em sua tese, Seeber comenta que em 1892 em Buenos Aires, Malbram observou um caso similar da doença em humanos, mas não publicou seu achado (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KARUNARATNE, 1936; THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989; VILELA E MENDOZA, 2012).

Após a publicação da tese de Seeber, vários pesquisadores analisaram tecidos de pacientes por microscopia convencional e eletrônica e publicaram estudos relacionados aos aspectos morfológicos do ciclo de vida do *R. seeberi*. Dentre esses trabalhos pode-se destacar Ashworth (1923), Melo (1946), Azevedo (1958), Karunaratne (1964), Grover (1969), Bader e Grueber (1970), Kannan-Kutty e Gomez (1971) e Moses *et al.* (1991).

2.2 Histórico cronológico do *R. seeberi*

A classificação taxonômica do *R. seeberi* sempre foi alvo de inúmeras discussões. Após estudar o ciclo de vida do microrganismo, Seeber acreditava que este era um esporozoário relacionado à subdivisão Polysporea da classe Coccidia devido à formação de esporângios repletos de endoconídios (ARSECULERATNE E

MENDOZA, 2005; SEEBER, 1900). O nome *Coccidium seeberia* foi dado aparentemente pelo professor de Seeber, Dr. R. Wernicke, que pensou que o microrganismo também poderia ser um fungo similar ao *Coccidium immitis* (*Coccidioides immitis*), agente etiológico da doença de Posadas (AZEVEDO, 1958; KARUNARATNE, 1936 E 1964). Um fato que sustenta essa ideia é a publicação do Tratado de Parasitologia Animal por Pedro Belou em 1903, no qual cita o *R. seeberi* sob o nome *Coccidium seeberia*, Wernicke 1900 (ASHWORTH, 1923).

Também em 1903, O’Kinealy descreveu um pólipso nasal retirado de um paciente indiano de 22 anos de idade e, posteriormente, o mesmo tumor foi estudado por Vaughan, o qual descreveu a histologia da lesão e a presença de corpos “parecidos com cistos” preenchidos com inúmeros esporos pequenos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; ASHWORTH, 1923; KARUNARATNE, 1936). Duas secções do material apresentado por O’Kinealy foram enviadas para Minchin e Fantham (1905), que utilizaram diferentes colorações histológicas para estudar o tecido. Concluíram que o microrganismo possuía semelhança com a ordem Neosporidia e o filo Haplosporidia e nomearam-no como *Rhinosporidium kinealyi* atribuindo a descoberta do parasito a O’Kinealy, uma vez que não tinham conhecimento sobre o trabalho publicado por Seeber. Em seguida, Beattie (1906) publica um trabalho no qual reafirma as conclusões de Minchin e Fantham e sugere também alguma semelhança do *Rhinosporidium* com o a ordem Sarcosporidia.

Alguns anos depois, Laveran e Pettit (1910) notaram a semelhança do *R. seeberi* com o *Ichthyosporidium*, gênero renomeado para *Ichthyophonus* (patógeno de trutas), que atualmente pertence à classe Mesomycetozoea à qual o *Rhinosporidium* também faz parte. Em 1912, Seeber publica em francês um resumo de sua tese com figuras adicionais, adota o gênero *Rhinosporidium* criado por Minchin e Fantham, mas reivindica a prioridade sobre o nome da espécie e endossa o nome *Rhinosporidium seeberi*. Em seguida, Zschokke (1913) relata um microrganismo presente em um pólipso nasal de um cavalo na África do Sul, o qual nomeou como *Rhinosporidium equi* e afirma ser semelhante ao *Rhinosporidium* descrito em humanos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; ASHWORTH, 1923; VILELA E MENDOZA, 2012).

Em 1923, Ashworth em um trabalho minucioso corrige o nome *Coccidium seeberia* (Wernicke 1900) para "*Rhinosporidium seeberi* (Wernicke 1903), emend. Ashworth" e considera que *R. kinealyi* e *Coccidium seeberia* são a mesma espécie, bem como todas as amostras de *Rhinosporidium* descritas em humanos parecem pertencer à mesma espécie. Ashworth considerou o microrganismo como possivelmente um fungo zigomiceto ou chytridiomycetes (VILELA E MENDOZA, 2012). Mais tarde, todas as espécies *R. equi*, (Zschokke, 1913), *R. ayyari* (ALLEN E DAVE, 1936), *R. hylarum* (AZEVEDO, 1958; CARINI, 1940) e *R. amazonicum* (ABEN-ATHAR, 1944; AZEVEDO, 1958) tornaram-se sinônimo de *R. seeberi*.

Posteriormente, Carini (1940) e Azevedo (1958) observam que o *R. seeberi* possui semelhanças morfológicas com o *Dermosporidium hylarum* (*Amphibiocystidium ranae*), espécie que pertence à ordem Dermocystida incluída dentro da classe Mesomycetozoea. Anos mais tarde, Vanbreuseghem (1973) sugere em seu trabalho que o *R. seeberi* poderia ser uma alga apesar da ausência de cloroplastos.

Na década de 90, Ahluwalia publica trabalhos com hipóteses bizarras afirmando que os esporângios encontrados na rinosporidiose eram resultado de uma mistura de materiais de plantas e humano ou que essas estruturas esféricas seriam produto de excreção celular de polissacarídeos provenientes da tapioca, os quais seriam indigeríveis pelo organismo humano (AHLUWALIA, 1992, AHLUWALIA *et al.*, 1994; VILELA E MENDOZA, 2012). Tais hipóteses se mostraram equivocadas e foram substituídas, pelo mesmo autor, pela teoria de que o *R. seeberi* seria na verdade uma cianobactéria do gênero *Microcystis* (AHLUWALIA, MAHESHWARI E DEKA, 1997).

A elucidação da classificação taxonômica do *R. seeberi* ocorreu com a utilização de ferramentas moleculares. Em 1999, Herr *et al.* realizaram um estudo utilizando duas amostras humanas de pacientes com rinosporidiose provenientes do Sri Lanka, no qual avaliaram a morfologia do microrganismo por microscopia de transmissão eletrônica (MTE). Também amplificaram por reação em cadeia da polimerase (PCR) a sequência de DNA ribossomal (rDNA) da menor subunidade 18S e concluíram que o parasito é um eucarioto. Os autores criaram a classe Mesomycetozoa, que significa "entre fungos e animais", para alocar o *R. seeberi* junto a outros patógenos

com morfologia semelhante que antes eram conhecidos como grupo DRIP (Dermocystidium, *Sphaerothecum destruens* – o agente da roseta, *Ichthyophonus* e *Psorospermium*). Em seguida, outro grupo de pesquisadores independente do citado anteriormente, amplificou a mesma sequência 18S a partir de uma amostra de rinosporidiose em um cão e obteve uma árvore filogenética idêntica aquelas publicadas por Herr et al. (1999), confirmando o trabalho anterior (FREDRICKS *et al.*, 2000).

Mesmo após a publicação desses trabalhos que demonstram claramente que o *R. seeberi* é um microrganismo eucarioto pertencente à classe Meosomycetozoea, alguns pesquisadores ainda insistem em introduzir hipóteses distintas para a classificação taxonômica. É o caso de Thankamani (2005) e Thankamani e Lipin Dev (2011, 2012), que recentemente afirmaram ter isolado um fungo em diferentes amostras de rinosporidiose e que este seria o verdadeiro agente etiológico da doença.

2.3 Principais hipóteses taxonômicas

Atualmente, existem três hipóteses defendidas por diferentes grupos de pesquisa para a classificação taxonômica do *R. seeberi*, a saber:

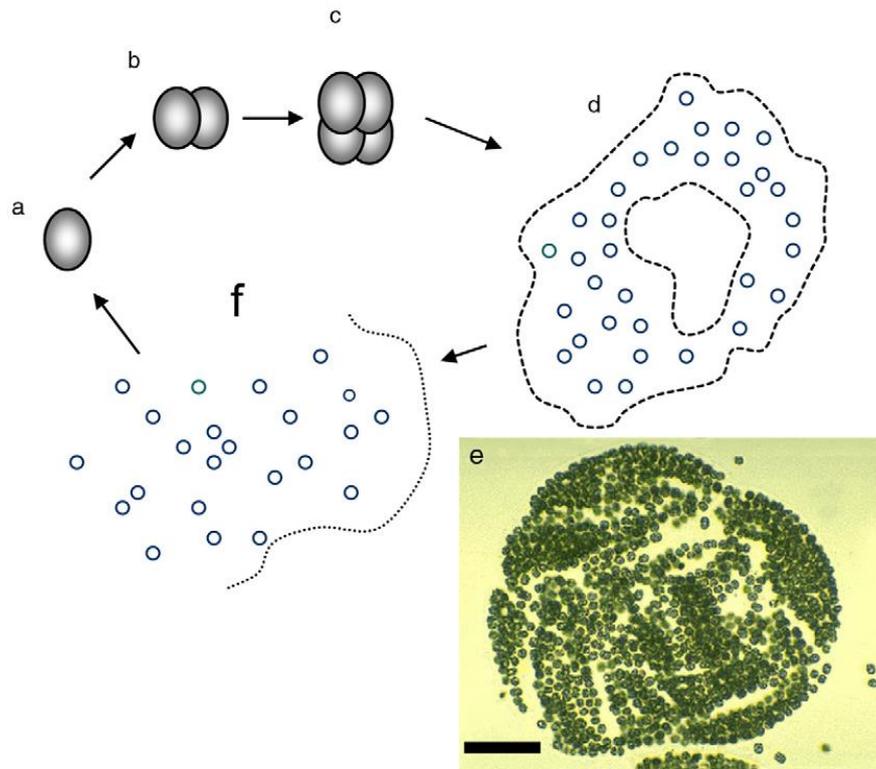
1. O *R. seeberi* é uma cianobactéria (AHLUWALIA, 1999; AHLUWALIA, MAHESHWARI E DEKA, 1997; AHLUWALIA, DHAULAKHANDI E GARG, 2010; DHAULAKHANDI *et al.*, 2004, 2006);
2. O *R. seeberi* é um fungo (THANKAMANI, 2005; THANKAMANI E LIPIN DEV, 2011, 2012);
3. O *R. seeberi* é um eucarioto pertencente à classe Mesomycetozoa (FREDRICKS *et al.*, 2000; HERR *et al.*, 1999b).

2.3.1 *R. seeberi* é uma cianobactéria do gênero *Microcystis*?

Em 1997, Ahluwalia *et al.* publicam o primeiro trabalho afirmando que o *R. seeberi* não é um protista, mas sim uma cianobactéria procariota do gênero *Microcystis*. Devido à existência de vários relatos de casos de pacientes com rinosporidiose que tem o hábito de se banhar em rios e lagos, existe a hipótese de que o *R. seeberi*

possua um nicho aquático (THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989). Baseando-se nessa relação, os autores conduziram um estudo ecológico com o objetivo de isolar o agente etiológico da rinosporidiose em amostras provenientes de regiões aquáticas endêmicas na Índia. Ao observarem por microscopia as amostras de água, os autores identificaram colônias grandes arredondadas compostas por células esféricas menores e identificaram o microrganismo semelhante à *Microcystis aeruginosa*, uma cianobactéria formada por pequenas esferas (nanocytes) que podem se agrupar em colônias. Também foram analisadas amostras de pólipos de pacientes com rinosporidiose e estruturas “semelhantes” às observadas nas amostras de água foram encontradas. Segundo os autores, os nanocytes corresponderiam aos chamados endosporos e seriam a unidade infectante, e as colônias de nanocytes corresponderiam aos esporângios preenchidos por endosporos visualizados nos tecidos dos pacientes (**Figura 1**).

Figura 1 – Ciclo de vida do gênero *Microcystis*.



(a-c) Nanocytes se dividem por fissão binária; (d-e) agregação dos nanocytes por uma matriz mucilaginosa formando colônias grandes e amorfas; (f) desintegração das colônias antigas para a colonização de outro ambiente.

Fonte: Vilela e Mendoza (2012).

Mas tarde, Ahluwalia (1999) afirmou ter desenvolvido um método para o cultivo do agente causador da rinosporidiose. Nesse trabalho, a autora isolou uma cianobactéria do gênero *Microcystis* em amostras de pacientes com rinosporidiose e amostras de água coletada em regiões endêmicas utilizando o meio de cultura BG-11 em placas de Petri, no qual visualizou estruturas esféricas contendo os nanocytes e lâminas para cultivo com diferentes concentrações de glicerol, nas quais observou estruturas filamentosas identificadas como “não-fúngicas”. A partir desses achados, a autora concluiu que a cianobactéria do gênero *Microcystis* é o verdadeiro agente etiológico da rinosporidiose.

Após a publicação desses trabalhos, Ahluwalia (2001) escreveu uma carta ao editor criticando o trabalho publicado por Herr *et al.* (1999b) que comprova por métodos moleculares que o *R. seeberi* é um eucarioto pertencente à classe Mesomycetozoa.

Segundo ela, os pesquisadores utilizaram esporângios e endosporos contaminados com tecido humano e, portanto, a sequência de DNA amplificada, bem como as mitocôndrias visualizadas por MTE seriam de origem humana e não do *R. seeberi*. Além disso, a pesquisadora afirma que as estruturas identificadas como núcleos na verdade seriam “nanocytes do *Microcystis* englobando o DNA procariótico”.

Posteriormente, Dhaulakhandi *et al.* (2006) amplificaram por PCR a sequência 16S do RNA ribossomal (rRNA) de células purificadas e isoladas do *R. seeberi* provenientes de amostras clínicas e ambientais. Essa sequência de rRNA de 1458 bp contém a assinatura AATTTTCCG típica de cianobactéria, bem como duas repetições simples e duas palindrômicas presentes em espécies de *Microcystis* e em outras cianobactérias. Como o patógeno possui um fenótipo similar ao *Microcystis* e genótipo semelhante ao *Microcystis* e outras cianobactérias, os autores concluíram que o microrganismo causador da rinosporidiose é uma cianobactéria. Mais recentemente, Ahluwalia, Dhaulakhandi e Garg (2010) conduziu outro estudo filogenético e descobriu que a sequência 16S rRNA amplificada das amostras do *R. seeberi* possui 98% de identidade com plantas de floração e apenas 79-86% de identidade com o *Microcystis*, bem como outras cianobactérias. Apesar dos resultados, a conclusão do trabalho é que o microrganismo possui mais características em comum com as cianobactérias do que com os patógenos da classe Mesomycetozoa.

2.3.2 R. seeberi é um fungo?

Em 2005, Thankamani publicou um trabalho afirmando que obteve sucesso cultivando o agente etiológico da rinosporidiose, um fungo com estágios de desenvolvimento semelhantes ao *Synchytrium endobioticum*, membro da ordem Chytridiales que causa a verrugose da batata. A autora disse ter conseguido isolar o mesmo microrganismo a partir de swabs coletados de pacientes indianos com rinosporidiose. O fungo apresentou crescimento lento em ágar nutriente, ágar sangue e ágar Sabouraud dextrose (ASD) em temperatura ambiente (28-30°C), mas não cresceu em 37°C. A colônia obtida foi descrita como muito pequena, circular, convexa, superfície lisa, semitransparente e sem difusão de pigmento. Após o subcultivo da colônia primária em ASD em temperatura ambiente (72-96 horas), a

autora relata a formação de colônias idênticas às primárias contendo esporângios ovais grandes que continham uma área mais fina na parede que se assemelhava a um poro em desenvolvimento pelo qual os esporos maduros seriam liberados. A partir do segundo subcultivo não foram mais observados esporângios grandes, apenas células regulares esféricas ligadas por uma estrutura semelhante a micélios, que após múltiplas divisões tornam-se esporos. Essa estrutura semelhante a micélios, segundo a autora, seria uma etapa transitória, a qual culmina na formação dos esporos. Neste estudo foram observadas estruturas semelhantes a zoósporos, mas não há a descrição morfológica dessas estruturas. A autora alega, segundo seus achados, o encontro de estruturas fúngicas formando zigósporos. Para validar seus resultados, esta pesquisadora inoculou as colônias isoladas em camundongos, mas nenhum dos animais desenvolveu a rinosporidiose. A autora justifica que esse resultado negativo pode ser devido a “uma resistência inata da espécie utilizada”.

Posteriormente, Thankamani e Lipin Dev (2011) avaliaram a viabilidade e as fases de desenvolvimento do *R. seeberi* em uma amostra refrigerada a 4°C há 10 anos. Os autores afirmaram ter isolado o mesmo microrganismo, nomeado UMH.48, que foi previamente isolado por Thankamani em 2005.

Mais recentemente, em 2012, Thankamani e Lipin Dev realizaram uma análise do DNA genômico da cepa original UMH.48 mantida em ágar por 2 anos e esporângios do *R. seeberi* presentes em novos tecidos de biópsias nasais (o número de amostras não foi mencionado), na tentativa de confirmar os dados morfológicos obtidos em 2005 e 2011. O “*Internal Transcriber Spacer*” (ITS) foi amplificado por PCR utilizando os primers ITS4 e ITS5 em ambas as amostras (UMH.48 e biópsias de casos recentes). Como resultado, os autores encontraram 99% de identidade da cepa UMH.48 com o tecido da biópsia analisado. O que indicaria que “o UMH.48 corresponderia ao agente etiológico da rinosporidiose humana”. Diante desse resultado molecular e da análise morfológica, “o UMH.48 parecia ser um fungo dimórfico com morfologia e ciclo de vida semelhantes ao do *Synchytrium*”. Porém, ao realizarem as sequências das duas amostras para interrogar a base de dados utilizando análise BLAST foi encontrada uma semelhança de 99% com o fungo ascomiceto *Colletotrichum truncatum*. Este fato relatado, foi considerado pelos autores uma contradição em relação à morfologia da cepa UMH.48 descrita por eles.

Em seguida, compararam também suas sequências com os chytridiomycetos e com a classe Mesomycetozoa e encontraram uma identidade muito baixa com esses dois grupos. Os autores concluíram que o agente etiológico da rinosporidiose é um “fungo desconhecido”.

2.3.3 *R. seeberi* é um eucarioto pertencente à classe Mesomycetozoa?

Em 1999, Herr *et al.* publicaram um trabalho apresentando dados taxonômicos e moleculares que evidenciam que o *R. seeberi* é um microrganismo eucarioto pertencente a um grupo de parasitos de peixes e anfíbios. Tal grupo apresenta micromorfologia esférica no tecido do hospedeiro semelhante à do *R. seeberi* e algumas espécies não são cultiváveis e não infectam animais experimentais (PEREIRA *et al.*, 2005; SPANGGAARD, HUSS E BRESCIANNI, 1995). Esses parasitos aquáticos foram descritos pela primeira vez por Ragan *et al.* (1996), que os denominaram como grupo DRIP; mais tarde Herr *et al.* (1999b) renomearam esse grupo como Mesomycetozoa. Esse achado corrobora com estudos ao longo de mais de 100 anos que indicavam que esse microrganismo é um eucarionte (ASHWORTH, 1923; BADER E GRUEBER, 1970; KANNAN-KUTTY E TEH, 1974a; KANNAN-KUTTY E TEH, 1974b; KANNAN-KUTTY E TEH, 1975; KARPOVA, 1964; KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995; MOSES *et al.*, 1991; PRINS, TANGE E DINGEMANS, 1983; SAVINO E MARGO, 1983; SEEBER, 1900; THIANPRASIT E THAGERNPOL, 1989; VANBREUSEGEM, 1973). Herr *et al.* (1999b) utilizaram amostra de tecidos de dois pacientes do Sri Lanka com rinosporidiose, que foram analisados por MTE e métodos moleculares. A análise por microscopia revelou esporângios em diferentes fases de desenvolvimento e tamanhos, bem como alguns núcleos com nucléolos evidentes e inúmeras mitocôndrias com crista plana foram observadas nos esporângios intermediários. Na análise molecular, o gene 18S SSU rDNA 1790 bp foi amplificado por PCR utilizando-se o primers universais NS1 e NS8. A análise filogenética da sequência amplificada e de outras 23 sequências de DNA de outros microrganismos revelou que o *R. seeberi* é um táxon irmão das espécies do gênero *Dermocystidium* e está intimamente relacionado aos membros da ordem Ichthyophonida (Herr *et al.*, 1999b).

No ano seguinte, Fredricks *et al.* (2000) publicaram um trabalho apresentando a amplificação da mesma sequência 18S SSU rDNA utilizando uma amostra de DNA do mesmo tecido nasal de um cão com rinosporidiose estudado por Levy, Meuten e Breitschwerdt (1986). Os autores também utilizaram tecidos fixados em formalina de três humanos com rinosporidiose e como controle negativo, a amostra de 12 pólipos nasais de humanos sem a doença. Em seguida, foram desenvolvidos diversos primers, incluindo dois específicos para o *R. seeberi* (Rhino-fw/Rhino-rev) delineados a partir de regiões únicas do DNA desse microrganismo; todos os primers foram testados e foram realizadas também análises de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Como resultado, os autores demonstraram que a sequência amplificada foi a mesma descrita por Herr *et al.* (1999b) e que os primers específicos para o *R. seeberi* não amplificaram o DNA de humanos, fungos, *Dermocystidium salmonis* e *S. destruens*. Além disso, a análise da sonda DNA FISH específica para *R. seeberi*, detectou DNA do microrganismo presente nos esporângios maduros e imaturos, mas não detectou DNA nos controles negativos. A única discrepância com o trabalho de Herr *et al.* (1999b) é que na análise dos tecidos por MTE foram observadas mitocôndrias com cristas tubulares ao invés de cristas planas. Os autores concluíram que o *R. seeberi* não é um fungo, mas sim o primeiro parasito de humanos pertencente ao grupo de protistas parasitos aquáticos localizados evolutivamente próximos ao ponto de divergência entre humanos e fungos e, assim, validaram o estudo de Herr *et al.* (1999b). Recentemente, foi realizado um estudo global taxonômico e filogenético indicando que o *R. seeberi* está classificado dentro da classe Mesomycetozoa (ADL *et al.*, 2005).

2.4 Distribuição ecológica e epidemiologia

Índia e Sri Lanka são considerados os países endêmicos da doença, embora existam casos isolados em diversos países. A idade dos pacientes varia entre 3 e 90 anos, sendo que a idade média no momento do diagnóstico é entre 20 e 40 anos (THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989). No geral, há uma maior incidência em homens adultos, embora existam trabalhos que sugerem uma maior incidência de rinosporidiose nasal em homens e ocular em mulheres (KARUNARATNE, 1964; THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989). Outros autores afirmam não existir diferença na incidência entre os sexos (MOSES *et al.* 1988). O crescimento lento

das lesões e o aparecimento tardio das manifestações clínicas dificultam o estabelecimento do período de incubação da doença que pode variar em dias, meses ou anos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; ARSECULERATNE, SUMATHIPALA E ERIYAGAMA, 2010).

Muitos pacientes são agricultores e pessoas de classe social baixa (ALLEN E DAVE, 1936; ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Isso poderia sugerir um caráter ocupacional da doença e explicaria a maior incidência em homens jovens adultos (ELLES, 1940), porém o predomínio de casos em animais machos também já foi relatado (KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995). Em regiões endêmicas, as mulheres e os homens estão expostos às mesmas prováveis fontes de infecções (rios e reservatórios) e, mesmo assim, permanece o predomínio da doença em homens (ARSECULERATNE, SUMATHIPALA E ERIYAGAMA, 2010).

Uma vez que o *R. seeberi* resiste à cultura, seu nicho ecológico ainda é desconhecido, mas considerando a localização dos pacientes em ambientes úmidos, muitos autores concordam que o microrganismo deve pertencer a um nicho aquático (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989; VILELA E MENDOZA, 2012). A ocorrência de rinosporidiose em regiões secas do Oriente Médio sugere que o *R. seeberi* produz estruturas de resistência a ambientes secos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Baseado nesta hipótese foi sugerido que tempestades de areia comuns nessas regiões poderiam promover a inoculação traumática do microrganismo no olho humano (KAYE, 1938). Contudo, a hipótese mais aceita para explicar a infecção de humanos e animais é que esta se dá provavelmente pela implantação traumática ou transepitelial da fase infectiva do parasito no tecido do hospedeiro quando este adentra em ambientes aquáticos (ARSECULERATNE, 2002; ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; HERR *et al.*, 1999b; JACOB *et al.*, 2011; VILELA E MENDOZA, 2012).

Karunaratne, em 1964, levanta a hipótese de que a “autoinoculação” dos endosporos por contiguidade ou após cirurgias seria a causa do desenvolvimento de pólipos satélites às regiões adjacentes a lesões primárias. Isso explicaria, por exemplo, casos de pólipos nasais que futuramente evoluíram para lesões na faringe. Segundo Karunaratne, a coceira de lesões primárias poderia levar também à

autoinoculação dos endosporos na pele por meio das mãos contaminadas (ARSECULERATNE, 2002; ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). A transmissão do microrganismo por fômites pode ser considerada em casos que o paciente utiliza lentes de contato (DE DONCKER *et al.*, 1990; SUH *et al.*, 2009).

No Sri Lanka, a rinosporidiose nasal é considerada mais prevalente entre muçulmanos, o que poderia ser explicado pelo costume de lavar o nariz antes de entrar na mesquita para orar. O microrganismo seria inoculado por meio da ação mecânica de limpar o nariz com o dedo (ARSECULERATNE, SUMATHIPALA E ERIYAGAMA, 2010; KARUNARATNE, 1964). Os casos de rinosporidiose peniana e uretral também são comuns entre muçulmanos, provavelmente pelo hábito de esfregar pedras no orifício uretral para remover as gotas de urina restantes (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; ARSECULERATNE, SUMATHIPALA E ERIYAGAMA, 2010; KUTTY E UNI, 1969).

Em raros casos de acometimento de órgãos viscerais como fígado, rins e pulmão a disseminação por via hematogênica é considerada. Agrawal, Sharma e Shrivastava (1959) relatam o caso de um paciente indiano de 30 anos com lesões na pele, olhos, laringe, epiglote, pulmões, fígado, rins e baço. Lesões subcutâneas e ósseas sem o aparecimento prévio de lesões mucosas ou cutâneas próximas sugerem também possível propagação hematogênica (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2013; MADKE *et al.*, 2011).

Em 1966, Symmers relata o único caso na literatura que sugere a transmissão da doença entre humanos por via sexual. Um paciente indiano de 21 anos apresentou uma lesão no pênis diagnosticada como rinosporidiose, sendo que a noiva deste paciente, também indiana, possuía rinosporidiose na vulva e o casal manteve relações antes e após o tratamento da mulher. Entretanto, além deste relato não existem evidências de que ocorra a transmissão da doença entre humanos, apesar de existirem casos de rinosporidiose em mais de um membro da mesma família. Também não existem relatos de transmissão entre humanos e animais. O mais provável é que ambos, humanos e animais são infectados por meio do contato com uma fonte comum de águas (ARSECULERATNE, 2002; ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005).

Apesar do grande número de pessoas que se banham em águas de origem subterrânea em regiões endêmicas, apenas um pequeno número desenvolve a doença, o que indica a existência de fatores predisponentes à infecção relacionados ao hospedeiro (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KARUNARATNE, 1936). O trauma anterior à exposição a fontes de águas represadas pode ser considerado como um fator predisponente em alguns casos (SYMMERS, 1966).

2.4.1 Epidemiologia da doença no Brasil

Azevedo publicou sua tese "*Rhinosporidium seeberi* – considerações sobre a morfologia, ciclo parasitário e posição sistemática" em 1958 e dedicou um capítulo para referenciar todos os casos de rinosporidiose diagnosticados no Brasil desde então. Segundo ele, o primeiro caso da doença no país é atribuído a Montenegro (estado de São Paulo) o qual não foi publicado, mas existem citações desde 1930 por outros autores. O paciente do sexo masculino apresentava um pólipso nasal. Em 1940, Fialho *et al.* encontram o segundo caso brasileiro (estado do Rio de Janeiro), um paciente também do sexo masculino com um pólipso nasal. Coelho publica em 1942 um caso de rinosporidiose nasal em um homem de 59 anos em Alagoas. Em 1944, Aben-Athar publica um caso no Amazonas de uma menina de 11 anos com um pólipso nasal. Em seguida, Capua (1944), Fialho (1946) e Ferreira Filho e Salles (1949) publicaram outros casos de rinosporidiose nasal. Em 1949 foi publicado por Bocaccio e Becker o primeiro caso de rinosporidiose ocular do país, que acometeu um homem de 55 anos no Rio Grande do Sul.

Miziara, Santos e Kalil (1972) publicam o relato de 10 casos de rinosporidiose nasal diagnosticados no 1º Hospital Distrital de Brasília, descrevendo as características macro e microscópicas das lesões. Dos 10 pacientes, 1 era de Goiás, 1 da Bahia, 1 do Distrito Federal, 1 do Espírito Santo e 6 do Maranhão.

Posteriormente, Silva *et al.* (1975) descreveram 11 casos diagnosticados pelo serviço de otorrinolaringologia do Hospital Getúlio Vargas em Teresina, Piauí. A idade dos pacientes variou de 6 anos até 33 anos, 9 eram do sexo masculino e 2 do sexo feminino, 8 eram provenientes no Maranhão e 3 do Piauí. Os pacientes apresentavam obstrução nasal parcial ou total, epistaxe e alguns se queixavam de

prurido e apresentavam secreção mucopurulenta. Todas as lesões foram retiradas cirurgicamente e cauterizadas.

França Jr. *et al.* (1994) publicaram um relato de caso de rinosporidiose nasal em uma criança de 10 anos de idade natural de Minas Gerais. A menina apresentava obstrução nasal unilateral e epistaxe intermitente há 3 meses. Foi realizada a ressecção cirúrgica da lesão e o exame anatomopatológico que evidenciou vários esporângios repletos de endosporos. Em 2002, Boni *et al.* relatam o primeiro caso de rinosporidiose ocular no estado do Espírito Santo. O paciente era natural da Bahia, morava em Vitória há 3 anos e tinha o hábito de banhar-se em rios e lagos da sua cidade de origem.

Em 2007, Tzelikis *et al.* relataram um caso de rinosporidiose ocular em um menino de 12 anos natural de Roraima, residente em Brasília. No mesmo ano Abud e Pereira (2007) publicaram o relato de 4 casos de rinosporidiose nasal diagnosticados na unidade de otorrinolaringologia do Hospital de Base do Distrito Federal entre maio de 2002 e julho de 2004. Dentre os casos, todos eram naturais de zona rural (Bahia e Maranhão), 2 eram do sexo feminino e 2 masculino, as idades variaram de 8 a 22 anos, 3 deles relataram histórico de banhos em rios e lagos. Foi realizada a biópsia de todas as lesões e, posteriormente a excisão cirúrgica em 3 casos. Uma paciente de 12 anos apresentou remissão espontânea da lesão sem recidivas após 2 anos. Outro caso de rinosporidiose nasal foi diagnosticado em Minas Gerais em um paciente do sexo masculino residente há 5 anos no Maranhão (CROSARA *et al.*, 2009).

Mais recentemente, Vallarelli, Rosa e Souza (2011) relataram um caso de rinosporidiose cutânea em um paciente de 9 anos do sexo masculino proveniente do Maranhão. Foi realizada a remoção cirúrgica da lesão próxima ao olho seguida de eletrocoagulação.

Em 1954, Ferri e Neves publicam o primeiro caso da doença em animais no país. Uma mula procedente do estado de São Paulo apresentou um pólipos no vestíbulo nasal direito que foi retirado cirurgicamente. Em 2008, Trotte *et al.* realizaram um estudo histopatológico de 11 lesões nasais em equídeos e diagnosticaram 3 casos

de rinosporidiose. Mais recentemente, Neves *et al.* (2014) relataram o primeiro caso de rinosporidiose canina no Brasil.

2.4.2 Epidemiologia da doença na América Latina

A América Latina não é a principal área endêmica da doença, mas existem casos relatados em alguns países. Como dito anteriormente, o primeiro caso publicado de rinosporidiose ocorreu na Argentina (SEEBER, 1900). Posteriormente foram relatados casos no Uruguai (PARODI, 1930), México (MENDIOLA E CORTES OCHOA, 1950), Brasil (AZEVEDO, 1958; ABUD E PEREIRA, 2007), Venezuela (STACHWSKY, 1961), Paraguai (ROLON, 1974), Costa Rica (MORA *et al.*, 1985), Panamá (LAI, RÍOS E SÁNCHEZ, 1986), Cuba (SUÁREZ *et al.*, 1996), Colômbia (VÉLEZ, SALAZAR E MONSALVE, 2011; PÉREZ *et al.*, 2012) e Chile (BREVIS *et al.*, 2010; ZOROQUIAIN, MORENO E ODDÓ, 2014).

Segundo Mayorga (1970), até 1970 ocorreram 108 casos em humanos e 45 em animais em toda a região, sendo que a maioria ocorreu no Paraguai, Argentina, Brasil e Venezuela. Dentre os casos no Paraguai e na Argentina, a grande parte é proveniente da região do Chaco. O autor ressalta que a rinosporidiose é considerada uma doença rara, mas é um problema relevante em áreas endêmicas. Posteriormente em 1974, Rolón publicou um estudo epidemiológico sobre 48 casos da doença no Paraguai no qual afirma que o país é uma importante área endêmica.

2.4.3 Epidemiologia da doença no mundo

Além da América Latina, existem casos diagnosticados da doença em diversos países da Europa, Ásia, África e América do Norte, tais como, Estados Unidos (WELLER E RIKER, 1930; RUCHMAN, 1939; ELLES, 1940; DICK, 1951; KUTNIK E KERTH, 1976; LASSER E SMITH, 1976; REIDY *et al.*, 1997; SUH *et al.*, 2009; JUSTICE *et al.*, 2013), África do Sul (COETZEE, 1959), Irã (FIROUZ-ABADI, MOGHIMI E AZAD, 1971; AZIZI, 2006), Reino Unido (HAACKE E MUGLISTON, 1982; MEARS E AMERASINGHE, 1992), Espanha (ALONSO *et al.*, 1987), Holanda (DE DONCKER *et al.*, 1990; VAN DER COER *et al.*, 1992), Zaire (UKETY *et al.*, 1992; GIGASE E KESTELYN, 1993), Burundi, Ruanda, Tanzânia, Chad (GIGASE E

KESTELYN, 1993), Nepal (SHRESTA, HENNIG E PARIJA, 1998; VENKATACHALAM, ANAND E BHOOSHAN, 2007), Singapura (LOH *et al.*, 2001), Paquistão (RAHAT E SADIQ, 2005; AZAD, AHMAD E KAYANI, 2008), Itália (MORELLI *et al.*, 2006), Canadá (HARISSI-DAGHER *et al.*, 2006; BELLIVEAU *et al.*, 2012), Congo (KAIMBO E PARYS-VAN GINDERDEUREN, 2008), Nigéria (ECHEJOH *et al.*, 2008; NGAMDU, *et al.*, 2014), Arábia Saudita (AYUB-UR-REHMAN, MUHAMMAD E MOALLAM, 2012) e Quênia (GICHUHI *et al.*, 2014).

Apesar desta ampla distribuição geográfica de casos, os países considerados endêmicos e que apresentam a maior prevalência da rinosporidiose são a Índia e o Sri Lanka (ARSECULERATNE, SUMATHIPALA E ERIYAGAMA, 2010; SATYANARAYANA, 1960; VILELA E MENDOZA, 2012). Mesmo nesses países hiperendêmicos, a taxa de incidência da doença varia de acordo com a região, sendo que na Índia, a região sul possui maior incidência e no Sri Lanka, o foco predominante está na zona seca do país. A causa da alta endemicidade da doença nessas regiões específicas ainda necessita de maior esclarecimento, mas tem sido sugerido que, se realmente fontes de águas são o habitat natural do parasito, então as características químicas e físicas dessa água precisam ser determinadas. Além disso, outros microrganismos aquáticos podem ser importantes para uma possível ação sinérgica que contribua para o estabelecimento da rinosporidiose natural (ARSECULERATNE, 2002; ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; ARSECULERATNE, SUMATHIPALA E ERIYAGAMA, 2010).

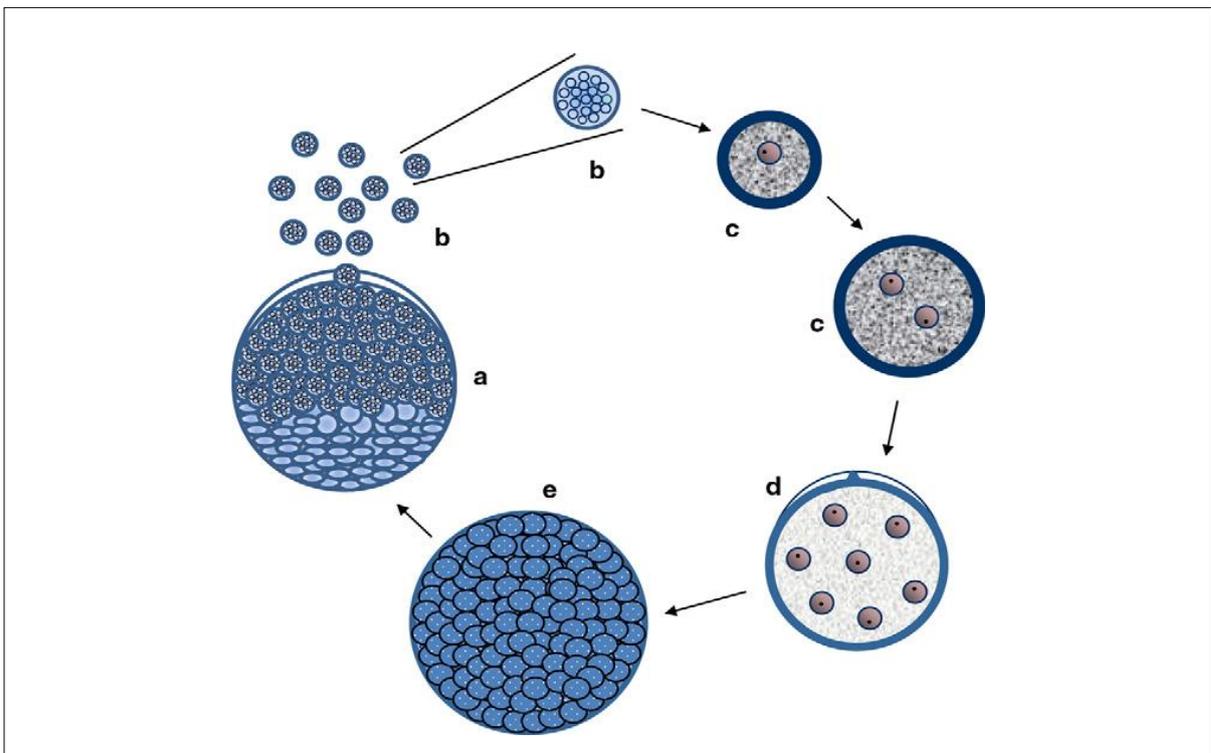
A maioria dos casos de rinosporidiose em países não endêmicos foram diagnosticados em imigrantes ou pessoas que viajaram para países endêmicos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; ARSECULERATNE, SUMATHIPALA E ERIYAGAMA, 2010; MORELLI *et al.*, 2006), mas há também casos autóctones. A Austrália é a única área geográfica no mundo na qual ainda não existe relato de casos de rinosporidioses (HARISSI-DAGHER *et al.*, 2006).

2.5 Ciclo de vida do *R. seeberi*

Diversos autores estudaram os aspectos morfológicos e o ciclo de vida (**Figura 2**) do *R. seeberi* na tentativa de compreender este patógeno singular. A caracterização dos seus estágios morfológicos nos tecidos afetados, a saber: endosporos,

esporângio juvenil (EJ), esporângio intermediário (EI) e esporângio maduro (EM) têm sido realizada em cortes histológicos corados e por MTE (ASHWORTH, 1923; AZEVEDO, 1958; GROVER, 1969; KANNAN-KUTTY E GOMEZ, 1971; KANNAN-KUTTY E TEH, 1975; KARPOVA, 1974; KARUNARATNE, 1964; MOSES *et al.*, 1991; SAVINO E MARGO, 1983; TEH E KANNAN-KUTTY, 1975). As características intrínsecas de cada uma dessas estruturas, bem como o ciclo de vida e ciclo nuclear do *R. seeberi* serão descritas mais detalhadamente a seguir.

Figura 2 – Ciclo de vida do *Rhinosporidium seeberi*.



(a) Liberação dos endosporos através do poro de saída do esporângio maduro; (b) endosporos aumentam de tamanho e perdem suas vesículas e corpos eletrodensos; (b) formação do esporângio juvenil; (c) esporângio juvenil aumenta de tamanho; (d) formação do esporângio intermediário com milhares de núcleos em divisão nuclear sincronizada; (e) formação do esporângio maduro preenchido por endosporos que, ao saírem pelo poro, reiniciam o ciclo.

Fonte: Vilela e Mendoza (2012).

2.5.1 Endosporos

O ciclo de vida do *R. seeberi* se inicia com a liberação dos endosporos maduros através de um poro de saída na parede celular do esporângio maduro (ASHWORTH,

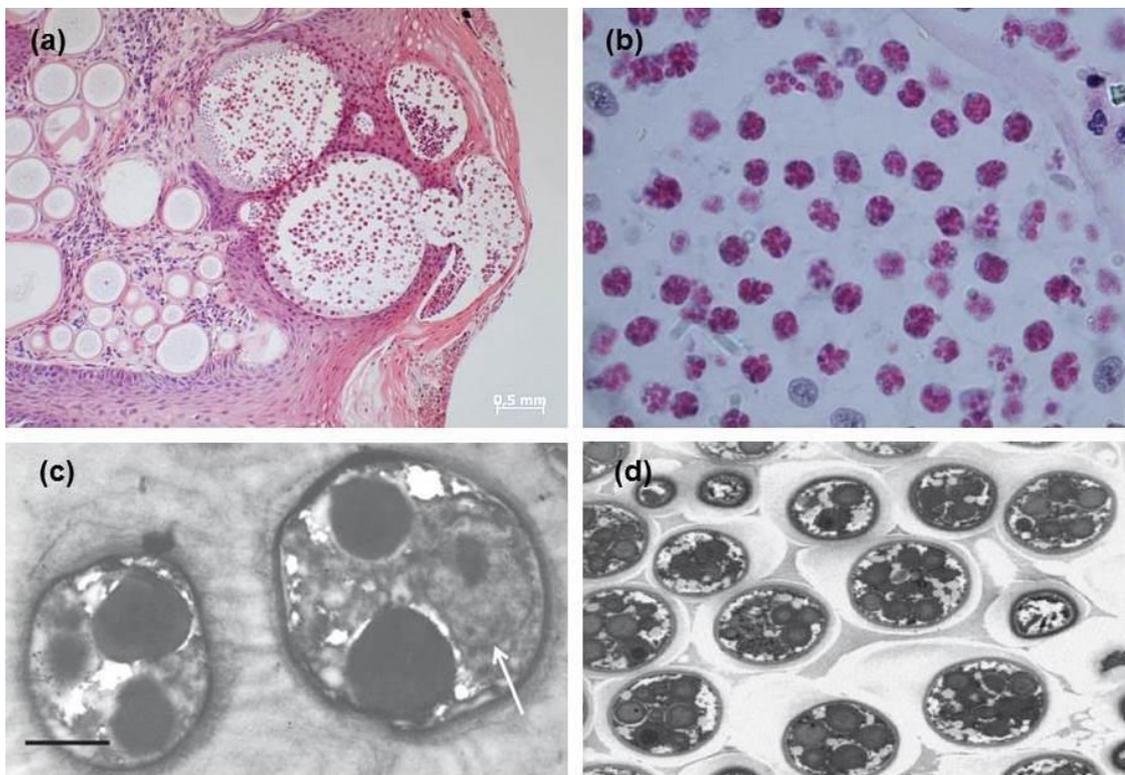
1923; LEVY, MEUTEN E BREITSCHWERDT, 1986; MENDOZA *et al.*, 1999) e não pela ruptura da parede dos esporângios como sugeriram alguns autores (KANNAN-KUTTY E TEH, 1974a; SAVINO E MARGO, 1983). A liberação dos endosporos parece ser estimulada pela presença de água. Um mecanismo que poderia explicar esse processo seria a absorção ativa de água pela parede dos esporângios maduros, o que resultaria em um aumento de pressão interna que poderia explicar a abertura do poro (ASHWORTH, 1923; MENDOZA *et al.*, 1999). A saída dos endosporos mediante estímulo de compostos isotônicos como solução salina e soro de mamíferos também estão envolvidos neste fenômeno (MENDOZA *et al.*, 1999). Segundo Mendoza *et al.* (1999), a liberação dos endosporos ocorre de forma organizada e dinâmica. Os autores descrevem a presença de uma substância mucosa próxima ao poro que parece auxiliar na regulação dessa saída. Segundo essas observações, os endosporos maduros saem primeiro, seguidos pelos endosporos remanescentes, próximos ao poro, o que resulta num movimento interno dessas estruturas da parte inferior dos esporângios em direção à porção apical. Parte dessa matriz mucoide é liberada junto com os endosporos maduros, e, Mendoza *et al.* (1999) sugerem que ela possa conter o material antigênico previamente detectado por Herr *et al.* (1999a).

Os endosporos não apresentam flagelo (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KANNAN-KUTTY E TEH, 1974a), possuem diâmetro entre 4 e 10 μm (VILELA E MENDOZA, 2012) e são preenchidos por vesículas lipídicas (KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995) e corpos elétron-densos (CED) (**Figura 3**). A função desses CED não é muito bem definida; alguns autores propuseram que eles seriam a estrutura infectante do *R. seeberi*, uma vez que afirmaram ter evidenciado núcleo ou presença de ácido nucleico nessas vesículas e, por isso, os endosporos deveriam ser denominados “esporo mórulas” (ARSECULERATNE, 2002; BEATTIE, 1906; KANNAN-KUTTY E GOMEZ, 1971). Essa teoria, entretanto, não foi amplamente aceita, pois, considerando que o diâmetro do núcleo do *R. seeberi* corresponde a aproximadamente 2-4 μm , a presença de um núcleo dentro de uma vesícula de 0,5-3,0 μm de diâmetro parece improvável. Além disso, não existe até o momento nenhum patógeno eucariota que libere sua forma infectante sem a proteção de uma parede celular (MENDOZA E VILELA, 2013; VILELA E MENDOZA, 2012). Outros autores defendem que os CED seriam estruturas de reserva proteica para a nutrição

dos endosporos até a formação do esporângio juvenil (ASHWORTH, 1923; MENDOZA E VILELA, 2013).

Além disso, os endosporos maduros possuem cápsula mucilaginosa ao redor de uma parede bilaminada com espessura entre 1 e 3 μm , um núcleo com nucléolo evidente e numerosas vesículas eletrodensas (**Figura 3**) (ASHWORTH, 1923; AZEVEDO, 1958; ELLES, 1940; KARUNARATNE, 1964; MOSES *et al.*, 1991; VILELA E MENDOZA, 2012). A visualização do núcleo e de mitocôndrias é difícil (VILELA E MENDOZA, 2012).

Figura 3 – Endosporos.



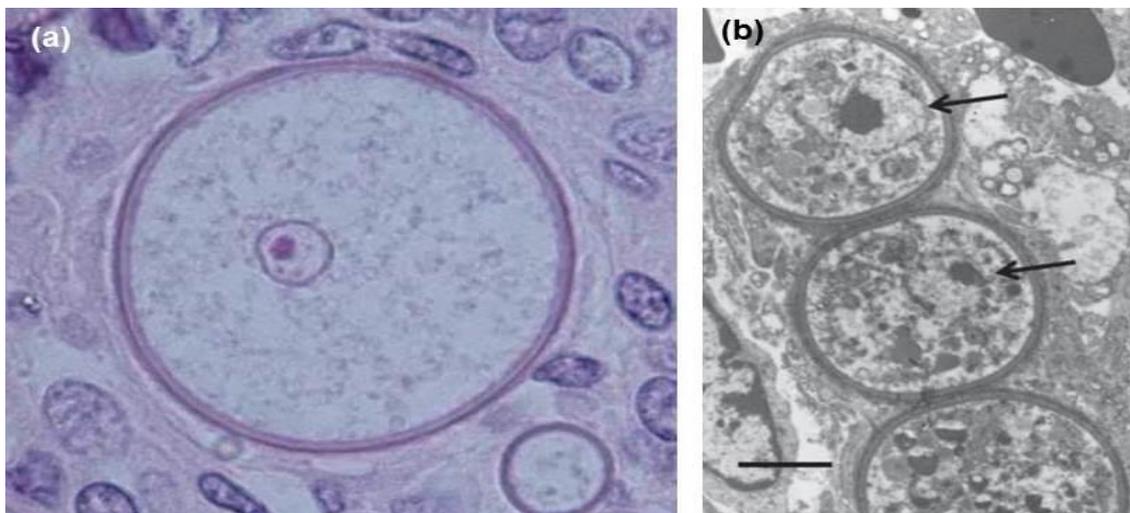
(a) Liberação dos endosporos através do poro de saída do EM (hematoxilina e eosina – H&E); (b) CED aparecem como pequenas vesículas vermelhas em coloração H&E; (c) CED aparecem como vesículas elétron-densas na microscopia eletrônica e presença de núcleo com nucléolo (seta branca); (d) cápsula mucilaginosa em torno dos endosporos (MTE).

Fonte: (a) Frickmann *et al.* (2015); (b) Michigan State University; (c) Mendoza e Vilela (2013) (d) Leeming *et al.* (2007).

2.5.2 Esporângio juvenil

Após serem liberados do esporângio maduro, os endosporos aumentam de tamanho (diâmetro entre 10-70 μm), absorvem as vesículas e os CED e se tornam esporângios juvenis (**Figura 4**) (VILELA E MENDOZA, 2012). Nesse estágio observa-se uma parede celular unilamelar elétron-densa envolvida por uma cápsula fibrilar com espessura entre 0,9-1,5 μm (KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995; SAVINO E MARGO, 1983). O citoplasma do EJ é granular e contém um núcleo envolto por uma membrana nuclear com nucléolo evidente e mitocôndrias (ASHWORTH, 1923; AZEVEDO, 1958; KANNAN-KUTTY E TEH, 1974a, 1975; KARUNARATNE, 1964;). Alguns autores descrevem também a presença de retículo endoplasmático (KANNAN-KUTTY E TEH, 1974a; KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995), estruturas vacuolares e glóbulos lipídicos no citoplasma (KARUNARATNE, 1964; SAVINO E MARGO, 1983). O esporângio juvenil continua aumentando de tamanho e torna-se um esporângio intermediário quando atinge o diâmetro entre 70-150 μm (VILELA E MENDOZA, 2012).

Figura 4 – Esporângio juvenil.



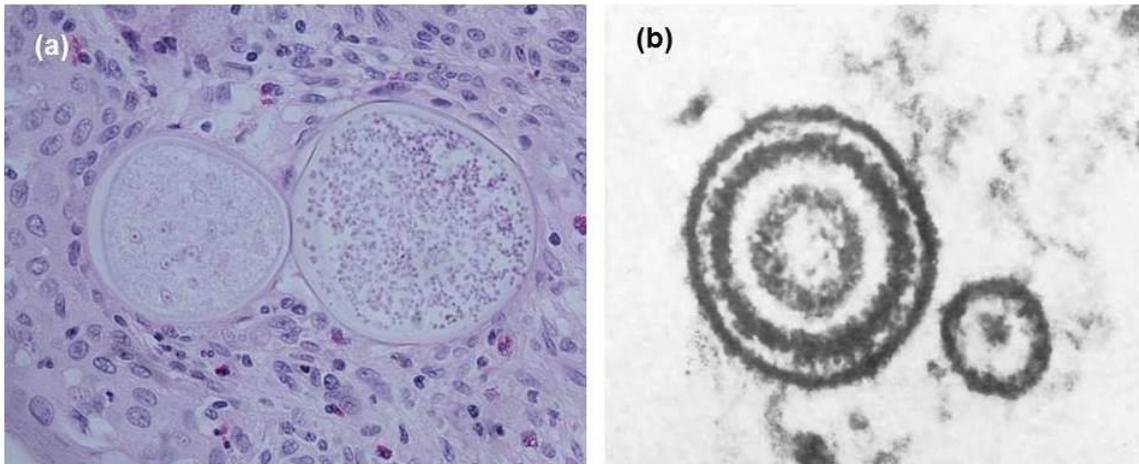
(a) Corte histológico evidenciando um EJ com núcleo e nucléolo, membrana nuclear bem definida, citoplasma granular e parede unilamelar (H&E); (b) três EJ visualizados por MTE, dois deles apresentam núcleo com nucléolos (setas pretas).

Fonte: (a) Michigan State University; (b) Mendoza e Vilela (2013).

2.5.3 Esporângio intermediário

O esporângio intermediário (**Figura 5**) possui parede celular bilamelar espessa contendo quitina (ASHWORTH, 1923; AZEVEDO, 1958; KARUNARATNE, 1964) e uma estrutura fibrilar externa com espessura entre 4-6 μm considerada por alguns autores como uma terceira camada da parede (KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995; THIANPRASIT E THAGERNPORL, 1989). A camada externa da parede é semelhante à parede unilamelar do esporângio juvenil e a camada mais interna é elétron-lucente com aspecto granular (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995; MENDOZA E VILELA, 2013). É possível observar na parede celular o local de formação do futuro poro (VILELA E MENDOZA, 2012). O citoplasma é granular e contém numerosos núcleos dispersos, mitocôndrias com crista plana e uma ou mais estruturas denominadas corpos laminados, que são anéis concêntricos elétron-densos (**Figura 5**). O significado desses corpos laminados ainda não é definido. Alguns autores propõem que eles seriam os precursores dos endosporos (KANNAN-KUTTY E TEH, 1974a; THIANPRASIT E THAGERNPORL, 1989), outros sustentam a hipótese de que seriam as estruturas infectantes do *R. seeberi* formadas a partir de um rearranjo estrutural da cromatina e liberadas pelos endosporos para futuramente formar os esporângios juvenis (KANNAN-KUTTY E GOMEZ, 1971). Ainda outros autores acreditam que sejam artefatos provenientes do processo de fixação dos tecidos (MELO, 1946 apud VILELA E MENDOZA, 2012). A formação de uma parede celular fina ao redor de cada núcleo marca a transformação do EI em EM (VILELA E MENDOZA, 2012).

Figura 5 – Esporângios intermediários e corpos laminados.



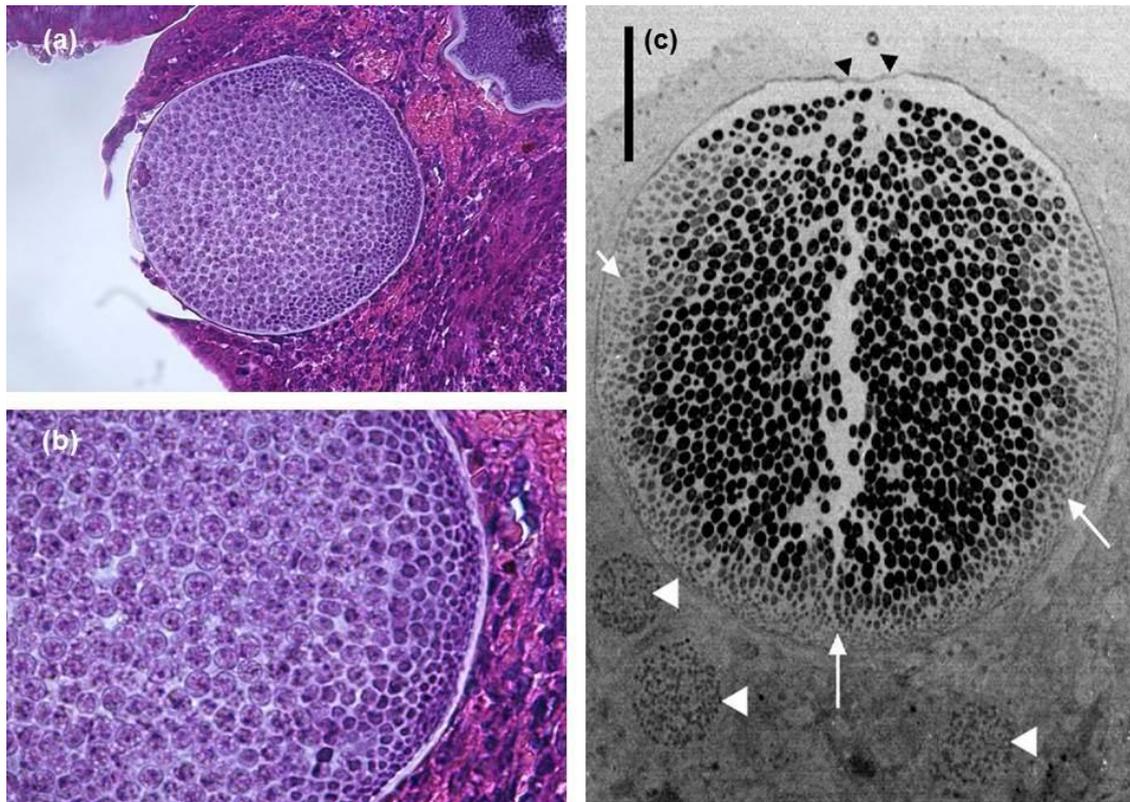
(a) EI em estágio inicial com núcleos grandes e citoplasma granular (esquerda) e EI em estágio mais avançado de amadurecimento com numerosos núcleos pequenos e citoplasma em processo de condensação (direita) (H&E); (b) corpos laminados visualizados por MTE.

Fonte: (a) Michigan State University; (b) Savino e Margo, 1983.

2.5.4 Esporângio maduro

O esporângio maduro (**Figura 6**) pode atingir o diâmetro de 450 μm ou mais. Possui parede celular fina elétron-densa e formação de uma a três camadas internas, as quais são elétron-lucentes, antigênicas e possuem aspecto mucoide (HERR *et al.*, 1999a; VILELA E MENDOZA, 2012). Logo abaixo das camadas internas, os esporângios estão completamente preenchidos por endosporos maduros e imaturos (HERR *et al.*, 1999a). Na parede celular existe um único poro de saída com diâmetro entre 10-20 μm cuja localização parece ser determinada geneticamente. Essa região que concentra os endosporos imaturos já foi descrita por diversos autores e é denominada zona germinativa (ZG) (BADER E GRUBER, 1970; KANNAN-KUTTY E TEH, 1974a; SAVINO E MARGO, 1983). Nesse local são formados novos endosporos que vão aumentando de tamanho e quando atingem a parte central do esporângio próxima ao poro já estão completamente maduros (BADER E GRUBER, 1970; MENDOZA *et al.*, 1999; SAVINO E MARGO, 1983). Os endosporos maduros são liberados através do poro e o ciclo é reiniciado (MENDOZA *et al.*, 1999).

Figura 6 – Esporângios maduros.



(a) e (b) Corte histológico corado com H&E em diferentes aumentos no qual endosporos maduros e imaturos são visualizados; (c) presença de três EI (cabeças de seta brancas) e um EI apresentando poro de saída (cabeças de seta pretas), ZG (setas brancas), endosporos maduros ao centro.

Fonte: (a) e (b) Michigan State University; (c) Vilela e Mendoza (2012).

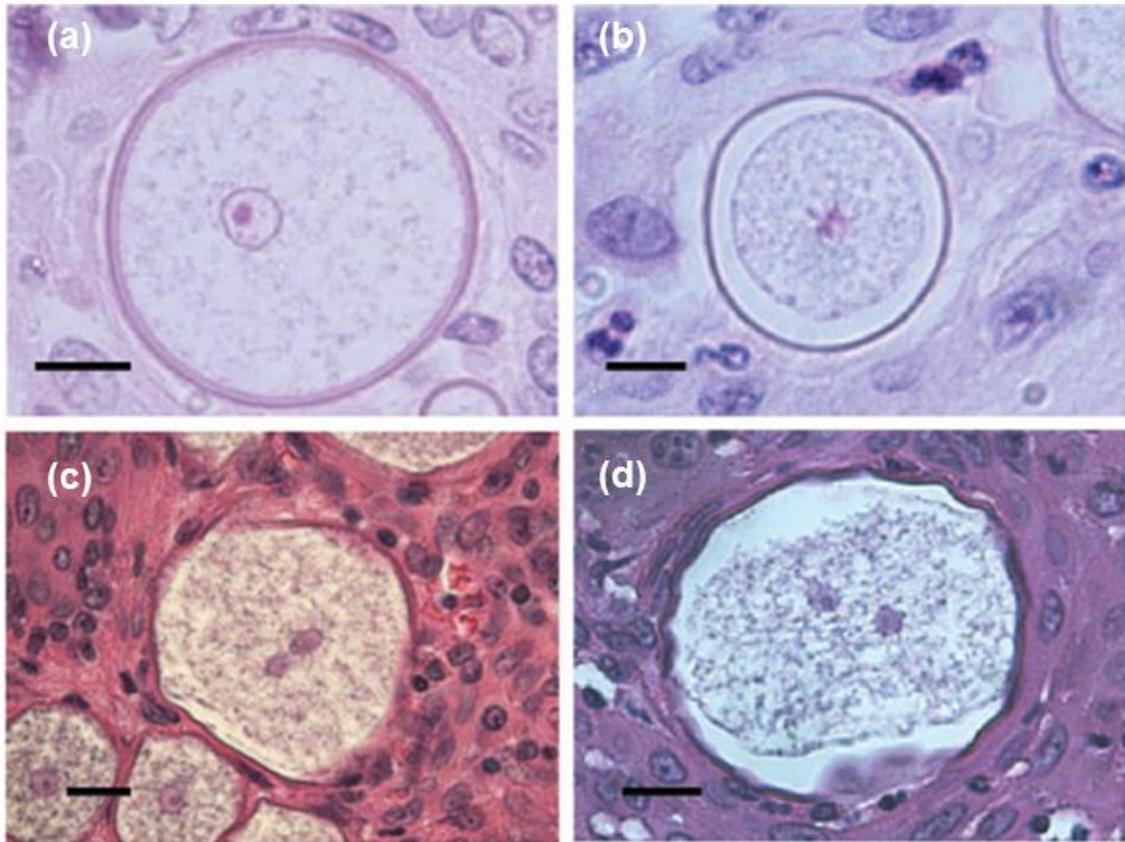
2.5.5 Ciclo nuclear

Poucos estudos avaliaram o comportamento nuclear do *R. seeberi* ao longo do seu ciclo de vida (ASHWORTH, 1923; AZEVEDO, 1958; KARUNARATNE, 1964; MENDOZA E VILELA, 2013). Ashworth (1923) foi o primeiro a descrever o ciclo nuclear desse microrganismo e apresentar figuras evidenciando esporângios imaturos durante as fases mitóticas: prófase, metáfase anáfase e telófase. Ele também descreveu a presença de quatro cromossomos a partir da condensação do material nuclear de um esporângio juvenil e a primeira divisão nuclear do *R. seeberi*. Posteriormente, Azevedo (1958) e Karunaratne (1964) publicaram figuras demonstrando novamente a formação dessas quatro protuberâncias durante o estágio de prófase, que foram interpretadas por Ashworth (1923) como cromossomos. O estudo específico do seu ciclo nuclear permaneceu esquecido até

que, mais recentemente, Mendoza e Vilela (2013) realizaram uma investigação histológica para avaliar as fases mitóticas da divisão nuclear do *R. seeberi* e registraram imagens semelhantes às apresentadas pelos autores anteriormente citados (ASHWORTH, 1923; AZEVEDO, 1958; KARUNARATNE, 1964), validando esses estudos.

Os endosporos liberados pelo EM aumentam de tamanho reabsorvem suas vesículas e tornam-se EJ. Quando os EJ atingem um diâmetro de aproximadamente 50-60 μm as granulações citoplasmáticas diminuem, o núcleo sai da fase de repouso e se prepara para a primeira divisão nuclear (**Figura 7**). Durante a prófase, a membrana nuclear desaparece gradualmente e a cromatina se condensa formando quatro protuberâncias, que são os supostos cromossomos; esse achado é extremamente raro, o que sugere que esse evento é efêmero (ASHWORTH, 1923; MENDOZA E VILELA, 2013). Logo após, o fuso mitótico é formado e observa-se uma condensação linear do material nuclear que corresponde à metáfase, na qual os cromossomos estão alinhados no centro do fuso (KARUNARATNE, 1964; MENDOZA E VILELA, 2013). Na anáfase, os cromossomos começam a se separar e é possível visualizar os filamentos do fuso entre dois pequenos pontos condensados (MENDOZA E VILELA, 2013) (**Figura 8**). Posteriormente, na telófase, o fuso desaparece, embora na fase inicial ainda possa ser visualizado, e a membrana nuclear é formada assim como o nucléolo torna-se evidente (ASHWORTH, 1923; MENDOZA E VILELA, 2013) (**Figura 7**).

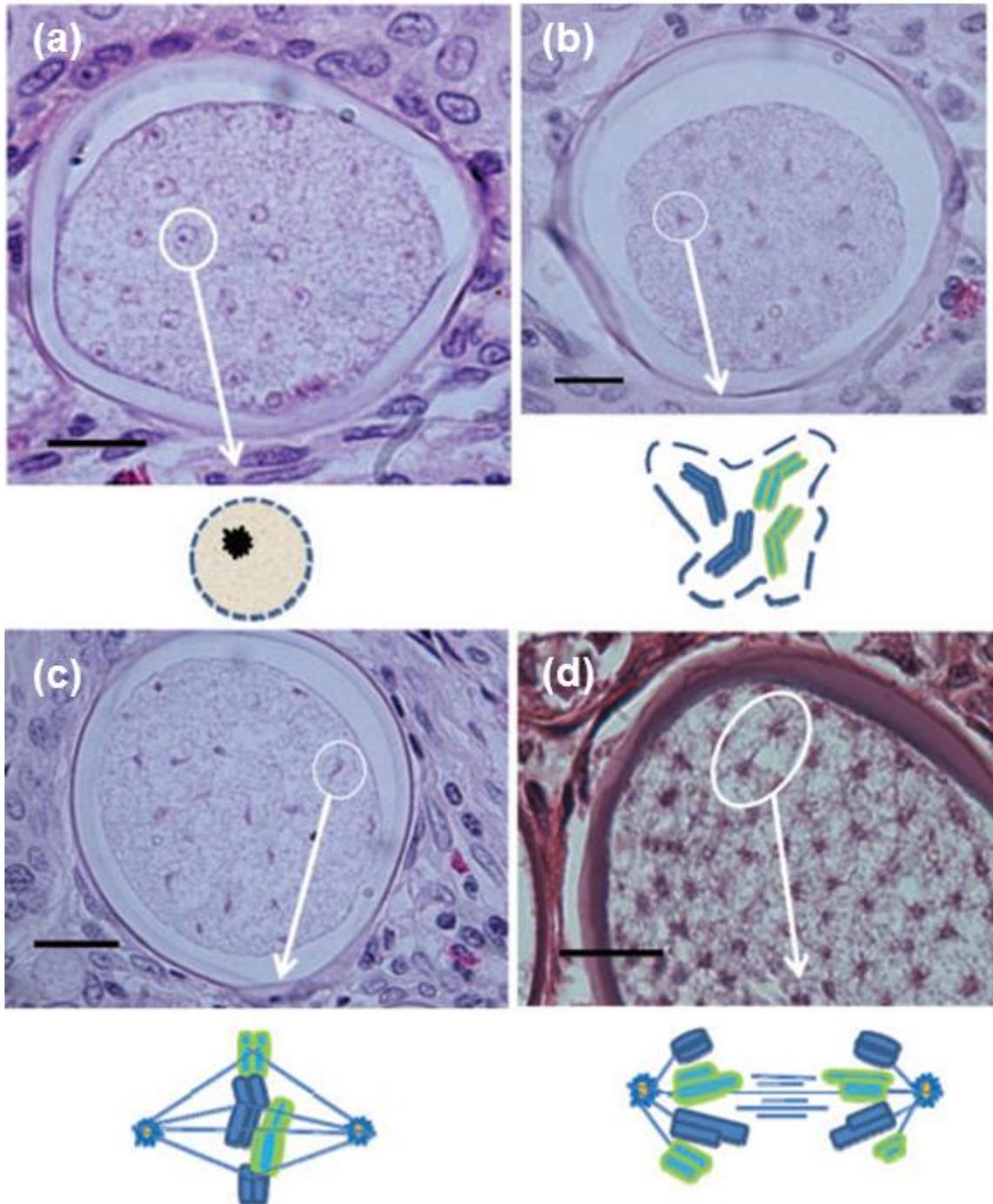
Figura 7 – Primeira divisão nuclear do *R. seeberi*.



(a) EJ com núcleo em fase de repouso com nucléolo evidente (Escala = 10 μm); (b-d) primeira divisão nuclear do *R. seeberi*, que se inicia com a distorção do núcleo e a formação de quatro protuberâncias (b) (Escala = 10 μm); (c) fase final da telófase (Escala = 12 μm); (d) formação de dois núcleos com ausência de citocinese (Escala = 10 μm).

Fonte: adaptado de Mendoza e Vilela (2013).

Figura 8 – Arranjos nucleares apresentados pelo *R. seeberi* ao longo do seu ciclo nuclear.



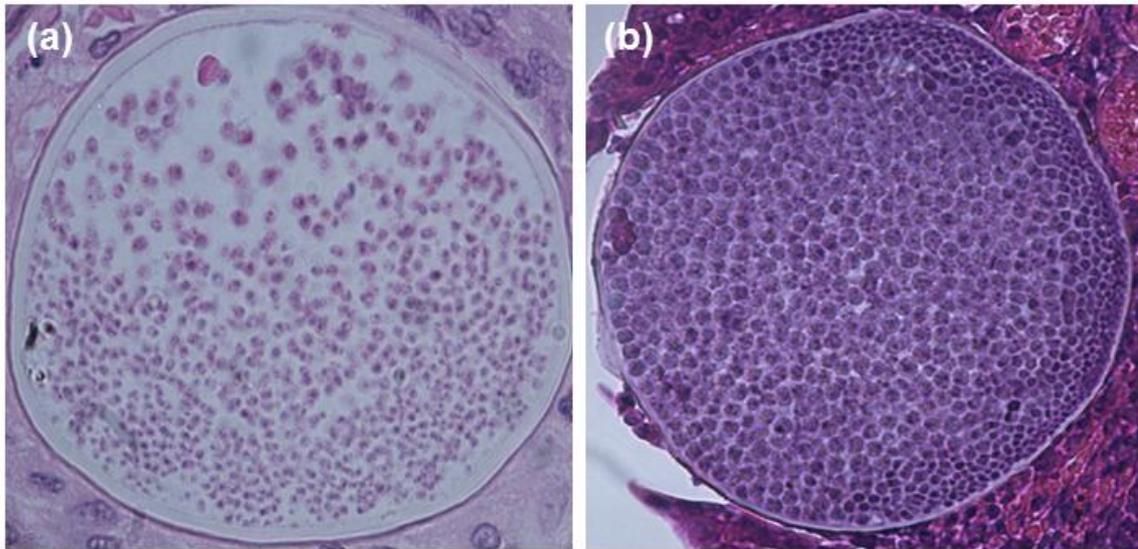
(a) EI com numerosos núcleos em fase de repouso com nucléolos evidentes (círculo; Escala = 21 μ m); o desenho abaixo de (a) representa de forma esquemática a interpretação de Mendoza e Vilela desse fenótipo do *R. seeberi*. (b) EI com numerosos núcleos em prófase, semelhantes ao descrito na Fig. 2b (Escala = 21 μ m); desenho esquemático demonstrando um núcleo em prófase com a formação de quatro protuberâncias similares às descritas por Ashworth (1923), Azevedo (1958) e Karunaratne (1964) como prováveis cromossomos. (c) EI com material nuclear condensado em forma linear (círculo), provavelmente em metáfase; nota-se que a condensação às vezes é visualizada

como pequenos pontos, provavelmente devido ao corte sagital do material nuclear em metáfase (Escala = 23 μm). Abaixo de (c), a metáfase é ilustrada de forma esquemática com a presença de centríolos e microtúbulos que não são visualizados na microscopia. (d) EI com núcleos provavelmente em anáfase, com presença de numerosos filamentos emanando a partir de dois pontos nucleares escuros (estrutura oval) (Escala = 20 μm). O desenho abaixo de (d) representa a separação dos cromossomos na anáfase e a presença dos microtúbulos. A telófase é apresentada na Fig. 7c.

Fonte: Mendoza e Vilela (2013).

Após a separação, os núcleos aumentam de tamanho e se preparam para a próxima divisão que resultará em quatro núcleos (ASHWORTH, 1923). Divisões nucleares sucessivas, sincrônicas e sem citocinese continuam ocorrendo e resultam na formação de 8, 16, 32, 64 núcleos e, assim, sucessivamente até atingir aproximadamente 16.000 núcleos (ASHWORTH, 1923; AZEVEDO, 1958). Ao longo das divisões, o tamanho dos esporângios aumenta e diâmetro dos núcleos aparentemente diminui. A parede celular do EI torna-se espessa devido à deposição de uma substância semelhante à celulose e, na fase final da maturação observa-se a condensação do citoplasma ao redor dos núcleos. Essa condensação começa na periferia do citoplasma e alcança gradualmente o centro. Após a última divisão nuclear ocorre a citocinese que é a divisão do citoplasma através da formação de uma parede celular fina ao redor de cada núcleo. Este processo marca a formação dos endosporos que preenchem os esporângios maduros. Parte dos endosporos amadurecem, o que resulta no aumento de tamanho do EM e, após a liberação dos endosporos maduros o ciclo é reiniciado (ASHWORTH, 1923; AZEVEDO, 1958; KARUNARATNE, 1964; MENDOZA E VILELA, 2013) (**Figura 9**).

Figura 9 – Fase final da maturação do EI e formação do EM.



(a) EI em estágio final de maturação com presença de condensação citoplasmática observada como um padrão róseo em torno dos núcleos logo antes da citocinese. (b) EM preenchido com endosporos com parede celular.

Fonte: Michigan State University.

Segundo Mendoza e Vilela (2013), o *R. seeberi* possui uma “sofisticada maquinaria de ciclo celular” que coordena minuciosamente o momento da divisão nuclear sincronizada em cada núcleo. Os autores também observam que a formação de inúmeros núcleos sem citocinese favorece a rápida formação de milhares de células.

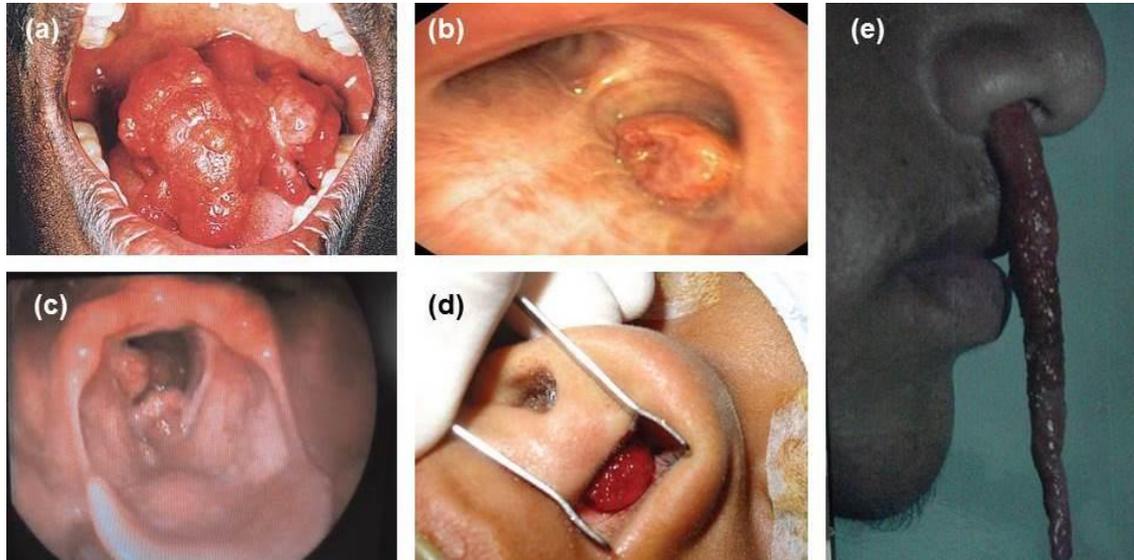
2.6 Manifestações clínicas da rinosporidiose

2.6.1 Manifestações clínicas em humanos

As lesões da rinosporidiose manifestam-se principalmente na mucosa nasal (septo, corneto inferior e médio, assoalho e meato nasal) e correspondem a aproximadamente 70-75% dos casos. Os pólipos podem ser uni ou bilaterais, solitários ou múltiplos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KARUNARATNE, 1964; THIANPRASIT E THAGERNPORL, 1989). Outros sítios respiratórios que podem ser eventualmente acometidos são a nasofaringe (LOH *et al.*, 2001), seios paranasais (VARSHENEY *et al.*, 2007), úvula, epiglote, amígdalas, palato (SATYANARAYANA, 1960), laringe (SINGH *et al.*, 2013), traqueia (MADANA *et al.*,

2010; PURI *et al.*, 2000) e brônquios (BANJARA *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013) (Figura 10).

Figura 10 – Manifestações clínicas da rinosporidiose.

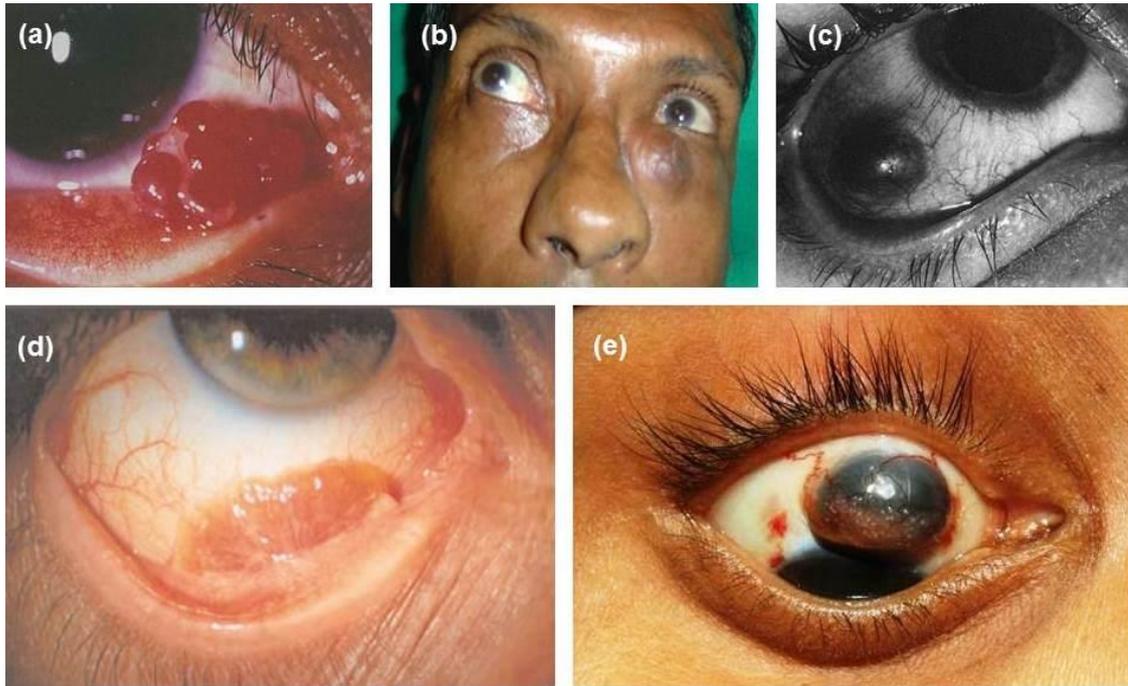


(a) Lesão na orofaringe; (b) lesão nos brônquios; (c) pólipos na laringe; (d) e (e) pólipos nasais.

Fonte: (a) Loh *et al.* (2001); (b) Singh *et al.* (2013); (c) Madana *et al.* (2010); (d) Abud e Pereira (2007); (e) Ghorpade (2008).

Elliot e Ingram (1912) relataram o primeiro caso de rinosporidiose ocular que, depois da mucosa nasal, é o sítio mais comum da infecção e corresponde a aproximadamente 15% dos casos (KARUNARATNE, 1964; THIANPRASIT E THAGERNPORN, 1989). As lesões na conjuntiva palpebral são as mais frequentes (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KARUNARATNE, 1964; SOOD, AGARWAL E GUGNANI, 2012), mas existem relatos de casos em outros locais como saco lacrimal (BELLIVEAU *et al.*, 2012; MUKHERJEE *et al.*, 2013), conjuntiva bulbar (HARISSI-DAGHER *et al.*, 2006), pálpebras (KURIAKOSE, 1963), esclera (DE DONCKER *et al.*, 1990) e canalículos lacrimais (KURIAKOSE, 1963) (Figura 11).

Figura 11 – Rinosporidiose ocular.

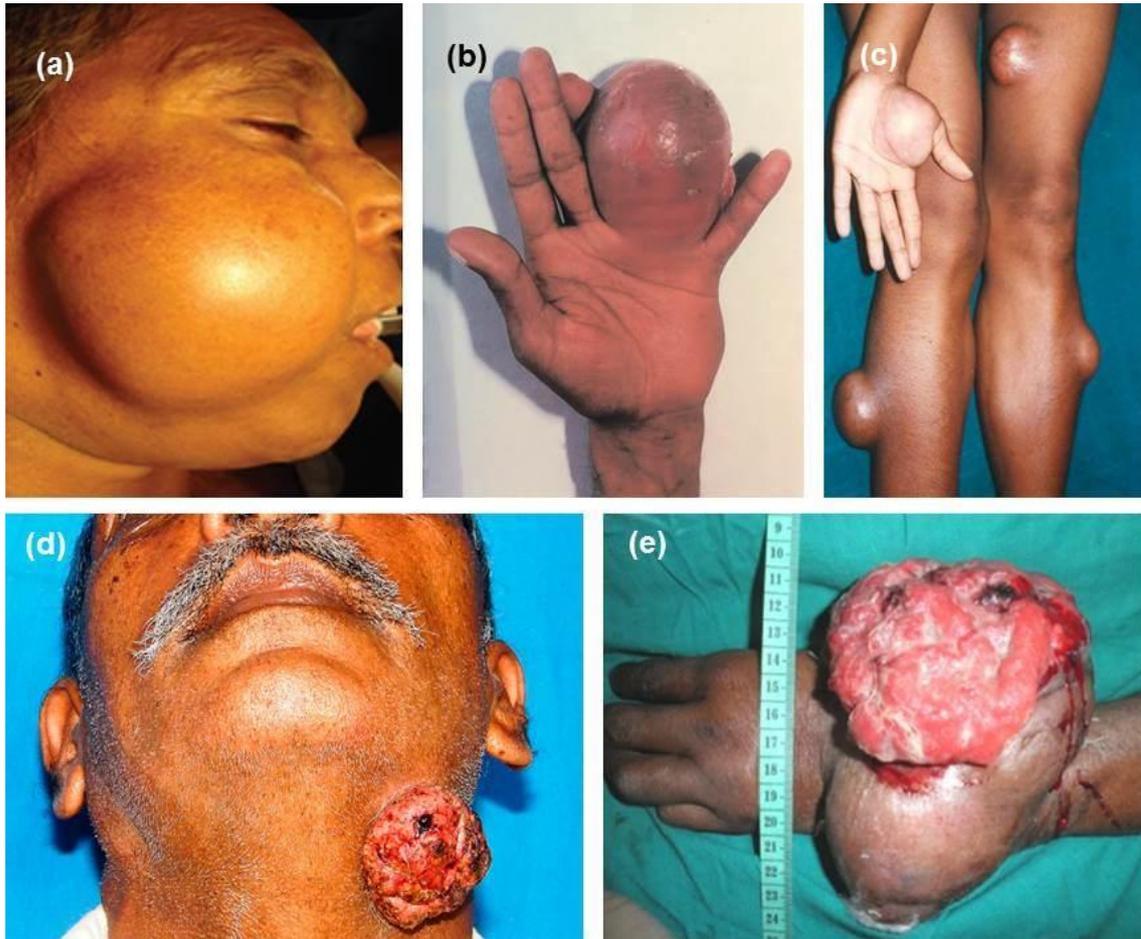


(a) Pólipo multilobulado, vascularizado e com pontos brancos na pálpebra inferior; (b) rinosporidiose no saco lacrimal; (c) ectasia escleral decorrente de lesão na conjuntiva; (d) pólipo na conjuntiva bulbar; (e) rinosporidiose ocular na conjuntiva bubar com coloração negra, pontos brancos e aumento dos vasos adjacentes.

Fonte: (a) Cohen *et al.* (1997); (b) Gosh *et al.* (2008); De Doncker *et al.* (1990); (d) Harissi-Dagher *et al.* (2006); (e) Jacob *et al.* (2011).

Além das lesões oculares e no trato respiratório existem relatos em locais menos frequentes como, por exemplo, ducto parotídeo (PANDA *et al.*, 2013; SUDARSHAN *et al.*, 2012; YADAV E SHRESTHA, 2014), articulações (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2013; MONDAL E CHOWDHURY, 2013), fossa poplítea (HOUREIH *et al.*, 2006), intrabucal e seio maxilar (DESHMUKH E KARANDE, 2011), unha (NATH *et al.*, 2009), ossos (AMRITANAND *et al.*, 2008; KUNDU *et al.*, 2013; SURYAWANSHI *et al.*, 2011), pele (SHETTY E MOHAN, 2013; VALLARELLI, ROSA E SOUZA, 2011), linfonodos (ARSECULERATNE, PANABOKKE, ATAPATTU, 2001) lesões subcutâneas (LAXMISHA E THAPPA, 2005; RAVEENTHIRAN, 2006), uretra (AZAD, AHMAD E KAYANI, 2008; PAL, MOULIK E CHOWDHURY, 2008), pênis (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2013; PAL, MOULIK E CHOWDHURY, 2008), vulva (SYMMERS, 1966) e vísceras (AGRAWAL, SHARMA E SHRIVASTAVA, 1959) (Figura 12).

Figura 12 – Manifestações clínicas menos frequentes.



(a) Rinosporidiose no ducto parotídeo; (b) lesão óssea provocando fratura; (c) lesões subcutâneas; (d) pólipos cutâneos ulcerados; (e) lesão ósteo-articular ulcerada.

Fonte:(a) Sudarshan *et al.* (2012); (b) Arseculeratne e Mendoza (2005); (c) Raveenthiran (2006); (d) Shetty e Mohan (2013); (e) Bandyopadhyay *et al.* (2013).

Os sintomas dependem do sítio anatômico afetado, mas, no geral, são indolores. No trato respiratório é comum o relato de coceira, corrimento nasal sem secreção purulenta, epistaxe (inclusive ao espirrar e assuar o nariz), dificuldades para respirar, sensação de corpo estranho no nariz, voz anasalada em caso de obstrução bilateral, e raramente dor (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KARUNARATNE, 1964; SATYANARAYANA, 1960). Além disso, pacientes com lesões na laringe podem apresentar rouquidão (MADANA *et al.*, 2010) e aqueles com pólipos nos brônquios podem apresentar tosse com sangue, estridor e febre (MADANA *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2013; THOMAS, GOPINATH E BETTS, 1956).

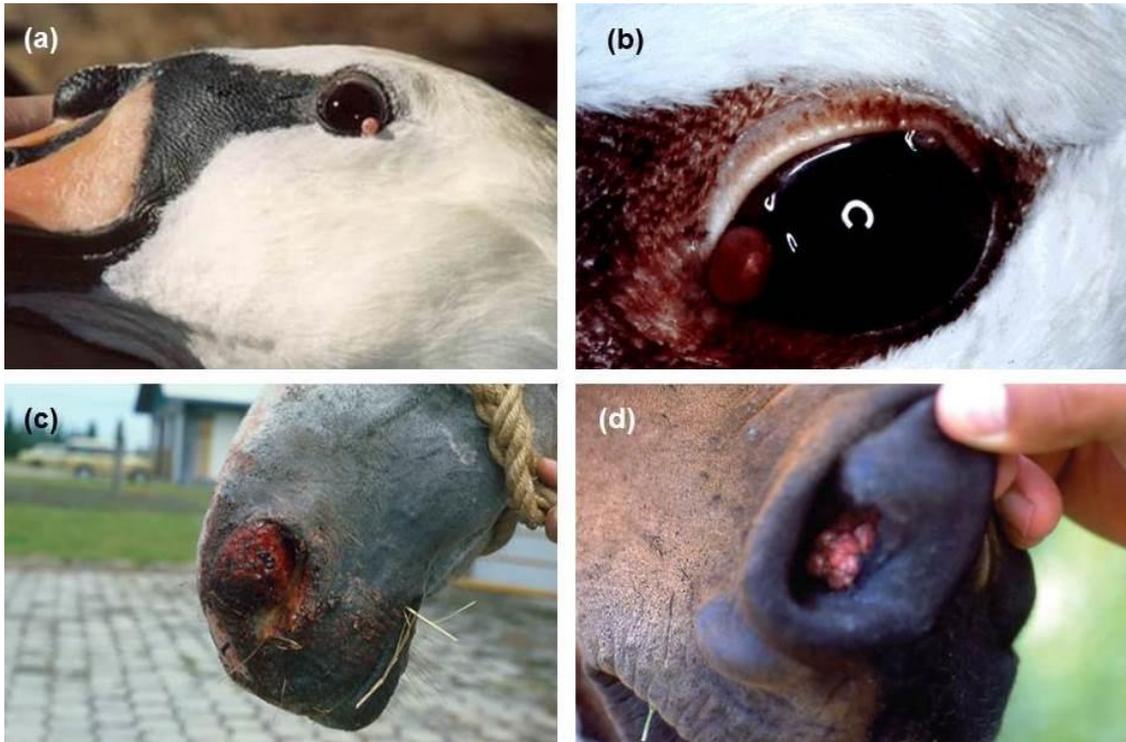
Na rinosporidiose ocular os pacientes podem apresentar olhos hiperemiados, sensação de corpo estranho, secreção mucopurulenta, dor eventual, sangramento, visão turva, lacrimejamento, fotofobia e desconforto (KARUNARATNE, 1964; VÉLEZ, SALAZAR E MONSALVE, 2011; WATVE *et al.*, 2006; ZOROQUIAIN, MORENO E ODDÓ, 2014). As lesões cutâneas normalmente apresentam prurido, podem ulcerar, sangrar e propiciar o aparecimento de infecções secundárias, o que resulta em dor ao toque (SATYANARAYANA, 1960; SHETTY E MOHAN, 2013). Lesões na uretra podem ocasionar disúria e sangramentos (AZAD, AHMAD E KAYANI, 2008).

2.6.2 Manifestações clínicas em animais

Diversos animais como, por exemplo, cães (ALLISON *et al.*, 1986; EASLEY *et al.*, 1986; NEVES *et al.*, 2014), gatos (BRENSKEKE E SAUNDERS, 2010; MOISAN E BAKER, 2001), mulas (BERROCAL E LÓPEZ, 2007), cavalos (BURGESS *et al.*, 2012; LONDERO, SANTOS E FREITAS, 1977), patos (DAVIDSON E NETTLES, 1977), cisnes (KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995), búfalos e gado (MOSES E BALACHANDRAN, 1987), um ganso (FAIN E HERIN, 1957 apud KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995) e um golfinho (ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY [AFIP], 1998) foram diagnosticados com a doença (**Figura 13**).

Assim como em humanos, a rinosporidiose nasal é mais comum nos animais e atinge em maior número os machos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Existem, entretanto, casos de rinosporidiose ocular em aves (KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995) e em um golfinho (AFIP, 1998).

Figura 13 – Manifestações clínicas em animais.



(a) e (b) Rinosporidiose ocular em cisnes; (c) e (d) pólipos nasais em equinos.

Fonte: (a), (b) e (c) Imagens cedidas pela Michigan State University; (d) Berrocal e Lopez (2007).

2.7 Patologia

2.7.1 Aspectos macroscópicos das lesões

Os pólipos nasais podem ser únicos ou múltiplos e apresentam tipicamente aspecto de “morango” com coloração rosada a vermelho púrpura, superfície granular e pequenos pontos brancos a amarelados que correspondem a esporângios maduros subepiteliais (**Figura 14**). As lesões são macias, lobuladas, sésseis e/ou pediculadas, friáveis, podem pender do orifício nasal ou se estender para a nasofaringe, e não infiltram tecidos mais profundos (ALLEN E DAVE, 1936; ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KARUNARATNE, 1964; SATYANARAYANA, 1960; THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989). Pólipos em sítios respiratórios estão comumente recobertos de muco, no qual podem ser visualizados microscopicamente endosporos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Satynarayana (1960) observou em um estudo de 255 casos que lesões na

úvula, região orofaríngea e tonsilas palatinas (amígdalas) são normalmente sésseis com aparência granulomatosa e, em alguns casos, observa-se destruição do septo nasal.

Figura 14 – Pólipo nasal pediculado após excisão cirúrgica; lesão lobulada, vascularizada e com aspecto de “morango”.



Fonte: Sefu e Fauzia (2011).

As lesões na conjuntiva normalmente são unilaterais e solitárias e apresentam lento crescimento polipoide ou aderido na pálpebra superior e/ou inferior, e, também na conjuntiva bulbar, sendo que os pólipos são indolores, granulares, rosados, macios, sésseis ou pediculados e podem apresentar pontos brancos na superfície, bem como a secreção de pus e sangramento (ARSECULERATNE, 2002; ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; JACOB *et al.*, 2011; THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989; THOMAS, 2003). Algumas lesões podem ser azuladas a avermelhadas semelhantes a hemangiomas (BRANSCOMB, 2002), em raros casos pode ocorrer afinamento escleral (TZELIKIS *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 2011) e estafiloma escleral (JACOB *et al.*, 2011; THOMAS, 2003).

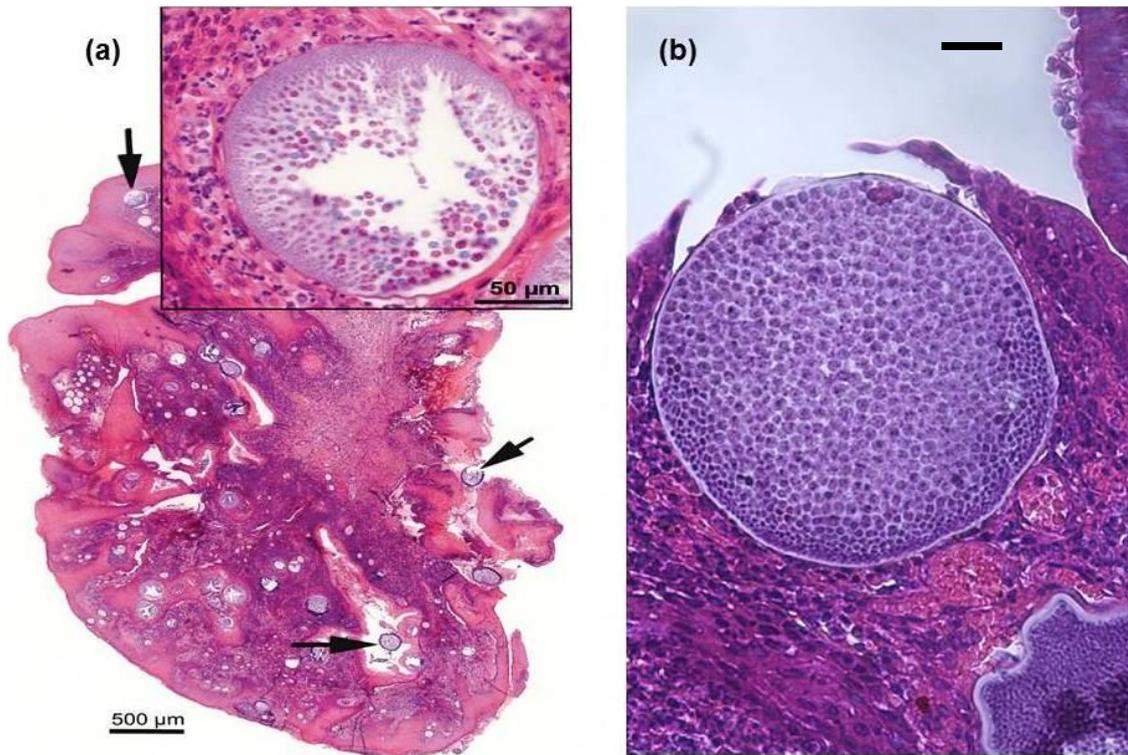
No caso da rinosporidiose uretral, as lesões são polipoides e descritas como solitárias, rosadas e pediculadas que crescem na parede da fossa navicular (THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989). As lesões penianas podem inicialmente parecer verrugas venéreas que posteriormente adquirem um aspecto de couve-flor (ALLEN E DAVE, 1936).

Na infecção cutânea, que é rara, as lesões iniciam como pequenas pápulas e tornam-se verrucosas e granulomatosas com o tempo. Tais lesões raramente são indolores, friáveis, raramente pediculadas, geralmente com aspecto semelhante a tumores malignos e ulceram facilmente, o que propicia o desenvolvimento de infecções secundárias (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; BRANSCOMB, 2002; THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989). Ossos subjacentes às lesões como, por exemplo, nas mãos ou nos pés, podem apresentar erosão ou fraturas (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005).

2.7.2 Aspectos microscópicos das lesões

Na análise microscópica das lesões observa-se um epitélio hiperplásico, embora em algumas porções pode-se observar o epitélio delgado, especialmente, quando há esporângios maduros e rompidos projetando-se em direção à superfície do tecido (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; SATYANARAYANA, 1960) fenômeno este denominado por alguns autores como “eliminação transepitelial” (AZADEH, BAGHOUMIAN E EL-BAKRI, 1994) (**Figura 15**). O estroma subepitelial é constituído de tecido fibromixomatoso ricamente vascularizado com infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, plasmócitos, histiócitos, neutrófilos e, raramente, eosinófilos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; KARUNARATNE, 1964) (**Figura 16**). O infiltrado inflamatório é moderado em torno dos esporângios e mais intenso ao redor dos endosporos livres, este último com predomínio de neutrófilos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Células gigantes são mais comuns em casos da enfermidade crônica e podem ser visualizadas ao redor ou dentro de esporângios rompidos ou degenerados (**Figura 16**) (KARUNARATNE, 1964). São visualizadas também áreas hemorrágicas com presença de células vermelhas ou hemossiderina livre e/ou dentro das células fagocíticas (ASHWORTH, 1923).

Figura 15 – Cortes histológicos corados com H&E.



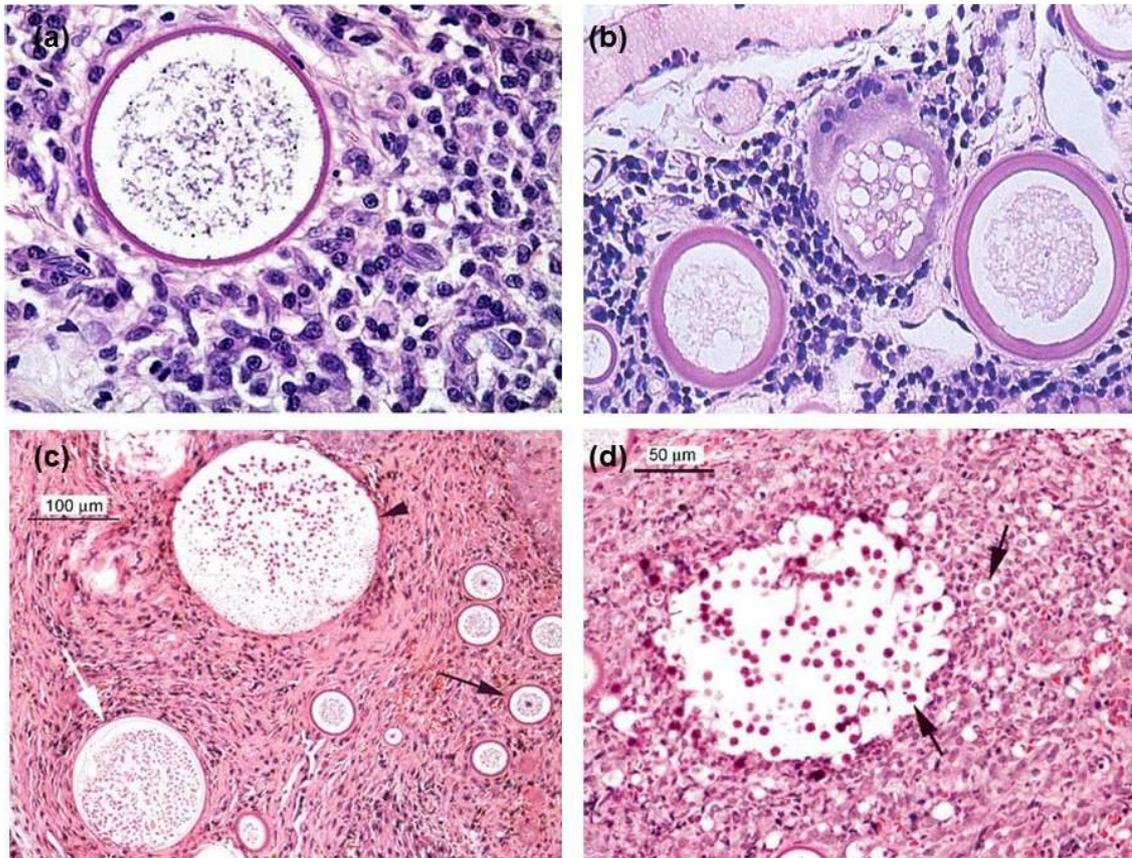
(a) Pólipo composto por mucosa hiperplásica e estroma fibrovascular preenchido por inúmeros esporângios; EM repleto de endosporos, em maior aumento; (b) EM projetando-se em direção à superfície do epitélio mucoso (“eliminação transepitelial”) (Escala= 50 µm) .

Fonte: (a) Berrocal e Lopez (2007); (b) imagem cedida pela Michigan State University.

As amostras cutâneas apresentam hiperplasia pseudoepiteliomatosa com hiperqueratose e papilomatose, bem como reação granulomatosa mista com presença marcante de células gigantes. O microrganismo não penetra tecidos mais profundos do que a camada inferior da derme (THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989).

Freqüentemente todos os estágios evolutivos do *R. seeberi* podem ser observados numa mesma secção. Os endosporos podem estar dentro dos esporângios maduros ou livres no estroma (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; PRINS, TANGE E DINGEMANS, 1983). Algumas vezes, esporângios aparentemente não rompidos são invadidos por tecido fibroso ou podem calcificar. Também se pode observar com certa freqüência um ou mais esporângios juvenis associados ou não a tecido fibroso dentro de esporângios maduros (KARUNARATNE, 1964).

Figura 16 – Cortes histológicos de pólipos apresentando tecido fibromixomatoso e infiltrado inflamatório constituído de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e histiócios.



(a) infiltrado inflamatório ao redor de esporângio (H&E 40x); (b) esporângios degenerados e célula gigante adjacente (PAS 40x); (c) esporângios em diferentes estágios de desenvolvimento (setas; H&E); (d) endosporos livres cercados por neutrófilos (H&E).

Fonte: (a) Gichuhi *et al.* (2014); (b) Reidy *et al.* (1997); (c) e (d) Meier *et al.* (2006).

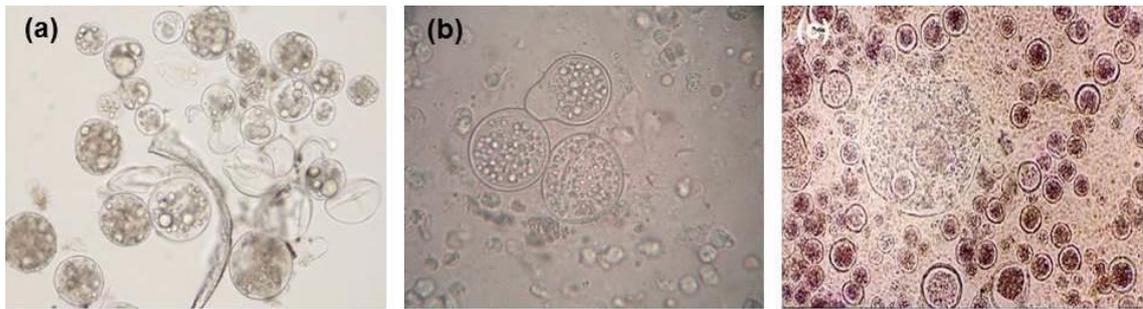
2.8 Diagnóstico Laboratorial

2.8.1 Exame direto

O exame direto não é descrito com frequência no diagnóstico da rinosporidiose, mas pode ser feito pela adição de hidróxido de potássio (KOH) sobre o raspado das lesões (CHOUDHURY, 2010), aspirados (MADKE *et al.*, 2011) ou sobre uma porção do tecido biopsiado (CHITRAVEL *et al.*, 1981a; SILVA *et al.*, 2005). Amostras líquidas mucosas, como lavado broncoalveolar e escarro, podem ser examinadas por esse método após adição de KOH 10% (GORI E SCASSO, 1994). O *imprinting* do tecido sobre uma lâmina também pode ser utilizado como um método direto

(GHORPADE E RAMANAN, 1998; SATYANARAYANA, 1960). Na microscopia são observados esporângios em diferentes estágios de desenvolvimento (PÉREZ *et al.*, 2012) (**Figura 17**).

Figura 17 – Esporângios em diferentes fases de desenvolvimento visualizados por exame direto.



(a) raspado de lesão nasal (KOH 5%); (b) aspirado de lesões disseminadas (KOH 10%); (c) tecido de pólipos nasal obtido por excisão cirúrgica (KOH 10%).

Fonte: (a) Choudhury (2010); (b) Madke *et al.* (2011); (c) Das *et al.* (2011).

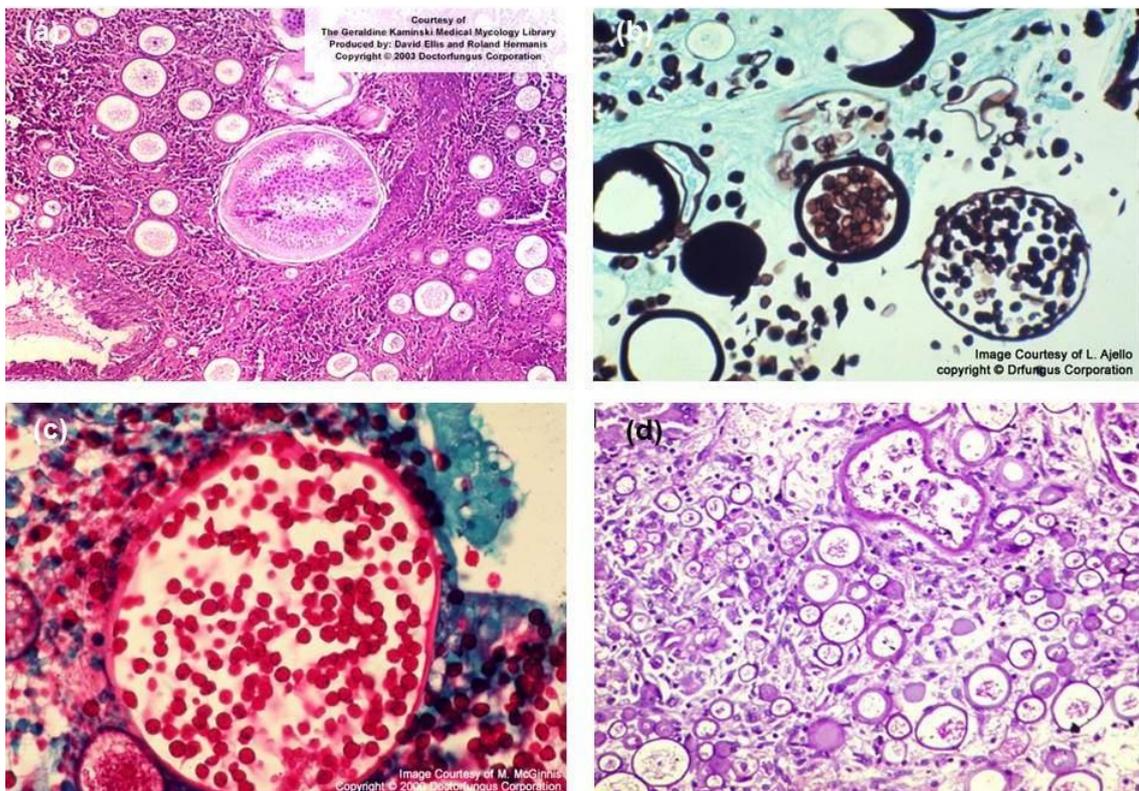
2.8.2 Exame anatomopatológico

O diagnóstico definitivo da doença é feito pela histopatologia dos tecidos obtidos por biópsia ou ressecção (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Os aspectos macro e microscópicos são avaliados de acordo com a descrição do item 2.7. No exame microscópico são utilizadas colorações de rotina como hematoxilina e eosina (H&E), ácido periódico de Schiff (PAS), mucicarmina e prata metenamina de Gomori (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; MONDAL E CHOWDHURY, 2013) e o achado dos esporângios em diversos estágios de desenvolvimento e endosporos confirma o diagnóstico (BHARGAVA, GROVER E MAHESHWARI, 2012) (**Figura 18**).

Segundo Kennedy, Buggage e Ajello (1995), a parede celular unilamelar do esporângio juvenil é eosinofílica (H&E), também se cora por PAS (PANDA *et al.*, 2013), mas não se cora com mucicarmina e prata. O interior do EJ apresenta material eosinofílico e/ou basofílico (H&E), coloração positiva variável por PAS e negativa para mucicarmina e prata. O esporângio intermediário apresenta a camada

externa da parede celular bilamelar eosinofílica (H&E), a qual não se cora por PAS, mucicarmina e prata. A camada interna da parede é positiva para PAS e mucicarmina e fracamente positiva a negativa para coloração de prata. O esporângio maduro apresenta o mesmo padrão de coloração do intermediário. Os endosporos imaturos se coram por PAS e mucicarmina, mas não por prata. Já os endosporos maduros apresentam parede celular basofílica e citoplasma eosinofílico (H&E), a parede e o conteúdo interno são positivos para PAS.

Figura 18 – Colorações histológicas utilizadas no diagnóstico anatomopatológico da rinosporidiose.



(a) H&E; (b) prata metenamina de Gomori; (c) mucicarmina; (d) PAS.

Fonte: (a), (b) e (c) disponível em: <www.doctorfungus.org>. Acesso em: 13 de dezembro de 2013; (d) Suryawanshi *et al.* (2011).

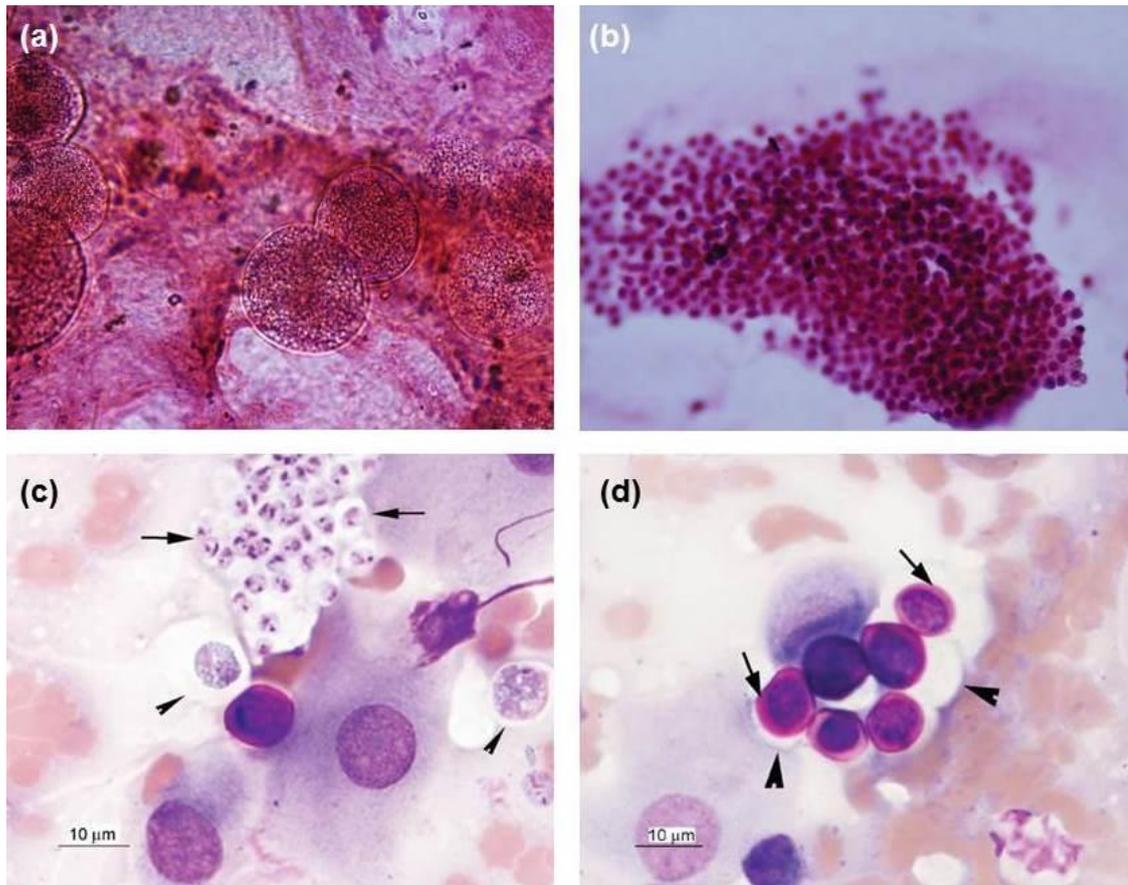
A autofluorescência dos esporângios maduros e endosporos em cortes histológicos sob a luz ultravioleta quando corados por H&E e PAS foi descrita por diversos autores (ALONSO *et al.*, 1987; MOSES *et al.*, 1991; SAVINO E MARGO, 1983; SENBA E YAMASHITA, 1985) .

2.8.3 Exame citológico

O exame citológico é utilizado com certa frequência no diagnóstico da rinosporidiose. As amostras podem ser, por exemplo, aspirados de lesões não ulceradas de sítios extra respiratórios, esfregaços do muco que recobre pólipos na via respiratória, escarro, lavado dos seios paranasais e broncoalveolar (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2013). Para a obtenção de aspirados, uma técnica econômica e confiável é a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (BHARGAVA, GROVER E MAHESHWARI, 2012; DESHPANDE, AGARWAL E KELKAR, 2008; GHORPADE, 2008; SINHA *et al.*, 2012). Diversas colorações podem ser empregadas para análise, tais como H&E, PAS, mucicarmina, prata metenamina de Gomori, Papanicolau e Giemsa (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; DESHPANDE, AGARWAL E KELKAR, 2008) (**Figura 19**). O diagnóstico é confirmado pela visualização microscópica dos esporângios em diversos estágios de desenvolvimento e endosporos; células inflamatórias estão presentes. No interior dos endosporos podem ser visualizados os CED (DESHPANDE, AGARWAL E KELKAR, 2008; GORI E SCASSO, 1994). Além disso, os endosporos são PAS positivos e, por isso, essa coloração é útil para diferenciá-los das células epiteliais nasofaringeanas que são PAS negativas (BHARGAVA, GROVER E MAHESHWARI, 2012).

Além da punção, outra técnica citológica que pode ser utilizada no diagnóstico da rinosporidiose é o imprinting de tecidos biopsados sobre lâminas posteriormente coradas com Giemsa. É possível visualizar nessas preparações células epiteliais, células inflamatórias, esporângios em diferentes estágios de desenvolvimento e endosporos livres (MEIER *et al.*, 2006) (**Figura 19**).

Figura 19 – Diagnóstico citológico da rinosporidiose.



(a) Esporângios com endosporos (PAAF; H&E 40 x); (b) endosporos isolados e células inflamatórias (PAAF; H&E 40 x); (c) um grupo de endosporos imaturos (setas), dois endosporos intermediários e um endosporo maduro eosinofílico ao centro (cabeças de setas; *imprinting*; Giemsa); (d) grupo de endosporos maduros com parede celular eosinofílica (setas) cercada por halo claro (cabeças de setas; *imprinting*; Giemsa).

Fonte:(a) e (b) Bhargava, Grover e Maheshwari (2012); (c) e (d) Meier *et al.* (2006).

2.8.4 Cultura e inoculação em animais

Diversas tentativas de cultivo em meios sintéticos e celulares, bem como a inoculação do *R. seeberi* em animais foram conduzidas sem sucesso (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Seeber (1900) inoculou o microrganismo em ratos brancos, Ingram (1910) inoculou em macacos, porcos da Índia e coelhos, Tirumurti (1914) inoculou na conjuntiva, pele e cavidade peritoneal de porcos da Índia, Wright e Cunningham (WRIGHT, 1922) inocularam nos pulmões, conjuntiva e pênis de macacos, entretanto, todos esses experimentos foram negativos.

Posteriormente novas tentativas foram feitas por vários pesquisadores com os mesmos resultados (ASHWORTH, 1923; KARUNARATNE, 1964). Karunaratne (1964) inoculou tecidos humanos infectados na conjuntiva de um coelho que desenvolveu um tumor inicial que após dois meses possuía apenas tecido fibroso e esporângios rompidos e degenerados procedentes do paciente. Mais recentemente, Arseculeratne *et al.* (2000) não conseguiram infectar camundongos imunodeficientes de células T e B.

Ashworth (1923) relata que Rettie em 1918 cultivou o microrganismo em ágar Sabouraud, mas a cultura estava contaminada e não foi possível afirmar que a colônia pertencia ao *R. seeberi*. Dhayagude (1941 apud KARUNARATNE 1964) observou que no meio Lowenstein o microrganismo foi preservado por dois meses, mas sem sinais de crescimento. Satyanarayana (1960) testou o cultivo em ovos em desenvolvimento, meios artificiais com aminoácidos, sais e vitaminas, meios com alta tensão de dióxido de carbono, meios com alta pressão de vapor aquosa e, seguindo as orientações de Rao (1938), inoculou duas amostras humanas em um meio contendo ASD, esterco de vaca, esterco de cavalo e fezes de humanos; nenhum crescimento foi observado. Reddy e Lakshminarayan (1962 apud JAIN E RAO, 1997) utilizaram ASD, ágar sangue, Lowenstein-Jensen e infusão cérebro coração e não houve crescimento. Em 1965, Datta obteve o crescimento de um fungo *Aspergillus* sp em meio contendo cenoura e também em tecido nasal de cabra *in vitro* e afirmou ser esse o agente etiológico da rinosporidiose. Grover (1969) observou o desenvolvimento de endosporos e esporângios utilizando o meio TC199 a 4°C. Posteriormente, Levy, Meuten e Breitschwerdt (1986) cultivaram o *R. seeberi* em células epiteliais de tumor retal humano e observaram que o microrganismo induzia a “proliferação” das células que se assemelhavam a estruturas polipoides. A partir do segundo subcultivo não foi observada multiplicação significativa e os subcultivos posteriores não foram bem sucedidos, assim como a inoculação em animais.

Thianprasit e Thagerngpol (1989) tentaram cultivar o *R. seeberi* em diversos meios de cultura, tais como ASD e caldo, ágar Czapek Dox e caldo, ágar fubá, ágar sangue, ágar extrato de solo 20% e caldo, soro humano, meio líquido TC 199 e não obtiveram resultados positivos. No mesmo ano, Krishnamoorthy *et al.* (1989)

afirmaram ter isolado o *R.seeberi* utilizando ágar batata dextrose com adição de ácido tartárico e incubação a 23°C. Das 25 amostras, 23 apresentaram crescimento entre 4 e 8 dias, sendo que ao exame micromorfológico foram visualizados filamentos e esporos em cachos “semelhantes” aos esporos do *R. seeberi*, mas menores do que os observados nos tecidos. Além disso, os controles apresentaram contaminação, mas segundo os autores nenhum desses crescimentos eram semelhantes ao das amostras. Kennedy, Buggage e Ajello (1995) falharam na tentativa do cultivo em meios de cultura para bactérias aeróbicas, fungos, bem como em meios contendo soro bovino fetal 10% e antibióticos. Mais recentemente, Ahluwalia (1999) utilizou o meio de cultivo BG-11 e isolou uma cianobactéria do gênero *Microcystis* que seria o verdadeiro agente etiológico da rinosporidiose. Posteriormente, Thankamani (2005) isolou em ASD a 25°C um fungo semelhante ao gênero *Synchytrium*, que após análise molecular apresentou 99% de semelhança com o fungo *Colletotrichum truncatum*.

Segundo Arseculeratne e Mendoza (2005), o que foi interpretado por alguns autores como propagação bem sucedida, na realidade, foram interpretações errôneas e até o momento não há evidências contundentes de que o *R. seeberi* possa ser cultivado.

2.8.5 Exame sorológico

Existem poucos trabalhos que avaliam os aspectos imunológicos da rinosporidiose, uma vez que o microrganismo não causa a doença em animais experimentais e não é cultivável. Este fato dificulta a obtenção de estruturas puras do *R. seeberi* livres da contaminação de células do hospedeiro, bem como a avaliação dos mecanismos imunológicos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005).

Chittravel *et al.* (1981b) avaliaram a resposta imune celular em 37 pacientes com rinosporidiose. Os autores observaram que a inibição da migração de leucócitos (IML) foi mais significativa em todos os pacientes, quando comparados ao grupo controle. Os pacientes com menos de 9 anos de evolução da doença apresentaram níveis superiores de IML, quando comparados com pacientes que exibiam a forma crônica da doença, o que poderia significar uma tolerância ou ausência de resposta imunológica nesses casos especificamente. Silva *et al.* (2001) avaliaram a resposta

imune celular na rinosporidiose por meio de testes imunohistoquímicos e avaliação da resposta linfoproliferativa dos linfócitos do sangue periférico dos pacientes frente à concavalina A e ao antígeno RhA do *R. seeberi*. O infiltrado inflamatório apresentou composição semelhante independente da forma clínica e evolução da doença, com predomínio de neutrófilos, células B CD20+, macrófagos CD68+ (alguns espumosos), numerosos linfócitos T CD3+, escassos linfócitos T CD4+, numerosos linfócitos T CD8+ e alguns linfócitos NK CD56/57+ ao redor dos esporângios maduros. Em relação à resposta linfoproliferativa, os pacientes apresentaram resposta normal frente à concavalina A e diminuída frente ao antígeno (Ag) RhA, o que poderia indicar uma resposta supressora Ag-dependente na doença, sendo que não foi identificada diferença considerando duração da doença e apresentação clínica.

A resposta humoral foi avaliada por Chitravel *et al.* (1982 apud THIANPRASIT E THANGERNGPOL, 1989), que utilizaram o soro de 69 pacientes na tentativa de detectar anticorpos (Ac) e Ag circulantes por meio da contraímunoeletroforese e imunodifusão em ágar. Os autores não detectaram Ac no soro dos pacientes, mas um Ag circulante foi detectado. Posteriormente, Herr *et al.* (1999a) identificaram um Ag aparentemente imunodominante que foi reconhecido por Ac presentes no soro de dois pacientes. Esse Ag é encontrado apenas na camada interna do esporângio maduro em desenvolvimento, o que explicaria a falha de Chitravel *et al.* (1982) ao tentar detectar Ac no soro de pacientes utilizando endosporos como Ag. Esta foi a primeira vez que Ac anti-*R. seeberi* foram identificados. Arseculeratne *et al.* (2004) utilizaram extratos de endosporos e esporângios e identificaram Ac anti-*R. seeberi* IgG, IgM e IgA no soro de pacientes e pessoas assintomáticas que vivem nas áreas endêmicas. Esses Ac não parecem ser protetivos, uma vez que títulos elevados foram encontrados tanto em pacientes com lesões únicas como naqueles com lesões múltiplas, recorrentes ou crônicas disseminadas.

2.8.6 Biologia Molecular

O uso de técnicas moleculares foi fundamental para o estudo taxonômico do *R. seeberi*. Os estudos de Herr *et al.* (1999b) e, posteriormente Fredricks *et al.* (2000) utilizando a amplificação por PCR e sequenciamento do gene 18S SSU rRNA do *R.*

seeberi ratificaram a íntima relação filogenética entre este microrganismo e um grupo de patógenos protistas de animais aquáticos (SILVA *et al.*, 2005). As sequências amplificadas por esses pesquisadores eram praticamente idênticas entre diferentes hospedeiros mamíferos com rinosporidiose e, até o momento, considerava-se que o gênero *Rhinosporidium* seria monotípico. Entretanto, em um estudo filogenético conduzido por Silva *et al.* (2005) foi avaliada a sequência completa dos ITS1, 5.8S e ITS2 de oito amostras humanas, duas de cisnes e uma de cão. Os autores encontraram diferenças significativas entre as sequências de cada espécie, o que possibilita uma nova abordagem.

Fredricks *et al.* (2000) desenvolveram primers específicos para o *R. seeberi* (rhino-fw e rhino-rev) que podem ser utilizados para a identificação do microrganismo em amostras clínicas e ambientais. De fato, tais primers foram utilizados posteriormente com sucesso em outros estudos com o objetivo de diagnosticar o *R. seeberi* em diferentes amostras de mamíferos (BURGESS *et al.*, 2012; SAHA *et al.*, 2002; SUDASINGHE *et al.*, 2011).

2.8.7 Diagnósticos diferenciais

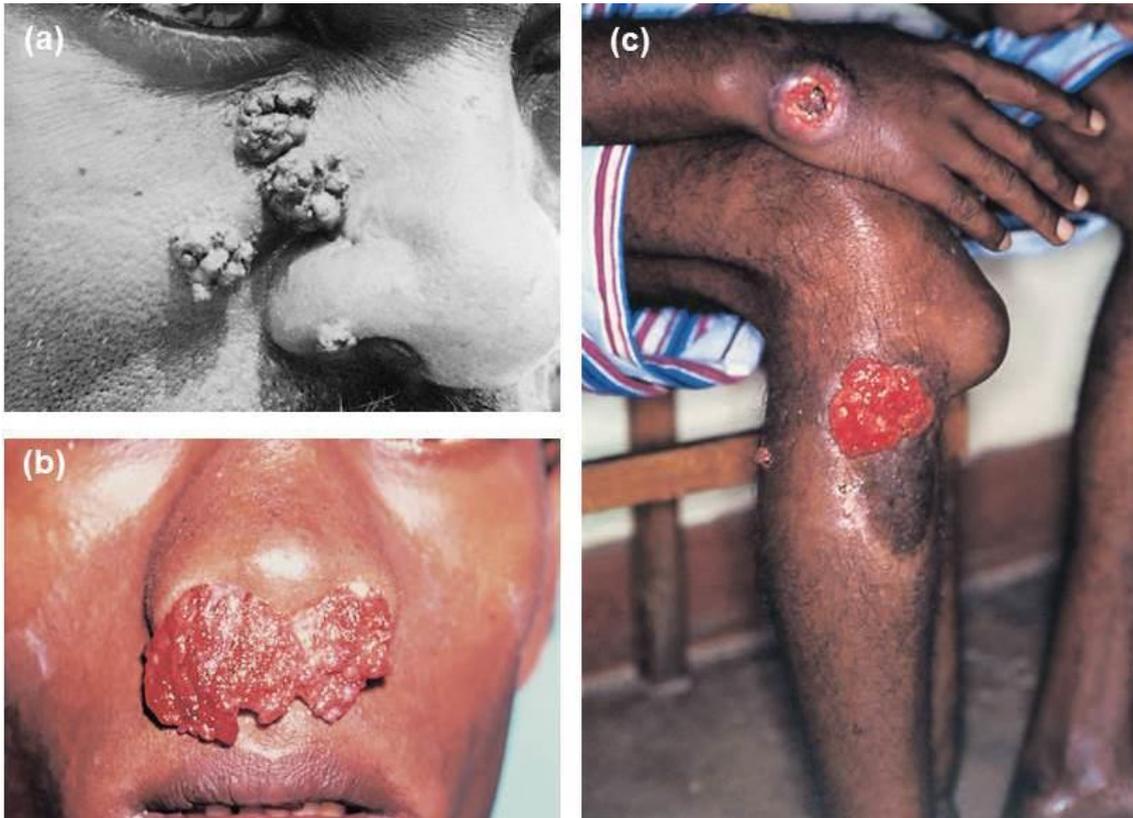
O diagnóstico clínico da rinosporidiose é difícil porque as lesões são semelhantes a diversas doenças infecciosas e não infecciosas. Porém, a análise epidemiológica, em alguns casos, pode ajudar a excluir a possibilidade de rinosporidiose.

A rinosporidiose apresenta uma enorme diversidade de formas clínicas. A literatura permite a seguinte descrição: lesões retais - assemelham-se a hemorroidas e pólipos (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005). Lesões nasais: assemelham-se a carcinoma papilar, rinite hipertrófica, pólipo antrocoanal, papiloma invertido, angiofibroma e pólipos benignos (BHARGAVA, GROVER E MAHESHWARI, 2012; CROSARA *et al.*, 2009; FRANÇA Jr. *et al.*, 1994). Lesões oculares: assemelham-se ao papiloma escamoso da conjuntiva, cisto conjuntival, estafiloma ciliar, ceratite periférica (GICHUHI *et al.*, 2014), conjuntivite folicular crônica (SUH *et al.*, 2009), calázio recorrente (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012), hemangioma (VÉLEZ, SALAZAR E MONSALVE, 2011), escleromalácia perforans (DE DONCKER *et al.*, 1990), pterígio ou mucocele do saco lacrimal. Lesões genitais: lesões penianas e

uretrais assemelham-se a carcinoma epidermoide e condilomas. Lesões disseminadas: podem parecer fibromas, angiofibromas, verruga vulgar (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005) e sarcomas de partes moles (HOUREIH *et al.*, 2006). Lesões ósseas e articulares: podem ser confundidas com condrosarcoma, tumor de células gigantes e tuberculose (AMRITANAND *et al.*, 2008; SURYAWANSHI *et al.*, 2011) (**Figura 20**).

Dentre as doenças infecciosas dependendo do sítio e aspecto da lesão é preciso descartar criptococose (ALONSO *et al.*, 1987), sinusite fúngica (CROSARA *et al.*, 2009), histoplasmose, blastomicose, paracoccidiodomicose (GORI E SCASSO, 1994), rinoscleroma, cromoblastomicose, leishmaniose (**Figura 20**), hanseníase (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005) e infecções causadas por *Chrysosporium (Emmonsia) parvum* var. *parvum* e *crecens* (ALONSO *et al.*, 1987; ANSTEAD, SUTTON E GRAYBILL, 2012; KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995). Os agentes etiológicos dessas doenças podem ser cultivados *in vitro* (com a exceção do *Mycobacterium leprae*), inoculados com sucesso em animais experimentais e possuem características morfológicas e tintoriais diferentes do *R. seeberi* (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005).

Figura 20 – Diagnósticos diferenciais da rinosporidiose.



(a) Paciente com rinosporidiose cutânea semelhante a verrugas; (b) rinosporidiose nasal semelhante à leishmaniose cutânea; (c) lesão na tíbia semelhante a um tumor maligno.

Fonte: (a), (b) e (c) Arseculeratne e Mendoza (2005).

No exame direto, o *R. seeberi* apresenta esporângios acastanhados, com diâmetro entre 30 e 300 μm preenchidos com endosporos arredondados. Conhecendo estas características é possível diferenciá-lo da forma esférica do *Coccidioides immitis*, encontrada no tecido do hospedeiro. O gênero *Coccidioides* é o único microrganismo que dentre todas as doenças infecciosas citadas apresenta micromorfologia mais próxima à do *R. seeberi*. Entretanto, possui esporângios incolores e refringentes com diâmetro entre 30 e 60 μm preenchidos com endosporos ovais, achatados e menos numerosos (GORI E SCASSO, 1994). Além disso, o *C. immitis* pode ser cultivado em ASD, bem como infecta animais experimentais (ALONSO *et al.*, 1987) e seus esporângios não se coram com mucicarmina. Já *R. seeberi*, apresenta camada interna da parede dos esporângios mucicarmina positiva (BHARGAVA, GROVER E MAHESHWARI, 2012; GUARNER E BRANDT, 2011).

2.9 Tratamento

A regressão espontânea das lesões é rara, mas já foi observada em humanos (ALLEN E DAVE, 1936; KARUNARATNE, 1964) e cisnes (KENNEDY, BUGGAGE E AJELLO, 1995). A excisão cirúrgica dos pólipos associada à cauterização da base das lesões para prevenir ou minimizar a recorrência é o principal tratamento da rinosporidiose (MUKHERJEE *et al.*, 2013; SAHA *et al.*, 2011). Existem diversos relatos de recorrência das lesões após o tratamento (KARUNARATNE, 1964; SATYANARAYANA, 1960) e os pacientes precisam ser submetidos novamente a cirurgias. O número de recorrências por paciente pode ser elevado. Para exemplificar, a literatura descreve o caso de um paciente indiano que foi operado 49 vezes (CHITRAVEL *et al.*, 1981a); o intervalo entre as recorrências pode diminuir ao longo do tempo ou a doença pode se tornar mais exacerbada a cada operação (ALLEN E DAVE, 1936; SATYANARAYANA, 1960). Algumas hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a recorrência das lesões. Segundo Arseculeratne e Mendoza (2005), a excisão de pólipos pediculados tende a ser mais fácil e completa levando a um menor número de recorrências, enquanto pólipos sésseis podem ser extraídos incompletamente resultando na disseminação dos endosporos. Isso justifica o acometimento das mucosas adjacentes e, conseqüentemente, maior número de recorrências. Karunaratne (1964) também observou que o trauma causado por repetidas cirurgias poderia ser um fator predisponente para o surgimento de novas lesões.

O uso do laser fosfato de potássio titanilo (KTP)/532 para a excisão dos pólipos apresenta vantagens em relação à técnica tradicional de excisão diatérmica. A taxa de recorrência, após a excisão por laser, tem apresentado resultados promissores. O laser permite o mínimo contato com a lesão o que evita a disseminação de esporos para mucosa adjacente. Esta técnica não é amplamente utilizada devido ao alto custo do equipamento (KAMESWARAN *et al.*, 2005; PRAKASH *et al.*, 2009; SAHA *et al.*, 2011).

Diversos agentes antimicrobianos, tais como compostos de antimônio, bismuto, iodo e pentamidina, bem como anfotericina B, griseofulvina, esteroides tópicos, 5-fluorocitosina, iodeto de potássio, cetoconazol, hidrocloreto de quinina, paludrine,

antibióticos, tratamento com raio X e ionização foram utilizados sem nenhum sucesso (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; SATYANARAYANA, 1960). Allen e Dave (1936) relatam o sucesso da terapia com injeções locais de neostibosan (composto antimônio pentavalente) associado à remoção cirúrgica na prevenção de recorrências em alguns casos de rinosporidiose nasal, entretanto, também houve pacientes que utilizaram o medicamento e apresentaram recidivas.

Atualmente, o único medicamento amplamente aceito como adjuvante no tratamento da rinosporidise, com o objetivo de prevenir e/ou diminuir a recorrência das lesões é a dapsona (ARSECULERATNE E MENDOZA, 2005; PRAKASH *et al.*, 2009). A dosagem de 100 mg/dia administrada por via oral é a mais utilizada e o período de tratamento após a cirurgia pode variar entre 3 meses a 2 anos (LAXMISHA E THAPPA, 2005; LOH *et al.*, 2001; MUKHERJEE *et al.*, 2013; NATH *et al.*, 2009; SHETTY E MOHAN, 2013; WATVE *et al.*, 2006). A redução da recidiva das lesões com o uso da dapsona é atribuída à sua capacidade de impedir a maturação dos esporângios, acelerar o processo de degeneração destes e promover acentuada resposta inflamatória com fibrose e consequente redução da vascularização da lesão (JOB *et al.* 1993; MITHAL, AGARWAL E MITHAL, 2012; MUKHERJEE *et al.*, 2013; NERUKAR *et al.*, 2004).

2.10 Microscopia confocal

No presente estudo, foi utilizada a microscopia confocal para ajudar a desvendar os mistérios que ainda pairam sobre o *R. seeberi*.

A microscopia confocal foi idealizada em 1955 por Marvin Minsky, na época um pós-doutorando de Harvard, que tentava visualizar interconexões entre as células neurais. O grande número de células presentes na amostra corada aliadas à grande quantidade de luz dispersa por essas células no campo de visão resultavam em uma imagem turva. Portanto, não era possível distinguir individualmente as células ao microscópio ótico convencional (DEAN, 2001; MINSKY, 1957, 1988). O microscópio confocal cria imagens nítidas através da exclusão da luz proveniente da amostra que não está no plano focal do aparelho. Dessa forma, reduz-se o *background* e, assim, a turvação diminui e o contraste da imagem melhora. Além de aumentar a resolução

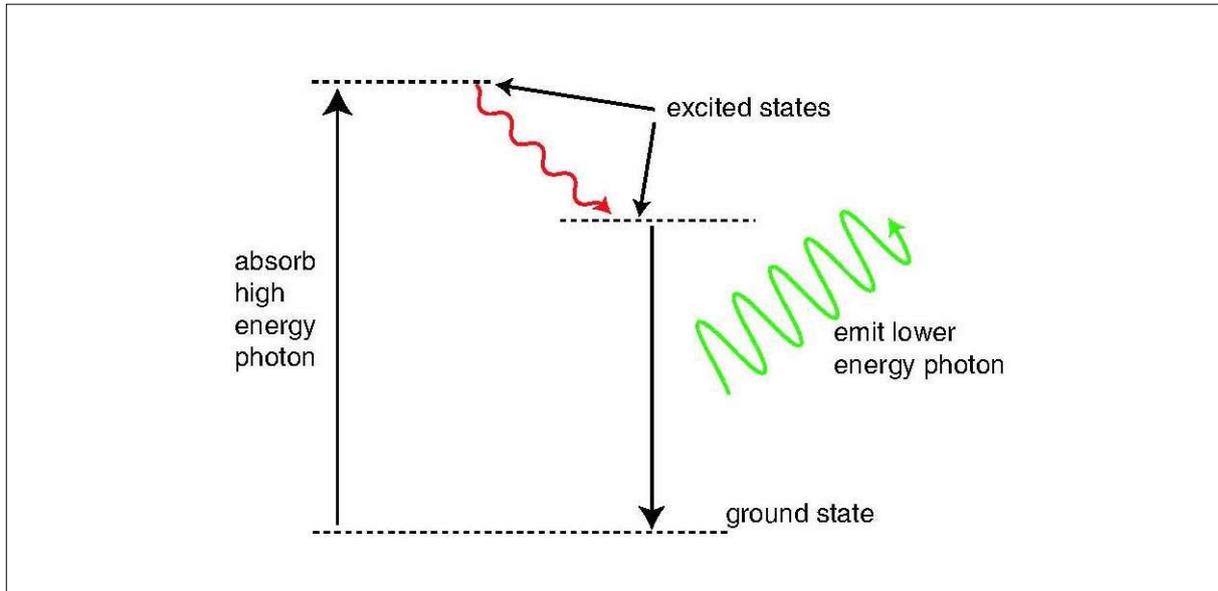
dos pequenos detalhes, o microscópio confocal permite a reconstrução tridimensional da amostra através do “empilhamento” das secções óticas obtidas ao longo do eixo vertical. A maioria dos microscópios confocais proporciona imagens tanto através da luz refletida pela amostra quanto pela fluorescência estimulada a partir de fluorocromos. A microscopia confocal por fluorescência é o modo mais utilizado para análises biológicas (SEMWOGERERE E WEEKS, 2008).

Para esclarecer a diferença entre o microscópio confocal e o microscópio de epifluorescência convencional, bem como proporcionar uma visão geral dos princípios da microscopia confocal, faremos uma abordagem resumida da tecnologia envolvida em cada microscopia referida acima.

2.10.1 Microscópio de fluorescência

A fluorescência é o fenômeno no qual uma molécula no estado excitado perde energia no formato de luz. Quando uma molécula no estado fundamental (baixa energia) absorve um fóton de luz, um elétron é promovido para um estado excitado (maior energia). Normalmente, a molécula tende a dissipar uma parte dessa energia absorvida e, assim, o elétron pula para um nível um pouco mais baixo de energia em relação ao anterior, sendo que nesse processo não há emissão de luz. Entretanto, se as moléculas vizinhas não são capazes de receber a quantidade de energia necessária para que a molécula excitada retorne ao estado fundamental, essa molécula emite espontaneamente luz com um comprimento de onda diferente da luz excitatória (**Figura 21**). O comprimento de onda (λ) da luz excitatória e a cor da luz emitida dependem do fluorocromo utilizado (SEMWOGERERE E WEEKS, 2008).

Figura 21 – Mecanismo da fluorescência.

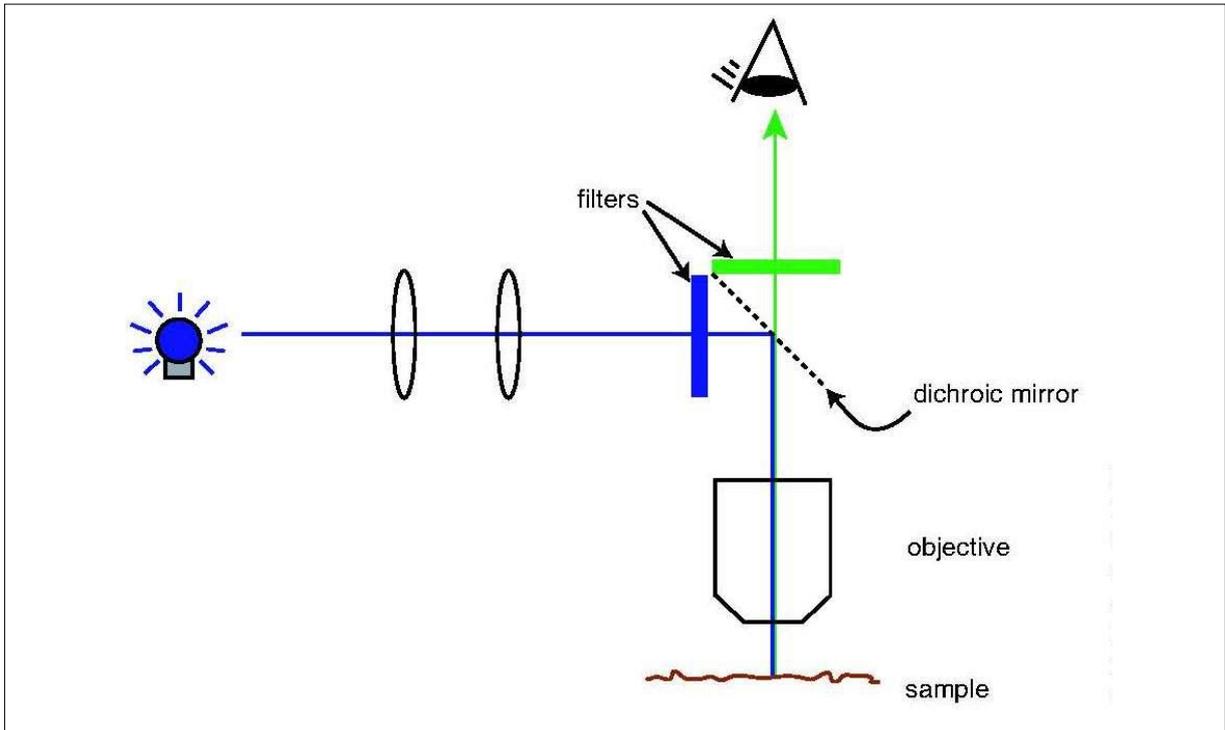


As linhas horizontais pontilhadas indicam os níveis de energia da molécula. A molécula é excitada por um fóton e atinge um nível de energia mais alto, sendo que uma parte dessa energia é perdida através da colisão com outras moléculas (seta vermelha) e o restante é emitida em forma de luz (seta verde).

Fonte: Semwogerere e Weeks (2008).

Na microscopia de fluorescência convencional, a amostra marcada com um determinado fluorocromo é iluminada por uma luz ultravioleta (UV) com um comprimento de onda específico e a imagem é obtida através da luz emitida. O microscópio de fluorescência (**Figura 22**) contém um espelho dicróico, o qual possui a propriedade de refletir qualquer luz com um λ menor do que um comprimento de onda específico e transmitir luz com um λ maior do que esse determinado comprimento. Dessa forma, a luz proveniente da fonte de luz é refletida (λ curto) e a luz emitida pelo fluorocromo é transmitida (λ longo) pela lente objetiva e pelo espelho (SEMWOGERERE E WEEKS, 2008).

Figura 22 – Microscópio de epifluorescência convencional.



A fonte de luz é refletida pelo espelho dicróico, atravessa a objetiva e atinge a amostra. Os fluorocromos emitem luz fluorescente com um comprimento de onda maior do que a luz incidente atravessando, assim a objetiva e o espelho, e sendo observada através das lentes oculares.

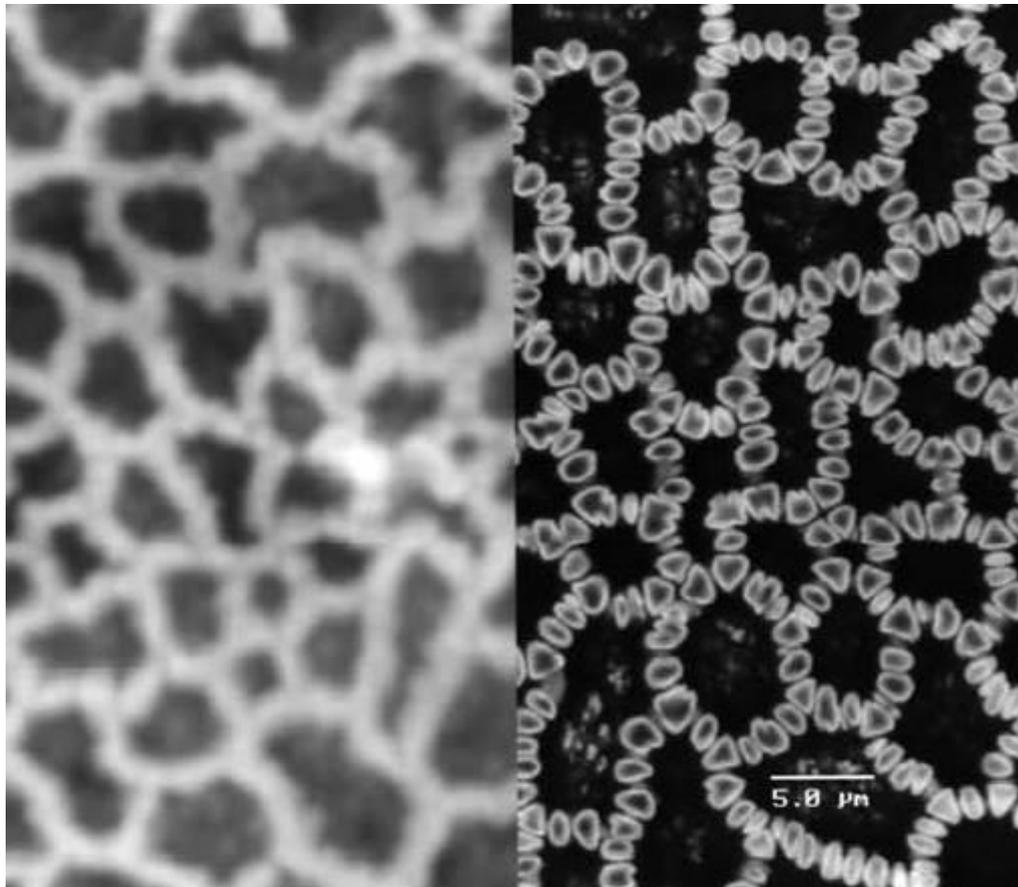
Fonte: Semwogerere e Weeks (2008).

A microscopia de fluorescência pode apresentar maior sensibilidade do que a microscopia por luz refletida ou transmitida. Essa técnica permite a visualização de estruturas específicas da amostra ao invés da amostra inteira, bem como permite o uso de mais de um tipo de fluorocromo para visualizar estruturas distintas numa mesma análise (SEMWOGERERE E WEEKS, 2008).

Contudo, na microscopia de fluorescência, qualquer fluorocromo ligado à amostra situado acima ou abaixo do plano focal também é estimulado e emite luz fluorescente captada pelo detector. A soma da luz proveniente de estruturas no plano focal e fora dele, bem como a autofluorescência resultam em uma imagem turva e com baixa resolução dos detalhes, de modo que certas estruturas marcadas por imunofluorescência podem ser visualizadas olhando-se diretamente no microscópio, mas não é possível documentá-las. Semelhantemente, na microscopia

convencional, a luz atravessa o objeto e é distribuída pelo campo de visão da maneira mais uniforme possível, sendo que se a amostra for mais espessa que o foco da lente objetiva a luz proveniente de estruturas abaixo ou acima do plano em foco também será captada pelo detector. A microscopia confocal foi delineada para resolver esse problema, uma vez que apenas um ponto muito específico é detectado por vez, ao invés do campo inteiro. Dessa forma, não existe a interferência da luz de pontos vizinhos e é possível obter imagens digitais de alta resolução (**Figura 23**) em amostras espessas (DEAN, 2001; PADDOCK, 1999).

Figura 23 – Grão de pólen marcado com laranja de acridina.



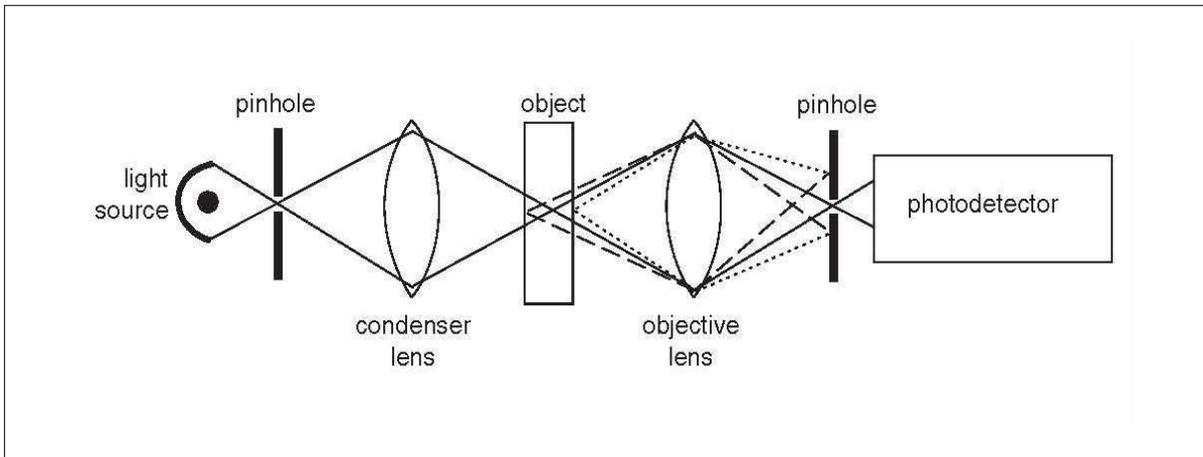
A imagem da esquerda foi obtida com um pinhole de diâmetro igual a 1600 μm, para simular a performance de um microscópio não confocal. A imagem da direita foi obtida com um pinhole de diâmetro igual a 40 μm, o que resultou numa maior resolução da imagem.

Fonte: Dean (2001).

2.10.2 O primeiro microscópio confocal

O microscópio projetado por Minsky (**Figura 24**), patenteado em 1957, é o modelo mais simples dentre os microscópios confocais e possui uma lâmpada de zircônio como fonte de luz, a qual é focada em direção a um pinhole, que é uma pequena abertura circular por onde a luz irá passar. A luz que atravessa o pinhole incide sobre uma lente condensadora que foca o feixe proveniente do pinhole num ponto específico do objeto. Em seguida, a lente objetiva forma a imagem desse ponto na direção de um segundo pinhole localizado em frente a um fotodetector. Os dois pinholes e o ponto específico do objeto (ponto focal da lente objetiva) são confocais, sendo que qualquer outro ponto que não estiver no mesmo foco dos pinholes não será efetivamente iluminado. Além disso, a maior parte da luz dispersa pelo objeto não passará pela abertura do segundo pinhole. A formação da imagem, portanto, é ponto a ponto e, para obter uma imagem completa do objeto, Minsky utilizou um sistema de escaneamento chamado *stage-scanning*, no qual o feixe de luz é estacionário e a mesa do microscópio móvel e, assim, o objeto é deslocado linha a linha num padrão retangular xy. O *stage-scanning* possui como vantagem o fato de que apenas o eixo central da lente objetiva é utilizado, o que reduz as aberrações de lentes. Além disso, todos os pontos da imagem tem propriedades ótica idênticas e a ampliação da imagem pode ser realizada sem a mudança das lentes, uma vez que o campo de análise é limitado apenas pela amplitude do movimento da mesa (DEAN, 2001; MINSKY, 1957; PADDOCK, 1999). A principal desvantagem do *stage-scanning* é o grande tempo requerido para escanear toda a amostra e gerar as imagens (DEAN, 2001). Apesar de ter utilizado duas lentes no seu modelo, Minsky percebeu que o sistema também funcionaria caso utilizasse apenas uma lente objetiva operando em um modo de luz refletida (a luz da fonte luminosa e a luz refletida da amostra passam pela mesma lente), sendo que tal sistema é o utilizado atualmente em todos os microscópios confocais de escaneamento a lasers comerciais (LEIVA-GARCÍA, GARCÍA-ANTÓN E MUÑOZ-PORTERO, 2011; MINSKY, 1988).

Figura 24 – Microscópio confocal projetado por Minsky.



A lente condensadora incide a luz que atravessa o pinhole sobre um ponto da amostra. As lentes objetivas formam a imagem através do segundo pinhole. Os pinholes e os pontos focais das lentes são confocais.

Fonte: Dean (2001).

Inicialmente, a invenção de Minsky não ganhou muita atenção porque a qualidade da imagem obtida não era boa. Uma imagem real não era formada no protótipo original; a saída do fotodetector era traduzida para uma imagem da região de interesse. A imagem era construída em cima da tela de um osciloscópio militar excedente de longa persistência sem nenhum recurso para cópia impressa ou em computador. Minsky afirmou posteriormente que a qualidade da imagem no seu microscópio não era muito impressionante devido à baixa performance do osciloscópio e não devido à falta de resolução do microscópio (LEIVA-GARCÍA, GARCÍA-ANTÓN E MUÑOZ-PORTERO, 2011; MINSKY, 1988; PADDOCK, 2000). Outros fatores limitantes eram a inexistência na época de fontes de luz intensas como o laser e ausência de computadores potentes para armazenar grande quantidade de dados (LEIVA-GARCÍA, GARCÍA-ANTÓN E MUÑOZ-PORTERO, 2011).

2.10.3 Microscópio confocal de escaneamento a laser

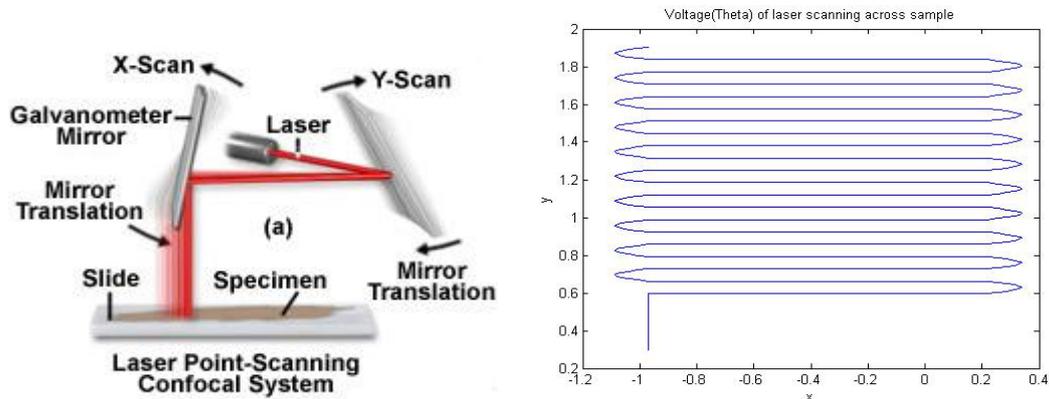
Com os avanços na área da computação, o desenvolvimento da tecnologia dos lasers e aquisição de imagens digitais, a microscopia confocal passou a ser

amplamente utilizada em vários campos, destacando-se aqui a biologia (LEIVA-GARCÍA, GARCÍA-ANTÓN E MUÑOZ-PORTERO, 2011).

Os microscópios confocais de escaneamento a laser (MCEL) surgiram no final da década de 80 e, com a disponibilidade de lasers com preços acessíveis e sistemas de imagem de boa qualidade, a produção comercial desses equipamentos tornou-se mais prática (PADDOCK, 1999). A introdução do laser, particularmente, ofereceu vantagens para a microscopia confocal quando comparado a outras fontes de luz. Cada tipo de laser produz luz em apenas um ou em poucos comprimentos de onda bem definidos (monocromático), sendo que a luz apresenta coerência temporal e espacial. Coerência espacial significa a luz na qual as ondas tem a mesma frequência, direção e ângulo de polarização; coerência temporal faz referência à luz que possui ondas exatamente na mesma fase e velocidade. Além disso, os lasers possuem brilho extremamente intenso, baixa divergência do feixe, baixo ruído e podem ser focados em áreas muito pequenas (BRELJE, WESSENDORF E SORENSON, 1993; LEIVA-GARCÍA, GARCÍA-ANTÓN E MUÑOZ-PORTERO, 2011).

Os MCEL possuem um sistema de escaneamento chamado *beam-scanning*, o qual atua de forma oposta ao do protótipo projetado por Minsky, ou seja, a amostra é estacionária e o feixe do laser é móvel. O *beam-scanning* é considerado mais adequado para a maioria das análises biológicas, se comparado ao *stage-scanning*, pois o tempo de aquisição das imagens é mais rápido (1 frame/s contra 1 frame/10s do *stage-scanning*). Outra vantagem desse sistema é que os artefatos de vibração são atenuados, uma vez que a amostra não é movida (PADDOCK, 1999). No *beam-scanning* o laser é direcionado por um par de espelhos galvanométricos, sendo que um dos espelhos movimenta o laser de um lado a outro da amostra na direção x e o outro movimenta o laser na direção y para permitir o escaneamento de uma segunda linha na direção x (**Figura 25**). Esse processo continua até que a imagem de uma fatia da amostra é formada (secção ótica), de modo que se o plano focal for alterado e o processo de escaneamento repetido, é possível formar a imagem de várias secções da amostra em intervalos de tempo regulares e, por fim, unificar essas imagens construindo uma imagem final tridimensional (**Figura 26**) (DEAN, 2001; SEMWOGERERE E WEEKS, 2008).

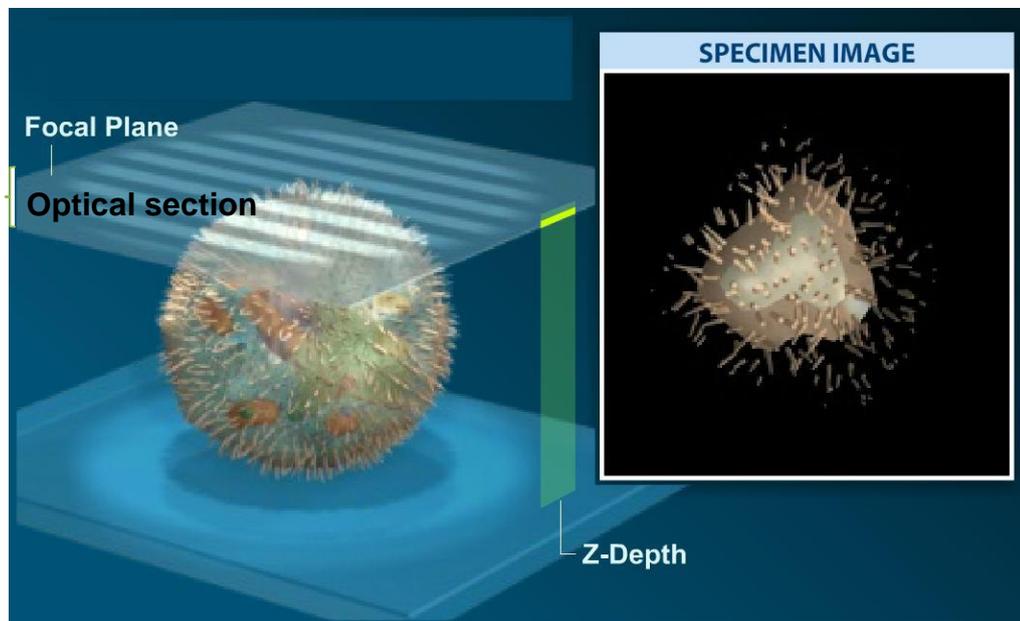
Figura 25 – Beam-scanning.



A imagem da esquerda ilustra o sistema de beam-scanning composto pelos dois espelhos galvanométricos que efetuam movimentos na direção xy. A imagem da direita ilustra o caminho percorrido pelo laser durante o escaneamento de uma secção ótica.

Fonte: MICRON OXFORD – Confocal microscopy; lecture 8. Disponível em: < http://www.micron.ox.ac.uk/microngroup/resources/Lecture_08_confocal.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.

Figura 26 – Construção de uma imagem tridimensional.

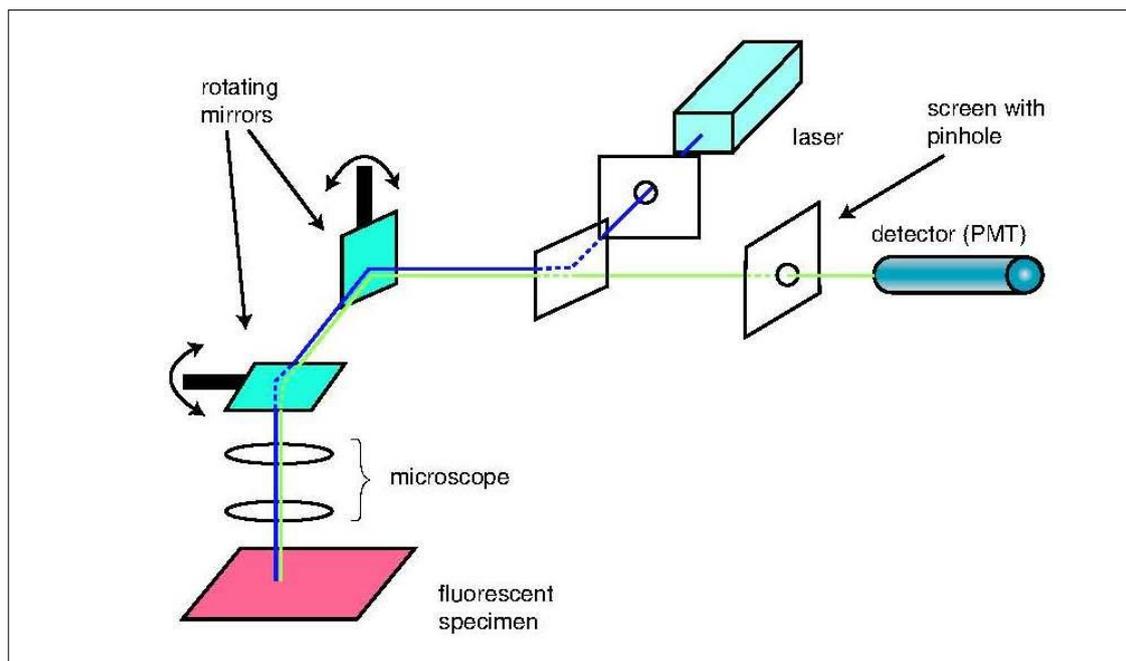


As secções óticas obtidas ao longo do eixo z podem ser unificadas formando uma imagem tridimensional da amostra. Fonte: MICRON OXFORD – Confocal microscopy; lecture 8.

Fonte: Disponível em: < http://www.micron.ox.ac.uk/microngroup/resources/Lecture_08_confocal.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.

Um ou mais lasers podem compor o sistema do MCEL. O feixe de luz passa por um primeiro pinhole, é refletido por um espelho dicróico e, em seguida, atinge os espelhos galvanométricos que realizam o escaneamento da amostra. O feixe que retorna da amostra passa novamente pelos espelhos galvanométricos e atravessa o espelho dicróico atingindo, assim o segundo pinhole localizado em frente ao tubo fotomultiplicador (**Figura 27**) (SEMWOGERERE E WEEKS, 2008). Hoje existem MCEL equipados com três tubos fotomultiplicadores, cada um com um pinhole posicionado em frente a ele, o que possibilita que a formação de três imagens simultâneas e é útil para a análise de amostras marcados com três fluorocromos. O caminho da luz nesses equipamentos foi projetado para que o sinal emitido por cada fluorocromo atinja separadamente um dos detectores (PADDOCK, 1999).

Figura 27 – Configuração básica de um microscópio confocal.

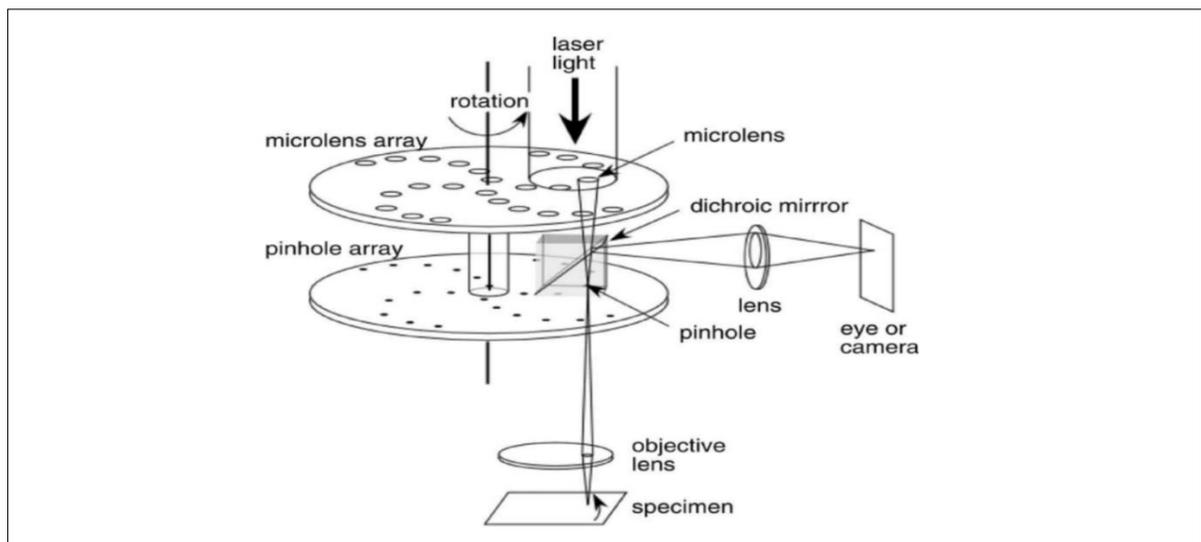


Fonte: Semwogerere e Weeks (2008).

Tanto o *stage-scanning* quanto o *beam-scanning* são sistemas de escaneamento de feixe único e possuem como desvantagens em comum o problema do *photobleaching* (destruição da fluorescência causada pela própria incidência do laser) e a impossibilidade de formar imagens em tempo real (a taxas de vídeo). Existe, porém, uma terceira forma chamada *scanning disk*, que permite a aquisição de imagens em tempo real e reduz a ocorrência do *photobleaching*. O *scanning disk*

consiste num escaneamento por múltiplos feixes que utiliza um disco giratório, também conhecido como disco Nipkow, cuja taxa de rotação está entre 1800 a 5000 rotações por minuto. O disco giratório contém 20.000 ou mais pinholes com aproximadamente 30 μm de diâmetro organizados em espirais intercaladas, sendo que a luz atravessa o disco e ilumina simultaneamente vários pontos pequenos da amostra. Posteriormente a luz retorna pelos mesmos pinholes e a imagem é capturada utilizando câmeras como as do tipo CCD (*charge-coupled device*) numa taxa de 30 frames/s até 1000 frames/s. Um sensor CCD é composto por células fotoelétricas que capturam a luz incidente e formam a imagem. Nos modelos atuais, o disco giratório é acoplado a outro disco giratório coaxial que contém microlentes, cuja função é conduzir de forma eficiente o feixe de luz através dos pinholes (**Figura 28**). A desvantagem do disco giratório é que apenas uma fração pequena na luz proveniente da fonte consegue atravessar os pinholes e atingir a amostra, o que pode ser um problema para a análise por fluorescência, mas não para a análise por luz refletida. Esse problema, porém, foi minimizado com a adição do disco de microlentes, que permite que uma quantidade maior de luz passe pelos pinholes (DEAN, 2001; GRÄF, RIETDORF E ZIMMERMANN, 2005; NAKANO, 2002; SEMWOGERERE E WEEKS, 2008).

Figura 28 – Escaneamento por disco giratório acoplado a sistema de microlentes.



Fonte: Nakano (2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o ciclo de vida e o ciclo nuclear do *R. seeberi* utilizando marcadores específicos para estruturas nucleares presentes no ciclo mitótico de eucariotos.

3.2 Específicos

1. Identificar o DNA nuclear do *R. seeberi* utilizando 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).
2. Identificar os filamentos de actina nuclear do *R. seeberi* utilizando faloidina marcada com tetrametilrodamina (TRITC).
3. Comparar os dados obtidos por meio da microscopia confocal com dados da microscopia convencional (lâminas coradas com hematoxilina e eosina).
4. Correlacionar os dados obtidos no presente estudo com os dados de estudos anteriores sobre o ciclo de vida e ciclo nuclear do *R. seeberi*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

4.1.1 Origem das amostras utilizadas no estudo

Foi utilizado um total de 4 biópsias fixadas em formalina e posteriormente embebidas em parafina. As amostras foram coletadas de um pólipó nasal retirado de um gato, um pólipó nasal retirado de um cavalo e um pólipó cutâneo retirado de um cão, provenientes dos Estados Unidos da América (EUA). A quarta amostra era um pólipó nasal humano proveniente da Índia. As amostras do cavalo, gato, cão e humano foram coletadas e fixadas nos blocos de parafina há, respectivamente, 5, 10, 10 e 20 anos. As amostras nesse estudo também foram estudadas por Mendoza e Vilela (2013) e pertencem à coleção de tecidos depositados no Departamento de Biomedical Laboratory Diagnostic da Michigan State University (EUA).

4.1.2 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 32531314.9.0000.5149).

4.2 Preparo dos blocos para confeccionar as lâminas

Os blocos de parafina foram preparados de acordo com protocolo de rotina (CAPUTO, GITIRANA E MANSO, 2010). Em resumo, as amostras coletadas para biópsia foram embebidas em formalina neutra tamponada 10% durante 24 a 48 horas e, em seguida, desidratadas com álcool etílico e clarificadas com xileno. Após esse processo, os tecidos foram embebidos em parafina e cortados, com o auxílio de um micrótomo, em finos cortes de 5 µm de espessura. Para cada amostra foram preparadas seis lâminas, sendo que a primeira lâmina de cada amostra foi corada com H&E para a localização dos fenótipos do *R. seeberi* e as restantes foram marcadas com reagentes fluorescentes específicos e, subsequentemente, analisadas utilizando microscopia confocal.

4.3 Critérios para definição das marcações e fluorocromos utilizados

Foram selecionados reagentes fluorescentes específicos para detectar as estruturas de interesse, a saber: DNA e filamentos de actina. Os marcadores fluorescentes utilizadas neste estudo são produzidas comercialmente pela Life Technologies™ (Carlsbad, EUA) e amplamente conhecidas como marcadores estandarizados (*ready probes*). Como o próprio nome indica, estes reagentes são utilizados diretamente no material em estudo, de tal forma que, os protocolos de marcação possuem apenas uma etapa, o que torna o processo mais simples e reduz a possibilidade de erros.

De acordo com os objetivos do estudo, dois marcadores prontos foram avaliados: 1) DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), comercialmente conhecido como NucBlue® Fixed Cell Ready Probes® Reagent (Life Technologies™, Carlsbad, EUA; REF R37606, Lote nº1652394), com alta afinidade pelo DNA de dupla fita; e 2) o reagente ActinRed™ 555 Ready Probes® Reagent (Life Technologies™, Carlsbad, EUA; REF R37112, Lote nº 1646656), um marcador fluorescente que se baseia na afinidade que a faloidina tem pelas moléculas de actina (CRUZ E POLLARD, 1994; DELLINGER E GÈZE, 2001).

4.3.1 NucBlue® Fixed Cell Ready Probes® Reagent

O DAPI (NucBlue® Fixed Cell Ready Probes® Reagent – Life Technologies™, Carlsbad, EUA) é uma formulação líquida estável a temperatura ambiente. Este marcador fluorescente é utilizado frequentemente para a identificação do núcleo de células viáveis ou fixadas em formalina, uma vez que possui alta afinidade, principalmente, por regiões do sulco menor do DNA ricas em A-T (DELLINGER E GÈZE, 2001; KUBOTA, Y., KUBOTA, K. E TANI, 2000; WILSON *et al.*, 1990). O DAPI possui excitação máxima em torno de 360 nm, mas pode ser excitado pelo laser diodo no comprimento de onda de 405 nm (azul) e detectado pelo filtro de emissão na faixa de 425-475 nm, uma vez que a emissão máxima do DAPI é 460 nm.

4.3.2 ActinRed™ 555 Ready Probes® Reagent

O reagente ActinRed™ 555 Ready Probes® Reagent (Life Technologies™, Carlsbad, EUA) contém faloidina conjugada ao fluorocromo vermelho-alaranjado tetrametilrodamina (TRITC) e é estável à temperatura ambiente. A faloidina é um peptídeo bicíclico produzido pelo basidiomiceto *Amanita phalloides*, que apresenta alta afinidade à F-actina de diferentes espécies de animais, fungos, plantas e protistas (CRUZ E POLLARD, 1994). O reagente possui excitação máxima em torno de 540 nm, mas pode ser excitado pelo laser de estado sólido no comprimento de onda de 559 nm (vermelho) e detectado pelo filtro de emissão na faixa de 575-675 nm, uma vez que a emissão máxima do TRITC é 565 nm.

4.4 Critérios para selecionar as lâminas a serem marcadas

Lâminas de 16 amostras provenientes de humanos e animais coradas com H&E previamente utilizadas por Mendoza e Vilela (2013) foram reanalisadas para visualização das estruturas do *R. seeberi* presentes. Em 4 dessas amostras foi observada uma maior diversidade de esporângios em vários estágios de maturação e, por isso, foram selecionadas para serem avaliadas. Estas amostras se caracterizaram por conterem grande quantidade de endosporos (estruturas esféricas pequenas com diâmetro entre 4-12 µm mostrando vesículas avermelhadas dentro do esporângio maduro), esporângios juvenis (estruturas esféricas com diâmetro entre 10-70 µm, parede celular fina e, em alguns casos, núcleo central), intermediários (estruturas com diâmetro entre 70-290 µm com parede celular espessa e numerosos núcleos) e maduros (estruturas com diâmetro \geq 300 µm preenchidas por endosporos), bem como estruturas que apresentavam estágios da divisão nuclear do *R. seeberi*, e que, portanto, seriam ideias para avaliar os objetivos deste estudo. A nomenclatura adotada foi a mesma utilizada por Mendoza e Vilela (2013).

4.5 Preparo das lâminas anterior à marcação com fluorocromos

Antes da utilização dos marcadores fluorescentes, as lâminas que continham o tecido a ser analisado foram colocadas em jarras de Copplin, seguindo o protocolo de Lei *et al.* (2014). É importante ressaltar que o tecido procedente do cão não foi

submetido ao processo de desparafinização e reidratação porque na ausência do tecido embebido em parafina foi utilizada uma lâmina previamente corada com H&E, a qual foi submetida a um tratamento para retirar os corantes e permitir a marcação utilizando os fluorocromos específicos.

4.5.1 Protocolo de desparafinização e reidratação dos tecidos

A desparafinização dos tecidos foi realizada por meio da imersão das lâminas em xileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., EUA) durante 20 minutos, sendo que ao final dos primeiros 10 minutos o reagente foi descartado e um novo volume foi adicionado. Para facilitar a retirada da parafina, as lâminas foram agitadas com movimentos verticais durante 20 segundos a cada 1 minuto. Foram testados também os tempos de imersão da amostra no xileno durante 10 e 40 minutos para avaliar qual dos três tempos (10, 20 ou 40 minutos) proporcionaria a retirada mais eficiente da parafina. Foi observado que o tempo total de 10 minutos não proporcionou uma desparafinização completa dos tecidos, mas os tempos de 20 e 40 minutos sim e, portanto, o menor tempo (20 minutos) foi adicionado ao protocolo.

Após o processo de desparafinização, as lâminas foram reidratadas com diferentes concentrações de álcool etílico (Decon Labs, Inc., EUA). Primeiramente, as lâminas foram imersas durante 20 minutos em álcool etílico 100%, sendo que ao final dos primeiros 10 minutos o reagente foi descartado e um novo volume foi adicionado. Em seguida, as lâminas foram reidratadas com etanol 95%, 90%, 80% e 70%, respectivamente, num tempo total de 5 minutos para cada um dos passos. Por fim, as lâminas foram lavadas uma vez durante 5 minutos com água destilada e 3 vezes com solução de PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO., EUA) durante 5 minutos cada um. Ao longo de todo o processo as lâminas foram agitadas com movimentos verticais durante 20 segundos a cada 1 minuto para facilitar a reidratação.

4.6 Protocolos das marcações

Após o pré-tratamento, as lâminas que continham os tecidos a serem examinados foram acomodadas em uma câmara úmida (placa de Petri com algodão úmido e suporte para a lâmina) e os tecidos foram processados seguindo os protocolos

sugeridos pela companhia, com modificações necessárias para adaptar-se ao tipo de tecido utilizado no presente estudo. Os protocolos de marcação foram realizados em ambiente semi-escuro (luzes artificiais desligadas) para evitar a redução da fluorescência dos reagentes. Todas as amostras, exceto o controle negativo, foram marcadas com os reagentes: NucBlue® + ActinRed™ 555.

Para preservar a fluorescência, após a marcação, foi adicionada uma gota de ProLong® Diamond Antifade Mountant (Life Technologies®, Carlsbad, EUA; REF P36965, Lote nº 1603427) em cada uma das amostras. Este reativo é selado e preservado por meses, permitindo que as lâminas sejam analisadas várias vezes. Uma vez que as lâminas foram avaliadas microscopicamente, elas foram armazenadas a -20°C.

4.6.1 Protocolo para detecção do DNA (DAPI)

Seguindo o protocolo da companhia, 2 gotas do reagente NucBlue® Fixed Cell Ready Probes® foram adicionadas diretamente sobre as lâminas contendo o tecido. Os tecidos foram testados à temperatura ambiente em diferentes tempos, em intervalos de 5 minutos, 15 minutos ou 60 minutos de incubação, para definir qual destes intervalos proporcionava a melhor intensidade de fluorescência nos tecidos. Baseado na intensidade de coloração do DAPI nos núcleos do hospedeiro, o tempo de 60 minutos foi selecionado como padrão ideal. Ao término da incubação com os marcadores fluorescentes, as lâminas foram lavadas quatro vezes com 1 mL de PBS.

4.6.2 Protocolo para detecção dos filamentos de actina

Seguindo o protocolo da companhia, 2 gotas do reagente ActinRed™ 555 Ready Probes® foram adicionadas diretamente sobre as lâminas contendo os tecidos e testados os tempos de 30 minutos e 120 minutos de incubação à temperatura ambiente, para definir qual deles proporcionava a melhor intensidade de fluorescência. Foi padronizado o tempo de 30 minutos. Ao fim dos 30 minutos, as lâminas foram lavadas quatro vezes com 1 mL de PBS.

4.7 Controle Positivo

Os núcleos das células dos hospedeiros com rinosporidiose foram utilizados como controle positivo para o reagente DAPI. Desafortunadamente, as células do hospedeiro não apresentaram divisão celular, o que não nos permitiu utilizá-las como controle positivo para a faloidina. Para minimizar este inconveniente, a detecção da intensidade do filtro de emissão de 575-675 nm (vermelha) foi avaliada junto aos controles negativos. Neste cenário, qualquer detecção vermelha nos tecidos avaliados foi inspecionada em seu controle negativo para validar sua autenticidade.

4.8 Controle negativo

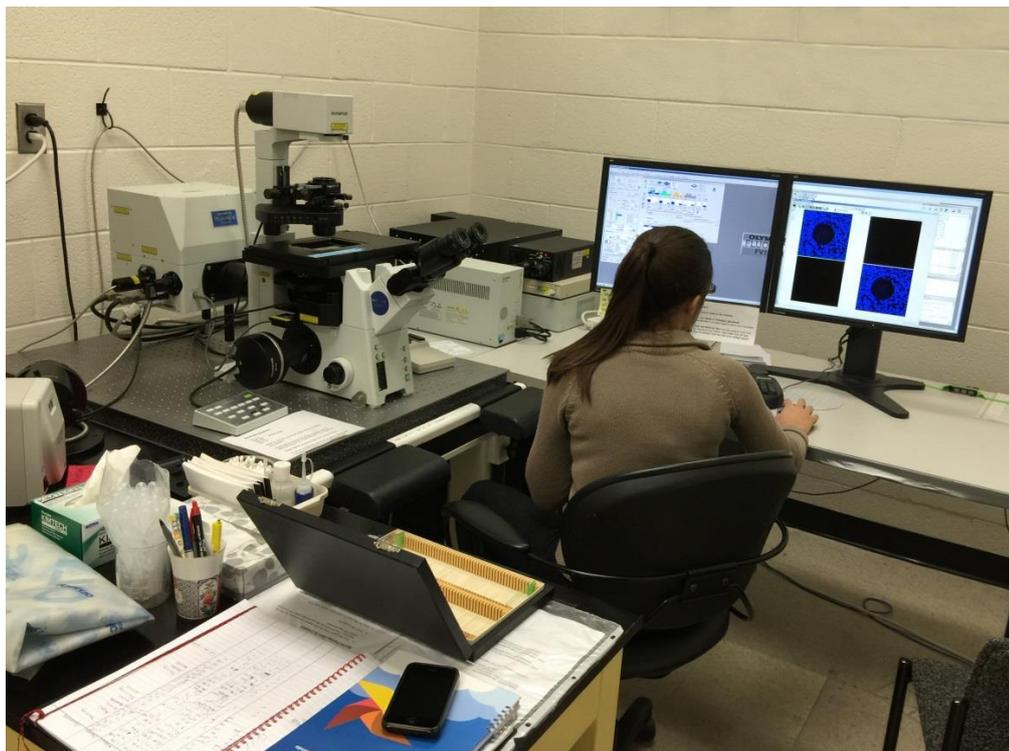
O controle negativo foi preparado da seguinte forma: uma lâmina pré-tratada contendo o mesmo corte do tecido utilizado nas marcações com DAPI e faloidina (tecido desparafinado e reidratado) foi coberta com 1 mL de PBS e incubada em temperatura ambiente durante 60 minutos dentro de uma câmara úmida. Posteriormente, o excesso de PBS foi retirado e a lâmina foi selada com 1 gota de ProLong® Diamond Antifade Mountant sob a lamínula e armazenada sob a temperatura de -20°C.

4.9 Microscópio Confocal

As lâminas foram analisadas utilizando o microscópio confocal de escaneamento a laser Olympus FluoView™ FV1000, acoplado ao sistema ótico Olympus IX81® (microscópio invertido), com objetiva UIS2 secas de 4x (0,13 NA; UPlanFL N), 10x (0,40 NA; UPlanSApo) e 20x (0,75 NA; UPlanSApo) e objetivas de imersão em óleo de 40x (1,30 NA; UPlanFL N), 60x (1,42 NA; PlanApo N) e 100x (1,40 NA; UPlanSApo) (**Figura 29**). O DAPI foi detectado no canal 1 (laser de diodo / excitação: 405 nm / filtro de emissão: 425-475 nm; azul), o Actin Red™ 555 (TRITC) no canal 3 (laser de estado sólido / excitação: 559 nm / filtro de emissão: 575-675 nm; vermelho) e o campo de luz transmitida no canal 4 (laser de estado sólido / excitação: 559 nm / emissão: 0 nm; preto e branco). O canal 2 estava calibrado para a detecção de fluorescência verde (Alexa Fluor® 488/ laser de argônio/ excitação:

488nm/ filtro de emissão: 500-545 nm; verde), mas não foi utilizado fluorocromo com fluorescência verde nesse estudo. O microscópio também é equipado com uma lâmpada de mercúrio para a microscopia de luz branca e fluorescência convencionais, bem como possui outros três lasers que não foram utilizados nas análises (laser de argônio nos comprimentos de onda de 458 e 514 nm e laser de estado sólido no comprimento de 635 nm). Além disso, é composto no total por três detectores fotomultiplicadores (PMT) e um detector para luz transmitida, o que permite a aquisição das imagens separadamente em cada canal (aquisição sequencial), as quais podem ser posteriormente fundidas numa imagem final. Todas as imagens foram obtidas utilizando a objetiva seca de 20x e as objetivas de imersão de 60x e 100x (Olympus America Inc., Center Valley, PA., EUA) em modo sequencial no formato de 1024 x 1024 pixels, sendo que o tempo de permanência foi de 2,0 μ sec/pixel e zoom de 1x. O diâmetro dos pinholes foi ajustado para 1 Unidade Airy (UA) para todas as objetivas utilizadas visando otimizar a resolução ótica confocal. As imagens foram convertidas do formato OIB para o formato TIFF e, em seguida, exportadas inalteradas do software Olympus FluoView FV1000 Advanced Software versão 4.01 para o programa Adobe Photoshop CS6 v.13.0.1 x64.

Figura 29 – Microscópio confocal da Michigan State University.



Fonte: Michigan State University (2014).

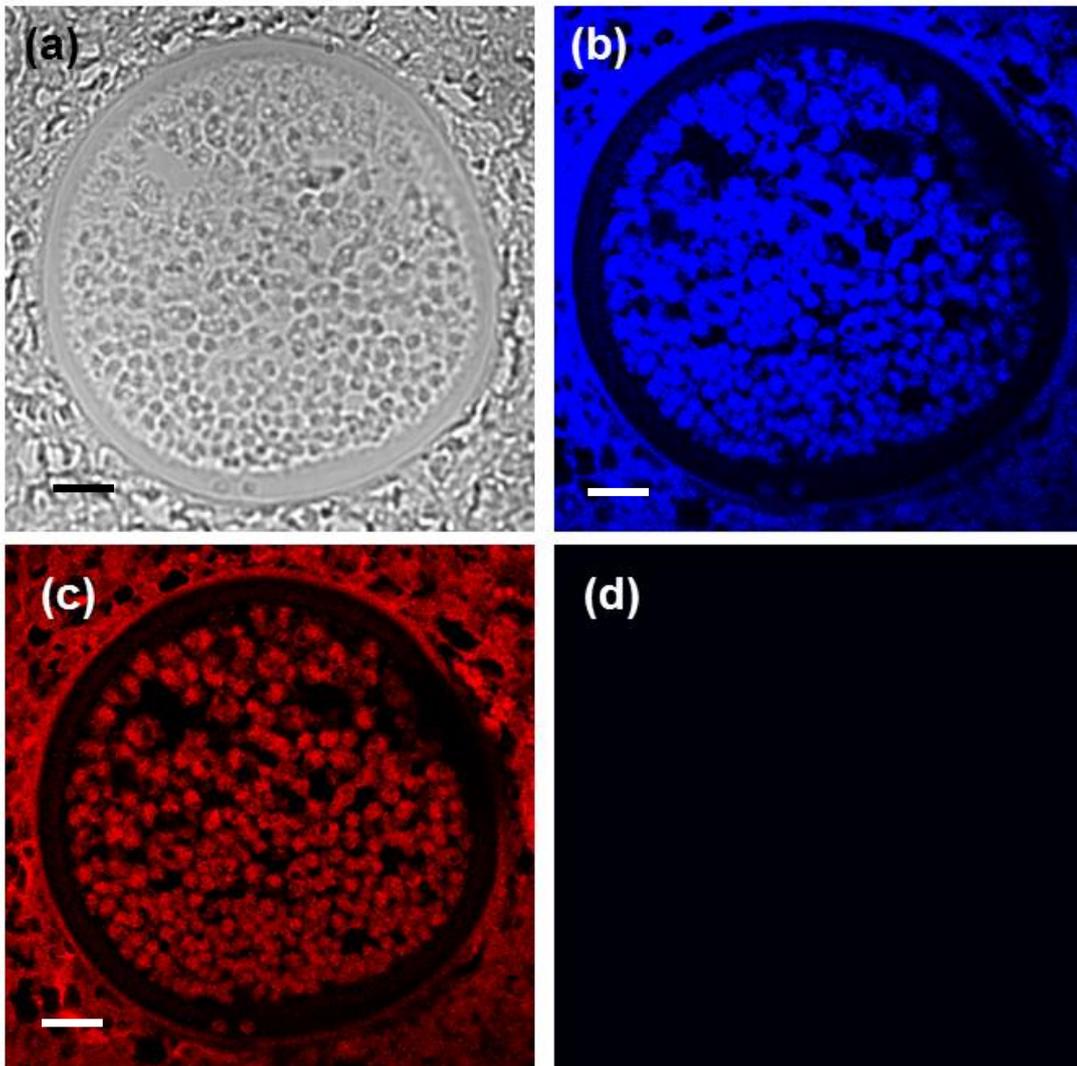
4.9.1 Critérios para a aquisição das fotos

Primeiramente o controle negativo foi focalizado na objetiva de 20x, a intensidade do laser diodo de 405 nm (filtro de emissão: 425-475 nm) e laser de estado sólido de 559 nm (filtro de emissão: 575-675 nm) foi calibrada em um nível alto e observou-se a fluorescência do *background* nas cores azul e vermelho. Posteriormente, o nível de intensidade dos lasers foi reduzido até que não fosse possível observar imagem alguma, e a janela do monitor apresentou-se com cor preta. Os tecidos utilizados como controle negativo sem coloração não possuíam autofluorescência utilizando esta modalidade de calibração. Em seguida, a amostra em estudo foi avaliada utilizando o mesmo parâmetro final estabelecido para o controle negativo e ajustes finos foram feitos na intensidade do laser de estado sólido para que o *background* da fluorescência vermelha fosse eliminado, de modo que se observasse apenas a fluorescência real. O ajuste para o DAPI foi feito utilizando-se como padrão a intensidade dos núcleos das células dos hospedeiros.

5 RESULTADOS

5.1 Calibração da intensidade do laser diodo e do laser de estado sólido utilizando o controle negativo

Antes da análise e aquisição das imagens dos tecidos marcados pelo DAPI e pela faloidina, o controle negativo foi utilizado para a calibração da intensidade do laser diodo (azul; 405 nm) e do laser de estado sólido (vermelho; 559 nm) (**Figura 30**). Os esporângios do *R. seeberi* selecionados no controle negativo foram focalizados utilizando microscopia de luz convencional (Fig. 30a). Posteriormente, o mesmo campo foi investigado com microscopia confocal com a intensidade dos lasers intencionalmente elevada (Fig. 30b,c). Utilizando-se estes parâmetros, observou-se que tanto as células do hospedeiro quanto as estruturas do *R. seeberi* surgiram com a mesma intensidade. Em seguida, a energia dos lasers foi reduzida gradualmente até obter-se uma imagem uniforme com a eliminação completa da fluorescência inespecífica. Este passo foi realizado com o objetivo de calibrar os parâmetros de autofluorescência para a análise posterior das amostras marcadas com fluorocromos. Verificou-se que, após a eliminação do background, o controle negativo não apresentou nenhuma autofluorescência e as intensidades dos lasers atingidas quando a imagem obtida tornou-se uniformemente negra (Fig. 30d) foram utilizadas como parâmetros para avaliar as amostras marcadas com fluorocromos.

Figura 30 – Controle negativo.

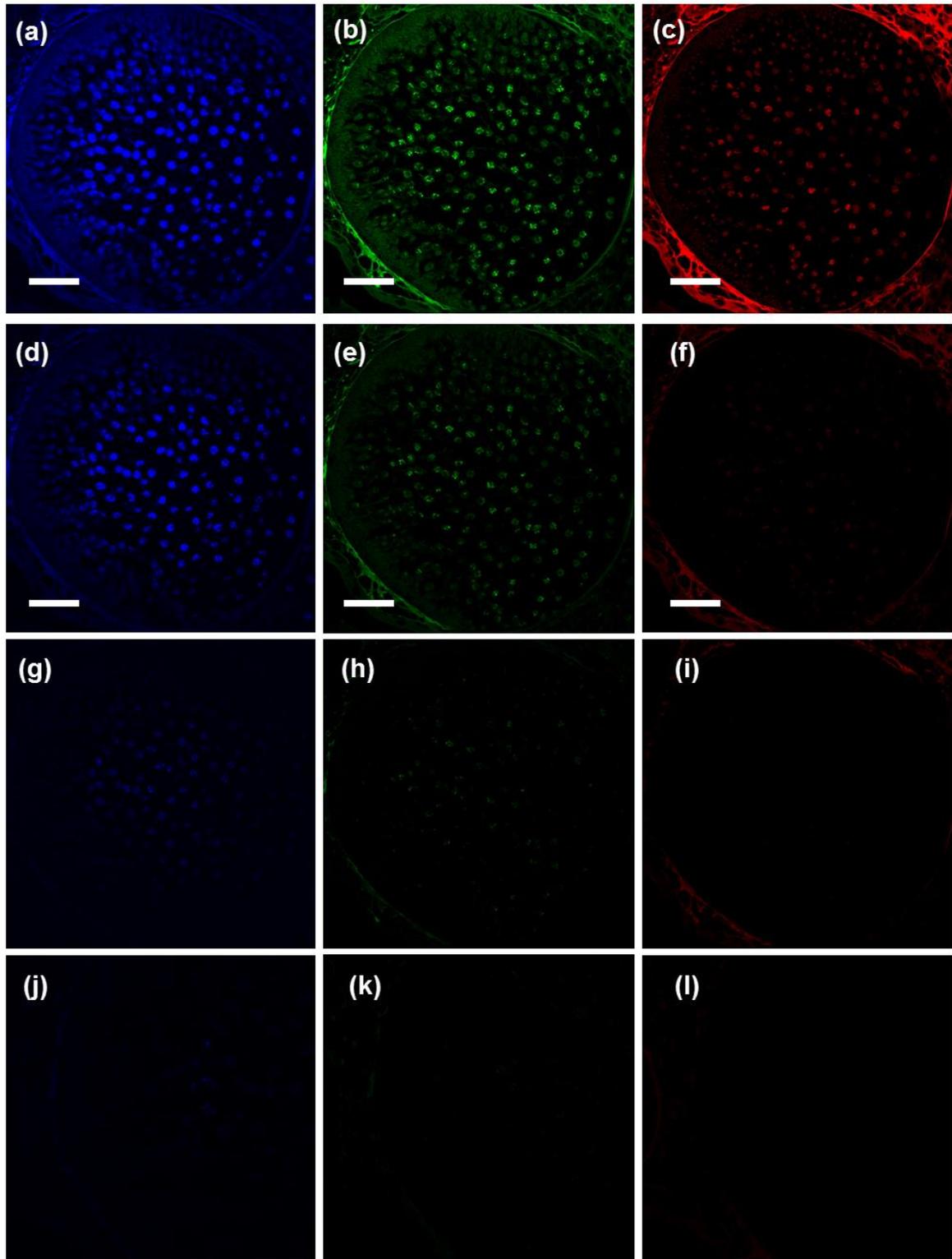
(a) A figura demonstra um esporângio intermediário (EI) do *R. seeberi* sem marcação de fluorocromos pela microscopia de luz convencional; (b) a mesma estrutura visualizada sob uma intensidade elevada do laser diodo (405 nm; azul); (c) a mesma estrutura visualizada sob uma intensidade elevada do laser de estado sólido (559 nm; vermelho); (d) eliminação do *background* após a redução da intensidade dos dois lasers. Nota-se que o *R. seeberi* sem fluorocromos não pode ser visualizado depois da redução dos lasers. Este parâmetro foi utilizado como controle negativo em todos os experimentos com fluorocromos (Escala= 15 μ m).

5.2 Avaliação da autofluorescência nas amostras coradas com H&E

Como existem relatos na literatura afirmando que as estruturas do *R. seeberi* coradas por H&E apresentam autofluorescência sob luz ultravioleta, investigou-se pela microscopia confocal se essas estruturas apresentariam autofluorescência ao serem irradiadas com o laser diodo (azul; 405 nm), laser argônio (verde; 488 nm) e laser de estado sólido (vermelho; 559 nm).

Os diferentes estágios do ciclo de vida do *R. seeberi* (EJ, EI, EM e endosporos) foram identificados previamente nas lâminas histológicas coradas por H&E e analisados para uma possível autofluorescência, que foi identificada apenas nos endosporos presentes nos EM (**Figura 31**). Quando a intensidade dos lasers foi intencionalmente elevada (Fig. 31a-c) observou-se que tanto as estruturas do hospedeiro quanto as do *R. seeberi* fluoresceram com a mesma intensidade. Em seguida, a emissão dos lasers foi reduzida (Fig. 31d-f) e observou-se que os endosporos do *R. seeberi* tornam-se menos visíveis pelo laser de estado sólido (vermelho), mas continuam brilhantes frente aos demais lasers. A intensidade dos lasers foi novamente reduzida (Fig. 31g-i) até que não fosse mais possível observar as células do hospedeiro nem os fenótipos do *R. seeberi* (Fig. 31j-l).

Figura 31 – Autofluorescência dos endosporos corados por H&E.

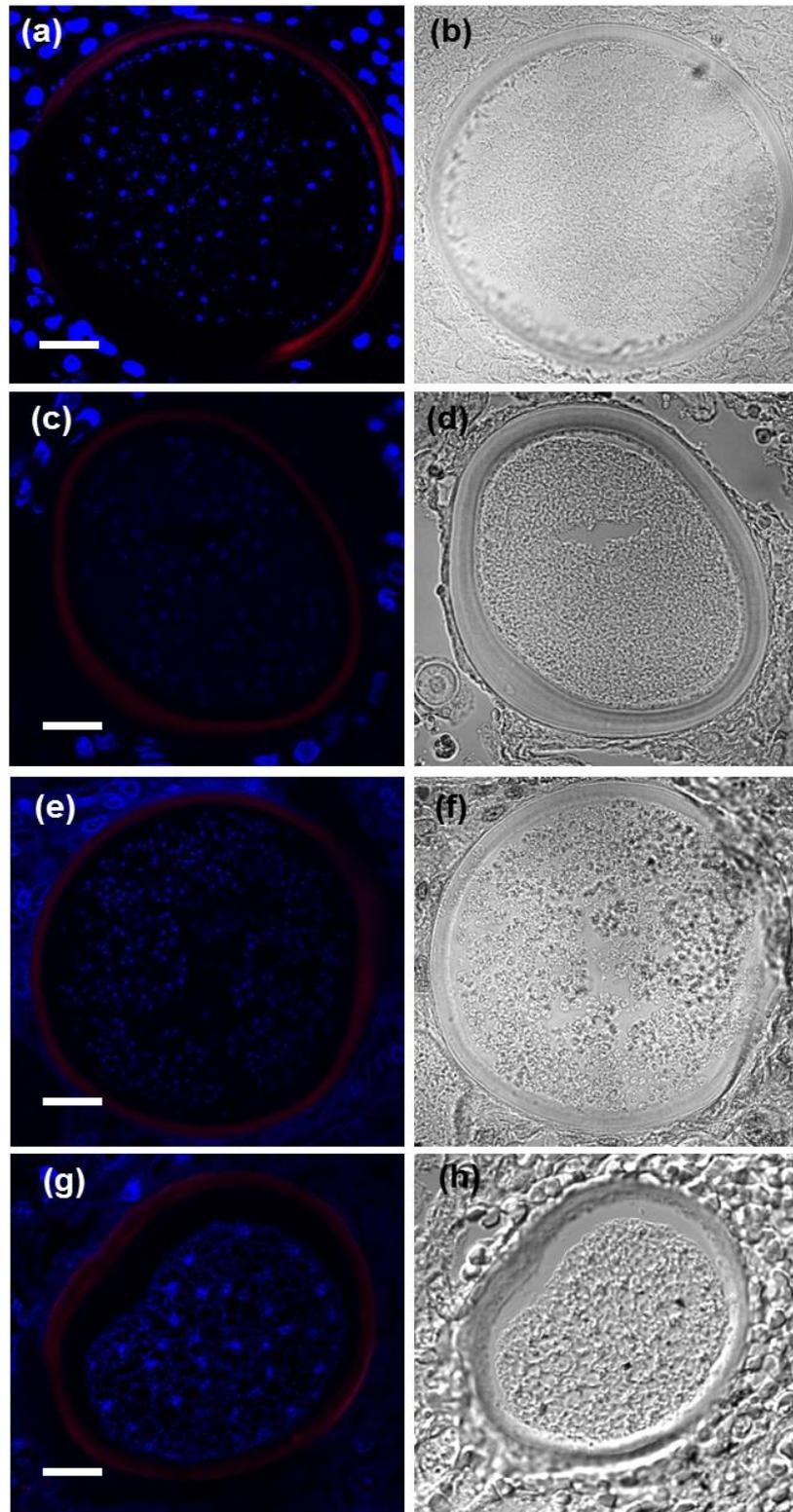


(a-c) EM visualizado com laser diodo (405 nm; azul), argônio (488 nm; verde) e laser de estado sólido (559 nm; vermelho) em intensidade elevada; (d-f) EM visualizado por lasers em intensidade média; (g-i) EM visualizado por lasers em intensidade baixa; (j-l) EM visualizado por lasers em intensidade quase nula (Escala= 80 μ m).

5.3 Detecção do DNA pelo DAPI em amostras de diferentes hospedeiros

Nas amostras utilizadas neste estudo provenientes de diferentes hospedeiros (cavalo, gato, humano e cão) e marcadas pelo DAPI, os núcleos de todos os fenótipos do *R. seeberi*, bem como os núcleos dos hospedeiros foram identificados pelo DAPI (fluorescência azul) (**Figura 32**). Porém, a intensidade da marcação não foi a mesma entre as amostras analisadas. O DAPI se ligou fortemente ao núcleo das células do cavalo assim como os núcleos dos fenótipos infectantes do *R. seeberi* nesse hospedeiro (Fig. 32a). Entretanto, nas amostras do gato, humano e cão os núcleos dos hospedeiros e do *R. seeberi* foram detectados com uma intensidade menor que a observada na amostra do cavalo (Fig. 32c,e,g).

Figura 32 – Intensidade da marcação por DAPI em amostras de diferentes hospedeiros.

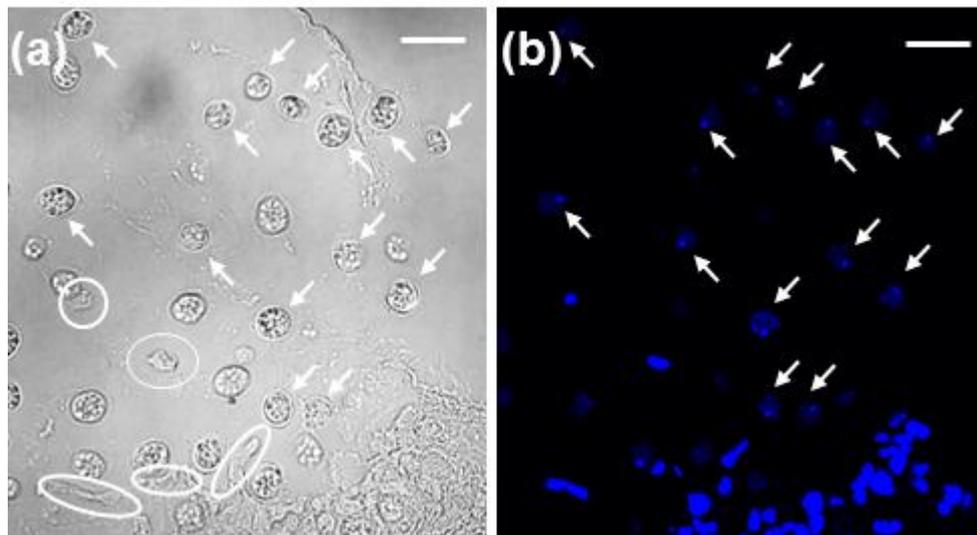


Núcleos de EI e núcleos dos seguintes hospedeiro marcados por DAPI (azul): (a) cavalo; (c) gato; (e) cão; (g) humano. Microscopia de luz convencional demonstrando o *R. seeberi* (painéis a, d, f, h) (Escala = 20 μ m).

5.4 Marcação dos endosporos livres (DAPI / faloidina)

Os endosporos maduros liberados pelo poro de saída dos EM foram visualizados em contato com as células do hospedeiro, sendo que cada endosporo possuía um núcleo com diâmetro entre 2 e 4 μm corado por DAPI. Não foi identificada afinidade da faloidina pelos endosporos do *R. seeberi* (Figura 33).

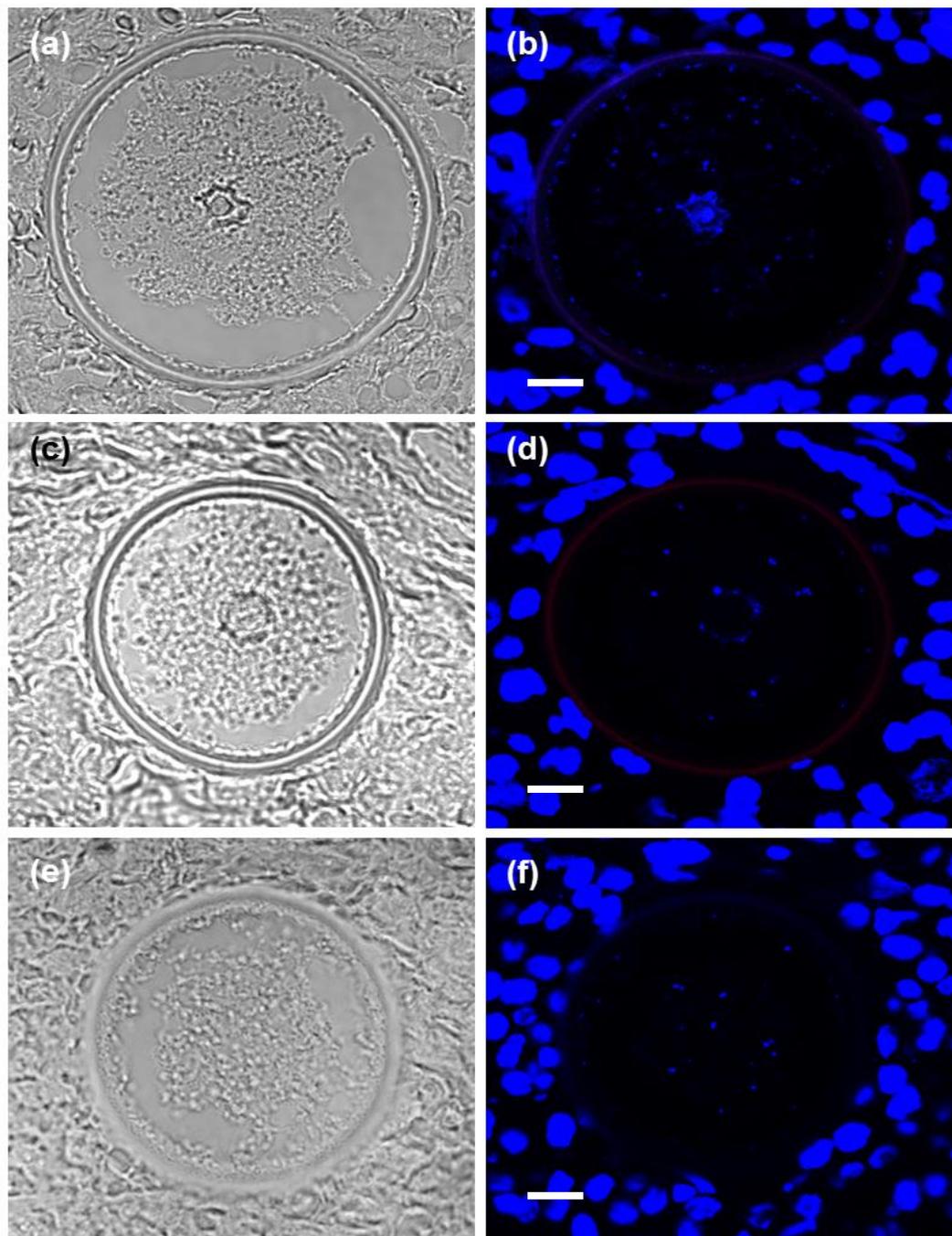
Figura 33 – Endosporos liberados.



(a) Microscopia de luz convencional evidenciando os endosporos liberados de um EM com parede celular visível (setas) em meio a células do hospedeiro (cavalo) que apresentam núcleos picnóticos (círculos e estruturas ovaladas); (b) mesmo campo apresentado em (a) visualizado agora por microscopia confocal (canal azul). Os núcleos dos endosporos (setas) estão marcados pelo DAPI. A faloidina (canal vermelho) não apresentou afinidade pelas estruturas internas dos endosporos (Escala = 20 μm).

5.5 Marcação do esporângio juvenil (DAPI / faloidina)

O EJ foi o fenótipo do *R. seeberi* mais comumente encontrado nas amostras analisadas (**Figura 34**). Estes fenótipos são esféricos, usualmente com um diâmetro entre 10 e 70 μm e com núcleos centrais de diâmetro entre 5 e 7 μm , os quais em alguns fenótipos foram marcados fortemente pelo DAPI (Fig. 34b) e em outros foram marcados mais fracamente (Fig. 34d). Devido à forma esférica destas estruturas e dependendo da profundidade da secção da amostra, alguns EJ não demonstraram núcleos (Fig. 34f). Quando os EJ foram identificados pelo DAPI, pequenos pontos brilhantes de diâmetro entre 0,5 e 2,0 μm foram visualizados (Fig. 34b,d,f). Tais estruturas azuis também foram identificadas em EI em estágios de desenvolvimento inicial a intermediário, mas não foram visualizados nos EM, endosporos ou no tecido dos hospedeiros. Na maioria dos casos a faloidina não apresentou afinidade pelas estruturas internas dos EJ (Fig. 34b,g), mas em alguns poucos casos foi observada uma leve fluorescência vermelha interna na parede celular (Fig. 34d).

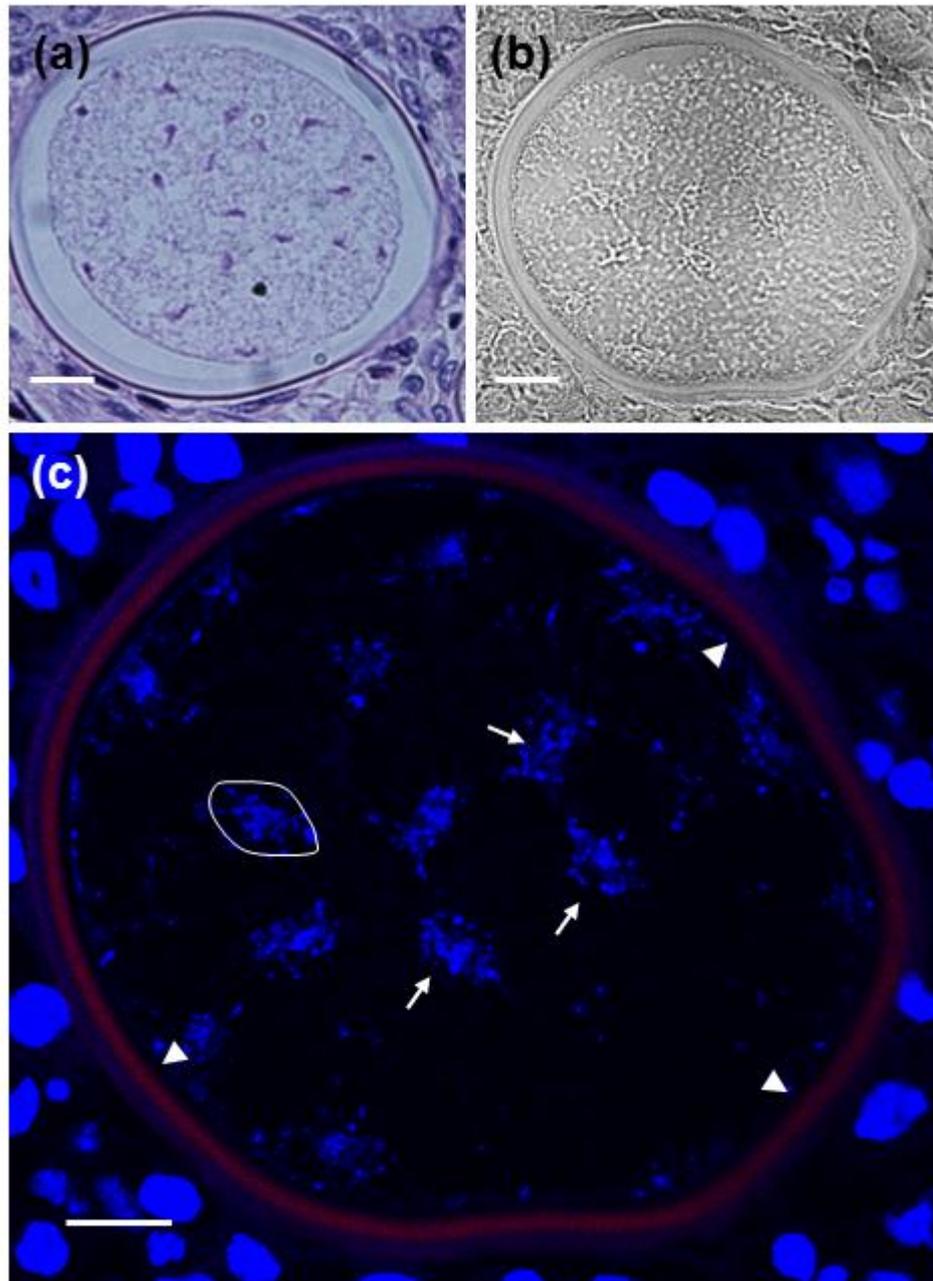
Figura 34 – EJ marcados por DAPI e faloidina.

Os painéis (a-d) demonstram dois EJ com núcleos centrais e os painéis (e,f) um EJ sem núcleo visível. Os painéis (a,c,e) demonstram três EJ visualizados por microscopia de luz convencional, enquanto os painéis (b,d,f) mostram os mesmos três EJ marcados por DAPI e faloidina. Os painéis (b) e (d) demonstram a presença de um núcleo central marcado pelo DAPI, assim como pequenos pontos azuis em torno desse núcleo. Nota-se os núcleos do hospedeiro na parte externa dos EJ. Também pode se evidenciado que os pontos azuis não estão presentes nas células do hospedeiro. O painel (d) mostra leve reação da faloidina na parede celular do EJ. (Escala = 8 μ m)

5.6 Marcação do esporângio intermediário (DAPI / faloidina)

Os EI foram identificados como tais pelo seu diâmetro entre 70 a 290 μm , pela presença de múltiplos núcleos em diferentes estágios do ciclo nuclear e pela ausência de citocinese. Sempre que possível o fenótipo foi primeiramente identificado em uma amostra corada por H&E e, em seguida, a mesma estrutura foi localizada por microscopia confocal em uma das secções do tecido marcado pelo DAPI e faloidina. Os EI podem apresentar pelo menos três fenótipos diferenciados entre si. A primeira forma é o EI no estágio inicial da divisão nuclear (**Figura 35**), com poucos núcleos, todos sincronizados em interfase, prófase, metáfase, anáfase ou telófase. Nos núcleos em metáfase (Fig. 35c) os cromossomos se estendem de forma alongada em uma área ampla, e podem ser visualizados como estruturas ovais levemente coradas pelo DAPI (Fig. 35c; oval).

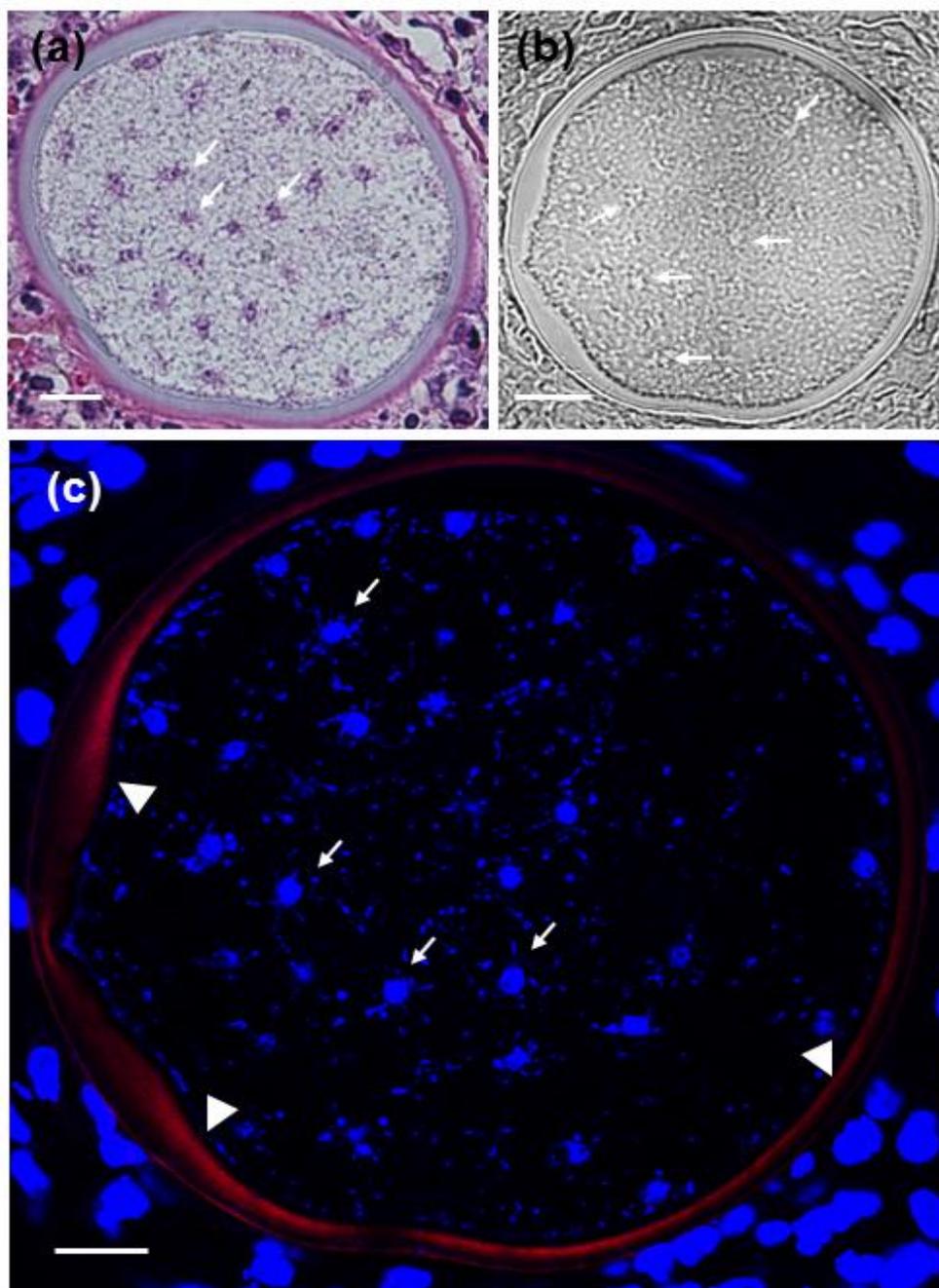
Figura 35 – EI em estágio inicial da divisão nuclear.



(a) EI em tecido de cavalo com rinosporidiose corado por H&E com poucos núcleos em metáfase, que podem ser visualizados como linhas ou pontos, dependendo da posição do núcleo no momento da secção (Escala = 20 μm); (b) a mesma estrutura visualizada no painel (a) focalizada por microscopia de luz convencional em uma secção marcada por DAPI e faloidina para ilustrar o plano da imagem adquirida pelos lasers (Escala = 20 μm); painel (c), imagem adquirida por microscopia confocal evidenciando núcleos difusos em metáfase (contorno branco oval; setas) (canal azul; DAPI) e a presença da faloidina detectando uma substância semelhante à actina (canal vermelho; faloidina) na camada interna da parede celular do esporângio (cabeças de seta). Alguns pontos azuis pequenos marcados por DAPI também podem ser observados no citoplasma (Escala = 20 μm).

O segundo fenótipo é o EI em um estágio intermediário da divisão celular, no qual se observa um número maior de núcleos sincronizados em alguma fase mitótica (a maioria em prófase) e diâmetro do esporângio maior do que o estágio anterior (**Figura 36**).

Figura 36 – EI em estágio intermediário da divisão nuclear.

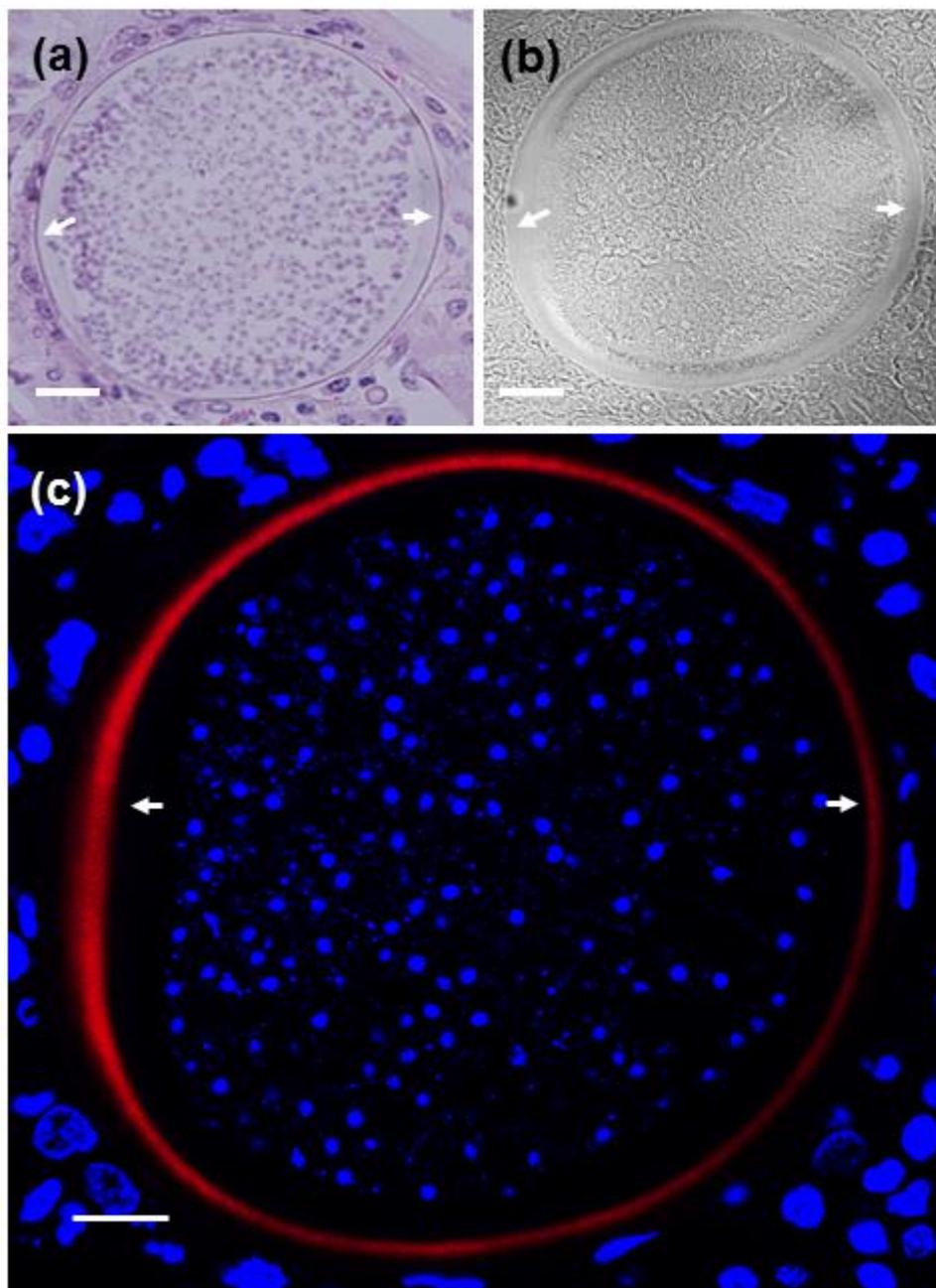


O painel (a) demonstra um EI em tecido de cavalo com rinosporidiose corado por H&E apresentando numerosos núcleos em prófase (setas) (Escala = 20 μ m); painel (b), amostra marcada por DAPI e

faloidina visualizada pela microscopia de luz convencional, apresentando pequenos pontos brancos (setas) que correspondem aos núcleos em prófase (Escala = 20 μm); painel (c), mesma estrutura focada no painel (b) visualizada por microscopia confocal mostrando vários núcleos em prófase marcados por DAPI (canal azul) (setas) e numerosos pontos azuis pequenos dispersos no citoplasma, os quais são abundantes neste fenótipo e também visíveis nos EJ (Fig. 31) e nos EI no estágio inicial da divisão nuclear (Fig. 32). A faloidina (canal vermelho) aderiu fortemente à camada interna da parede celular, possivelmente detectando a presença de uma substância semelhante à actina (cabeças de seta) (Escala = 20 μm).

O terceiro fenótipo é o EI em um estágio final da divisão celular, no qual se observa numerosos núcleos em diferentes estágios do ciclo nuclear (**Figura 37**). Os núcleos neste fenótipo são caracteristicamente menores (diâmetro entre 2 e 4 μm) e desprovidos de uma parede celular. Esse terceiro fenótipo parece ser o último anterior à citocinese e à formação do EM.

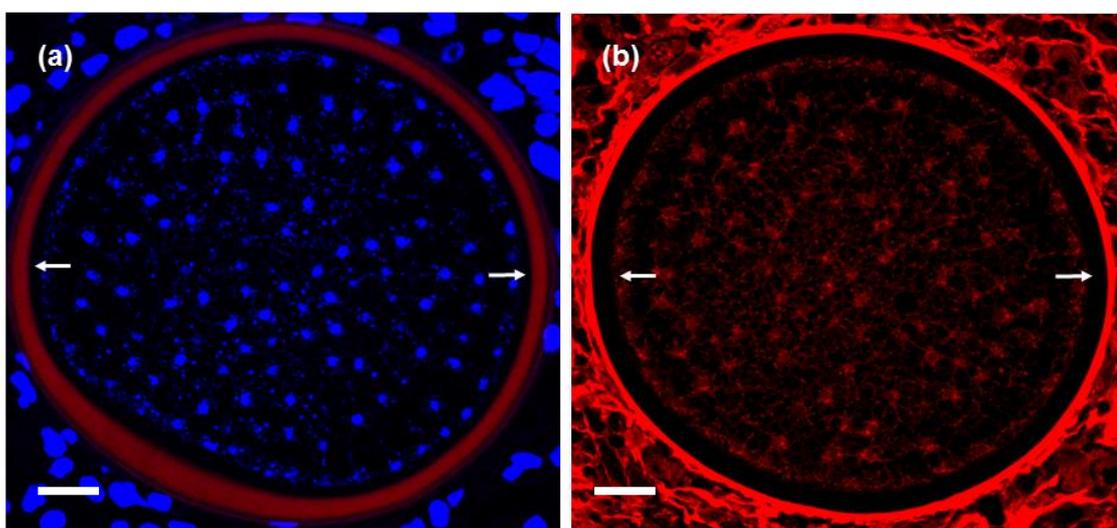
Figura 37 – EI em estágio final da divisão nuclear.



O painel (a) demonstra um EI em tecido de cavalo corado por H&E apresentando numerosos núcleos em prófase (considerando apenas um plano da esfera), possivelmente um estágio logo antes da única citocinese que ocorre durante o ciclo de vida do *R. seeberi* (Escala = 38 μm); o painel (b) demonstra um EI marcado por DAPI e faloidina focalizado por microscopia de luz convencional no mesmo plano em que será excitado pelos lasers (Escala = 25 μm); o painel (c) demonstra que a faloidina detectou fortemente a camada interna abaixo da parede celular (setas), indicando que uma substância semelhante à actina está sendo expressada neste local. Ainda é possível observar a presença de pequenos pontos azuis dispersos no citoplasma do *R. seeberi*, ausentes no tecido do hospedeiro (Escala = 20 μm).

Em todos os fenótipos dos EI e, independentemente de seu estágio de desenvolvimento, foi observada uma camada interna espessa logo abaixo da parede celular à qual a faloidina (vermelha) se ligou ativamente. Quando a intensidade do laser de estado sólido (559 nm; vermelho) foi aumentada intencionalmente no controle negativo, essa camada interna especificamente não apresentou autofluorescência, sugerindo que a faloidina realmente detectou uma substância semelhante à actina expressada ativamente nos fenótipos (**Figura 38**).

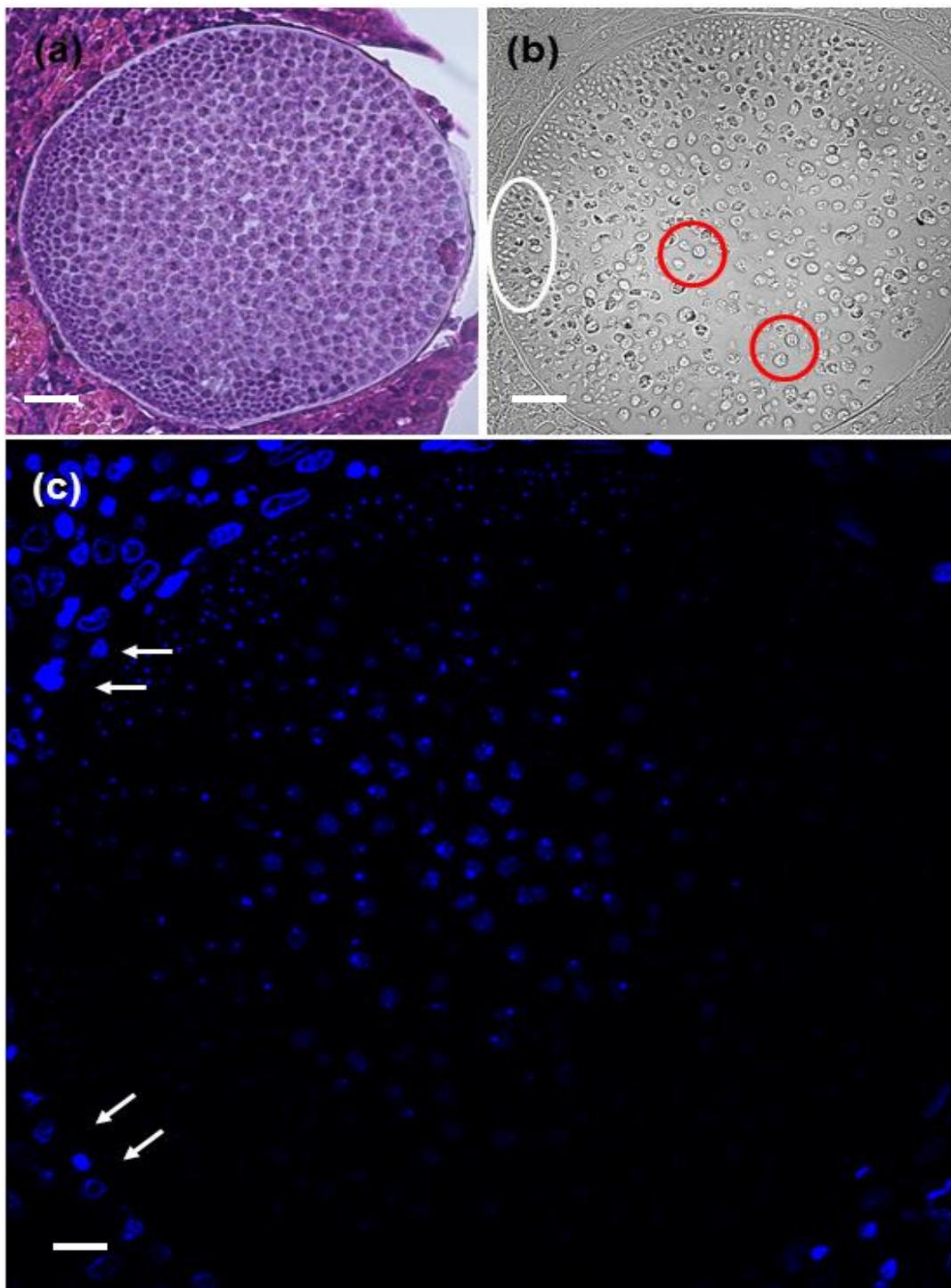
Figura 38 – Controle negativo não apresenta autofluorescência na camada interna abaixo da parede celular do EI.



(a) EI marcado por DAPI e faloidina visualizado por microscopia confocal, demonstrando a detecção pela faloidina (canal vermelho) de uma substância semelhante à actina presente na espessa camada interna logo abaixo da parede celular (setas); em (b) observa-se um fenótipo semelhante ao apresentado no painel (a), demonstrando um EI utilizado como controle negativo visualizado pelo laser de estado sólido (559 nm; vermelho) com uma intensidade intencionalmente elevada. Nota-se que apenas a parede celular do esporângio está autofluorescente, enquanto a camada interna logo abaixo (detectada pela faloidina no painel (a) não apresenta autofluorescência (setas) (Escala = 20 μm).

5.7 Marcação do esporângio maduro (DAPI / faloidina)

Os EM foram identificados pelo seu enorme tamanho com diâmetros $\geq 300 \mu\text{m}$ e pela presença de numerosos endosporos com diâmetro entre 5 e 12 μm envolvidos por uma parede celular (**Figura 39**).

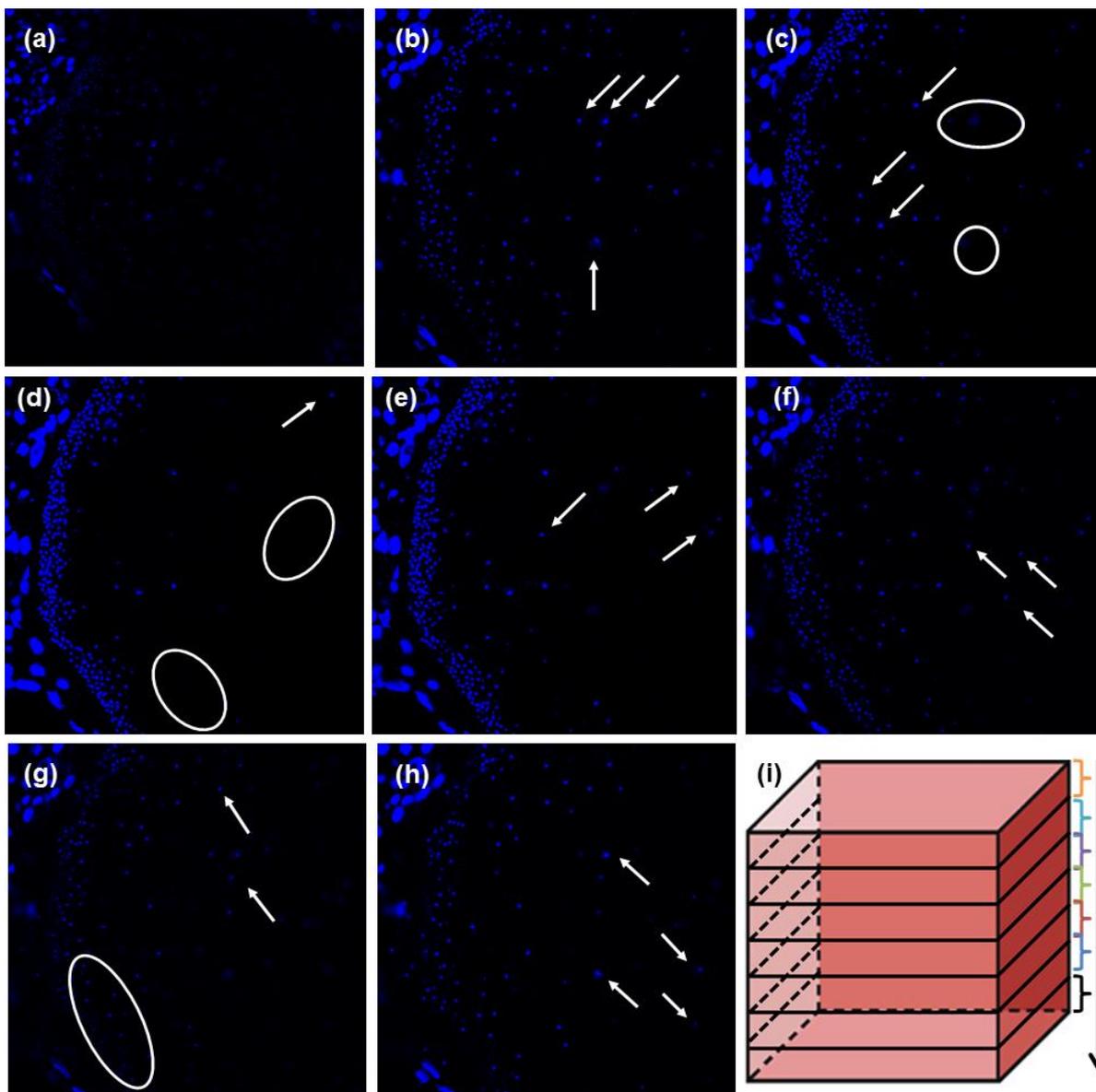
Figura 39 – Esporângio maduro.

O painel (a) mostra um EM de grande tamanho, com parede celular fina, preenchido por inúmeros endosporos com parede celular (H&E) (Escala = 35 μm); o painel (b) mostra um EM de uma amostra de cavalo marcada com DAPI e faloidina, visualizada por microscopia de luz convencional demonstrando um EM preenchido por endosporos imaturos (círculo branco) e maduros (círculos vermelhos) (Escala = 35 μm); painel (c) mostra a mesma estrutura apresentada no painel (b) marcada pelo DAPI e faloidina, visualizada por microscopia confocal. Nota-se a detecção dos núcleos dos

endosporos e do hospedeiro pelo DAPI (canal azul) e ausência de captação da faloidina (canal vermelho) próxima à parede celular (setas brancas) (Escala = 60 μm).

Como em um plano específico é possível visualizar um determinado número de núcleos marcados pelo DAPI em apenas alguns endosporos, uma sequência de fotografias foi obtida em diferentes planos de profundidade ao longo dos 5 μm de espessura da secção do tecido, e observou-se que os endosporos dispostos nesses diferentes planos também apresentaram núcleos marcados pelo DAPI (**Figura 40**).

Figura 40 – Núcleos dos endosporos visualizados em diferentes planos.

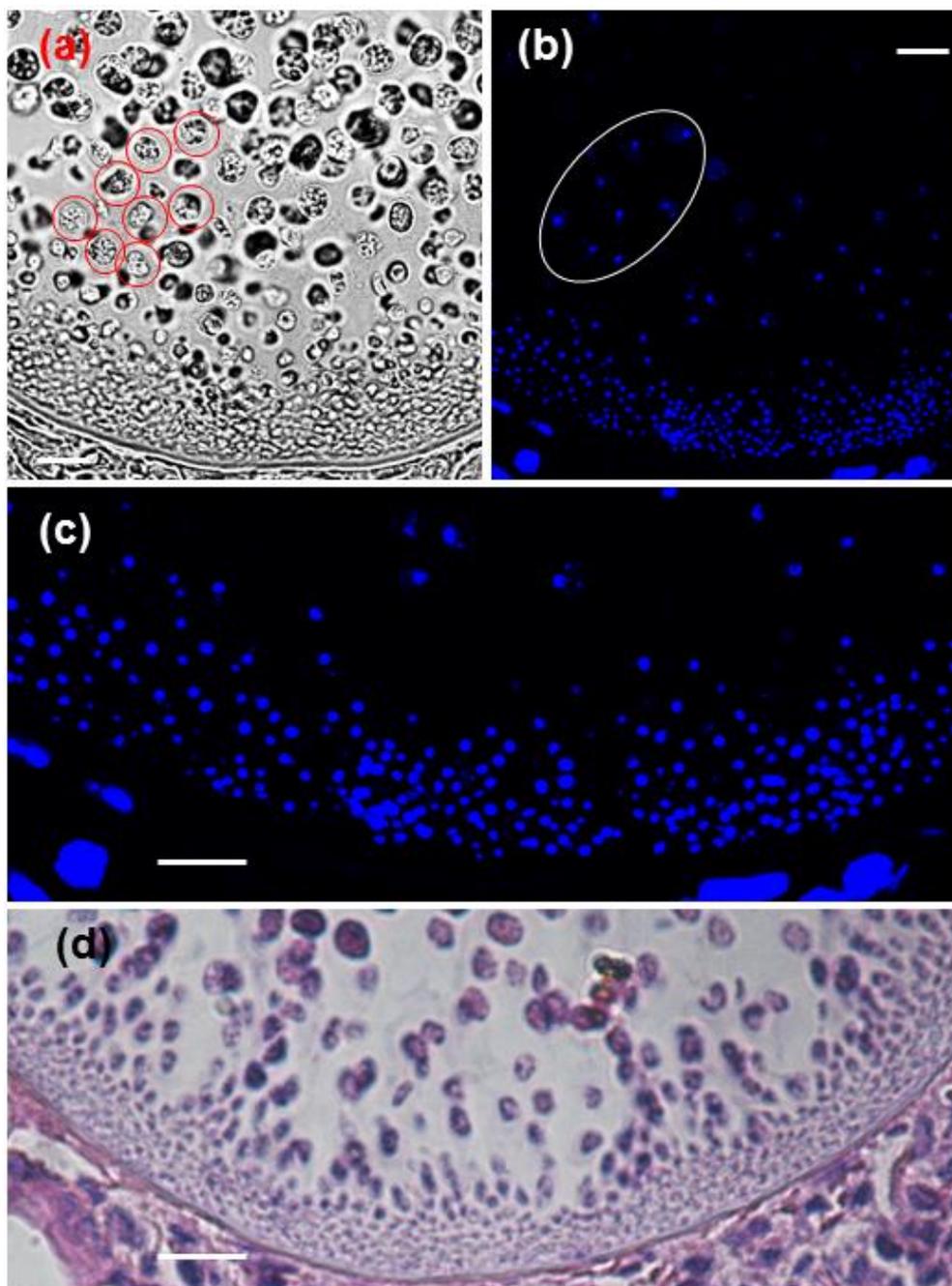


Os painéis (a-h) mostram a sequência de fotos de um EM e o tecido do hospedeiro em diferentes planos de profundidade (5 μm de espessura). As setas indicam os núcleos dos endosporos que surgem na passagem de um plano para o outro e as estruturas circulares/ovais indicam núcleos dos endosporos que deixam de ser visualizados de um plano para o outro (a-h). O painel (i) demonstra o esquema tridimensional do tecido: a primeira fatia do cubo representa o plano focal da primeira imagem (a) e assim sucessivamente de modo que a última fatia representa o plano focal da última imagem (h).

Os endosporos maduros (4 a 12 μm de diâmetro) estão localizados na região central do EM e próximos ao poro de saída. Em contrapartida, no lado oposto ao poro de saída estão localizados os endosporos imaturos (2 a 4 μm de diâmetro) na região

denominada zona germinativa. Os núcleos marcados por DAPI foram visualizados nos dois tipos de endosporos (**Figura 41**).

Figura 41 – Endosporos maduros dentro do EM e zona germinativa.



O painel (a) mostra o tecido de cavalo marcado com DAPI e faloidina, visualizado por microscopia convencional evidenciando a ZG formada pelos endosporos imaturos na porção inferior do EM e os endosporos maduros na porção central e superior (círculos vermelhos) (Escala = 20 μm); painel (b) mostra o mesmo campo focalizado no painel utilizando microscopia confocal. Os núcleos dos endosporos maduros estão marcados pelo DAPI (canal azul), sendo que neste plano em particular

apenas os núcleos de alguns endosporos presentes no painel (a) (círculos vermelhos) são visualizados no painel (b) (círculo branco). A ZG pode ser visualizada na porção inferior do painel (b) e em maior aumento no painel (c) contendo numerosos endosporos imaturos agrupados proximamente, cujos núcleos estão fortemente marcados com DAPI (canal azul) e parecem surgir da parede celular do EM (Escala = 20 μm). A faloidina (canal vermelho) não se ligou a nenhuma camada interna do EM ou dos endosporos. Em (d) observa-se novamente a ZG em maior aumento, corada por H&E (Escala = 20 μm).

6 DISCUSSÃO

O ciclo nuclear do *R. seeberi* foi descrito pela primeira vez por Ashworth (1923), que apresentou em seu trabalho figuras ilustrando núcleos de esporângios imaturos durante os diferentes estágios mitóticos. Esse pesquisador também foi o primeiro a levantar a hipótese de que a condensação do material nuclear desse microrganismo levaria à formação de quatro cromossomos. A sua hipótese foi baseada, no fato da observação de quatro protuberâncias no núcleo de um esporângio juvenil em prófase, como na figura 4, demonstrada por Mendoza e Vilela (2013). Posteriormente, Azevedo (1958) e Karunaratne (1964) reiteraram a teoria de formação de quatro cromossomos durante a prófase. Apenas recentemente, Mendoza e Vilela (2013) descreveram as atividades nucleares dos fenótipos do *R. seeberi* encontrados em tecidos infectados corados por H&E e, desta forma, elucidaram um enigma de mais de 100 anos. O problema deste estudo é que a atividade nuclear do microrganismo foi investigada utilizando características morfológicas apresentadas pelos fenótipos identificados em tecidos corados por H&E.

Por isso, com a utilização do DAPI, que se liga especificamente ao DNA, nossos resultados confirmam os achados de Mendoza e Vilela (2013), bem como validam as observações anteriores de Ashworth (1923), Azevedo (1958) e Karunaratne (1964). Nós confirmamos que o *R. seeberi* possui de fato uma maquinaria nuclear sofisticada que envolve múltiplas divisões nucleares sincronizadas. A citocinese ocorre apenas uma vez, no estágio final entre a fase do EI e EM (MENDOZA E VILELA, 2013). Essa maquinaria nuclear única parece ser notavelmente semelhante à recentemente descrita no ciclo de outros microrganismos filogeneticamente próximos da classe Mesomycetozoea, a saber: *Creolimax fragrantissima* e *Sphaeroforma arctica*. Estes também apresentam em certo estágio do seu ciclo de vida, divisões nucleares sincronizadas sem citocinese (SUGA E RUIZ-TRILLO, 2013). Considerando-se essa semelhança, é provável que outros microrganismos fenotipicamente e filogeneticamente relacionados ao *R. seeberi*, tais como, *Amphibiothecum penneri* (FELDMAN, WIMSATT E GREEN, 2005), *Amphibiocystidium ranae* (PEREIRA *et al.*, 2005), *Dermocystidium* spp. (EIRAS E SILVA-SOUZA, 2009) e outros microrganismos da classe Mesomycetozoea similares, também possuam um comportamento nuclear semelhante. Tais similaridades podem ser relevantes para o desenvolvimento de drogas específicas,

que teriam eficácia para o tratamento das infecções promovidas por estes microrganismos anômalos. A investigação de novos alvos farmacológicos seria importante para elucidar a evolução dos mecanismos de multicelularidade e controle do ciclo celular. Os estudos de Suga e Ruiz-Trillo, (2013) assim como os resultados de nossa investigação poderiam ser utilizados como modelo para a compreensão das teorias sobre a origem da multicelularidade dos organismos multicelulares.

Uma característica preponderante do ciclo nuclear no *R. seeberi* é a visível redução do tamanho nuclear ao longo da progressão do seu ciclo celular. Apesar de Ashworth (1923), Azevedo (1958) e Karunaratne (1964) terem ilustrado com fotografias a atividade nuclear desse microrganismo, esses autores, não mencionaram essa redução do tamanho dos núcleos ao longo do processo de maturação dos esporângios. Entretanto, encontramos que o núcleo central dos EJ era maior do que aqueles presentes nos EI e EM, como está ilustrado nas figuras: 4, 7, 8, 33, 34, 36, 37, 38 e 41. Karunaratne em 1964, também ilustrou com numerosas figuras os mesmos fenótipos encontrados em nossa investigação.

Em nosso estudo, observamos que os EJ sempre apresentavam um núcleo com diâmetro entre 5 e 7 μm , em contraste com o tamanho do núcleo do hospedeiro, cujo diâmetro varia entre 9 e 12 μm (**Figura 34**). À medida que a divisão nuclear progride, os EI desenvolvem numerosos núcleos com diâmetro entre 2 e 5 μm sem parede celular. No estágio final de desenvolvimento dos EI observa-se a presença de núcleos com diâmetro entre 2 e 4 μm (**figuras 33 a 38**). Curiosamente, os endosporos (5 a 12 μm de diâmetro) dentro dos EM sempre apresentaram um núcleo com diâmetro entre 2 e 4 μm , o que já havia sido relatado por outros autores por meio de achados por microscopia eletrônica (KANNAN-KUTTY E TEH, 1975; MENDOZA E VILELA, 2012; PEREIRA *et al.*, 2005; VANBREUSEGHEM, 1973). Além disso, com base nas dimensões nucleares e na intensidade do brilho do DAPI, acredita-se que o tamanho do genoma do *R. seeberi* é possivelmente pequeno. Essa hipótese estaria de acordo com as nossas observações, de que os EJ apresentam menor intensidade do DAPI, uma vez que possuem maior dimensão nuclear e a cromatina estaria dispersa em um volume maior, como se ilustra na Figura 34. Em contraste, os núcleos dos EI e endosporos apresentaram um brilho mais intenso do DAPI ilustrado nas figuras 36 e 37. Isto poderia ser explicado pela

compactação do material nuclear o que ocuparia um volume menor (**figuras 36 e 37**).

O achado de numerosas partículas minutas que retêm o marcador DAPI (azul), intensamente brilhantes, com diâmetro entre 0,5 e 2,0 μm , dispersas no citoplasma dos EJ e EI foi um encontro inesperado (**figuras 34 a 38**). Notavelmente, essas partículas azuis sempre observadas nos EJ e EI, não foram visualizadas em nenhum momento nos EM, endosporos ou no tecido dos hospedeiros (**figuras 39 a 41**). Herr *et al* (1999b) demonstraram por microscopia eletrônica a presença de numerosas mitocôndrias de crista plana nos EI do *R. seeberi*. Baseados neste fato e na característica natural que possui o marcador DAPI de ligar-se à fita dupla do DNA (KUBOTA Y., KUBOTA K. E TANI, 2000), essas partículas puntiformes poderiam ser interpretadas como o DNA mitocondrial. A utilização do DAPI para a detecção de DNA mitocondrial já foi demonstrada por outros autores (Dellinger e Gèaze, 2001). É possível que o número de mitocôndrias observado por esses autores e o número de partículas marcadas de azul no nosso estudo, sugere que os esporângios do *R. seeberi* necessitem de grande quantidade de energia para completar suas divisões nucleares sincronizadas. Estruturas semelhantes marcadas por DAPI têm sido descritas em outros sistemas (DELLINGER E GÈZE, 2001; MIYAKAWA *et al.*, 1987; SHIIBA *et al.*, 1997).

A presença de uma “zona germinativa” (ZG) nos EM do *R. seeberi* tem sido reportada por diversos autores (AZEVEDO, 1958; BADER E GRUEBER, 1970; MENDOZA *et al.*, 1999; VILELA E MENDOZA, 2012). Esta zona está sempre localizada no lado oposto ao poro de saída e contém endosporos imaturos pequenos com diâmetro entre 3 e 5 μm (AZEVEDO, 1958; MENDOZA *et al.*, 1999). Azevedo (1958) e Bader e Grueber (1970) foram os primeiros a descrever essa área intrigante dos EM. Os autores sugeriram que os pequenos endosporos imaturos pareciam ser ativamente formados nessa região. Azevedo (1958) ilustrou suas observações com diversas figuras mostrando o desenvolvimento dos pequenos esporos diretamente da parede celular dos EM. Mendoza *et al.* (1999) e Vilela e Mendoza (2012) também identificaram a produção de novos endosporos nessa mesma região.

Nossos dados utilizando DAPI confirmam que a ZG é preenchida por centenas de endosporos imaturos agrupados, cujos núcleos marcados por DAPI possuem diâmetro entre 2 e 4 μm (**Figura 41**). Esses endosporos parecem ter sido formados “*de novo*” nessa região, como previamente descrito por diversos autores (AZEVEDO, 1958; BADER E GRUEBER, 1970; MENDOZA *et al.*, 1999; VILELA E MENDOZA, 2012). Baseado nessas observações, nosso estudo sugere que o *R. seeberi* desenvolveu uma nova estratégia para garantir sua sobrevivência nos hospedeiros infectados. É provável que, além da produção de milhares de endosporos a partir da divisão nuclear sincronizada sem citocinese, a ZG seja ativada no estágio final da formação dos EI para iniciar a produção “*de novo*” dos endosporos. Durante experimentos *in vivo*, Mendoza *et al.* (1999) observaram que os EM frescos continuam desenvolvendo novos endosporos a partir da ZG, mesmo 24 horas após o início da liberação dos endosporos. Os autores também mencionam que os pequenos endosporos imaturos produzidos na ZG, atingem a maturidade de um endosporo (5 a 12 μm de diâmetro) à medida que avançam para o centro do EM em direção ao poro de saída, o que sugere a total maturação antes da liberação. Essa nova estratégia é um salto evolutivo do *R. seeberi* para promover a sobrevivência desse patógeno em ambientes desfavoráveis; uma abordagem ainda a ser relatada em outros eucariotas. Acredita-se que a formação da parede celular em torno de cada núcleo ocorre no estágio final dos EI. Neste momento, os esporângios atingem um diâmetro $\leq 300 \mu\text{m}$ e tornam-se maduros. A citocinese é um evento único que ocorre, mais provavelmente, em um EI com fenótipo semelhante ao da Figura 33.

Um encontro intrigante foi a intensa detecção pela faloidina de uma substância semelhante à actina. Esta substância estava presente na camada interna abaixo da parede celular dos EI. Quando o controle negativo foi sobreposto ao Actin RedTM 555 (TRITC) no canal 3 (laser de estado sólido / excitação: 559 nm / filtro de emissão: 575-675 nm; vermelho) esta camada interna não demonstrou auto-fluorescência (**Figura 38**). Essa substância, apesar de caracteristicamente presente em todos os EI, foi levemente detectada na fina camada interna de alguns EJ (**Figura 33**). Entretanto, não foi identificada em nenhum dos EM ou endosporos (**figuras 39 a 41**). A expressão de um material antigênico na camada interna dos EI foi descrita (HERR *et al.*, 1999a). Esses pesquisadores notaram que a camada interna dos EI e EM foi intensamente detectada por anticorpos presentes no soro de pacientes com

rinosporidiose. A localização dessa substância antigênica descrita por Herr *et al.* (1999a) nos EI mostra que esta pode ser a mesma substância semelhante à actina detectada do nosso estudo. Entretanto, os anticorpos presentes no soro dos pacientes infectados também identificaram a camada interna dos EM. Em nosso estudo, a faloidina não detectou a camada interna dos EM. É possível, então, que a camada interna original dos EI tenha sofrido modificações consideráveis, as quais não interferiram nas propriedades antigênicas nos EM, mas, provavelmente, sua estrutura química foi modificada. Estruturas incomuns da actina já foram reportadas em outro estudo (ALLIGHAM, KLENCHIN E RAYMENT, 2006) e, desta forma, nosso achado é relevante para o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos para o tratamento da rinosporidiose.

Uma hipótese a ser verificada no início deste estudo era se os filamentos presentes junto aos núcleos em divisão corados por H&E eram compostos por actina. Entretanto, em nenhum dos EI em divisão nuclear foi observada a ligação da faloidina no entorno dos núcleos. Considerando essa observação, podemos sugerir primeiramente que os filamentos do fuso mitótico do *R. seeberi* não contém actina. Contudo, outra possibilidade é que a actina nesse patógeno possua alguma modificação estrutural que dificulte ou impossibilite sua detecção pela faloidina, como no caso de parasitos apicomplexos, como o *Plasmodium* sp. Estes parasitos possuem filamentos muito curtos de actina, o que resulta numa baixa resolução por microscopia de fluorescência (SCHMITZ *et al.*, 2005; SCHÜLER, MUELLER E MATUSCHEWSKI, 2004).

Algumas amostras de tecido utilizadas em nosso estudo apresentaram diferentes capacidades de reter o DAPI e a faloidina. Por exemplo, o tecido do cavalo apresentou uma forte capacidade de marcação para os dois fluorocromos. Por outro lado, os tecidos do gato, cão e humano apresentaram diferentes intensidades de marcação, sendo todas inferiores à intensidade apresentada pelo tecido do cavalo (**Figura 32**). É importante ressaltar que a amostra do cavalo foi fixada em formalina em 2009, enquanto as outras três amostras foram fixadas há dez ou mais anos. Com base nessas observações, é provável que a idade das amostras interfira diretamente na capacidade de ligação dos marcadores utilizada na microscopia confocal. Além disso, a amostra do cão, especificamente, recebeu um tratamento

um pouco diferente. Uma vez que não possuíamos o bloco de parafina da amostra, utilizamos uma lâmina corada por H&E, a qual foi descorada e posteriormente submetida aos protocolos de marcação com DAPI e faloidina. Esse processo de descoloração, além da idade da amostra, podem ter influenciado na menor intensidade do DAPI e faloidina. Entretanto, este inconveniente não foi um problema para a identificação da atividade nuclear nas estruturas presentes nas amostras.

Finalmente, os endosporos dentro dos EM apresentaram sutil autofluorescência nas amostras coradas por H&E, principalmente com o laser diodo (405 nm; azul) e argônio (488 nm; verde) (**Figura 31**), enquanto os demais fenótipos (EJ e EI) não apresentaram fluorescência. Este resultado é semelhante ao observado para a autofluorescência por luz UV, descrita por outros autores (SENBA, 1985; ALONSO, 1987).

É importante ressaltar que nas lâminas coradas por H&E toda a estrutura dos endosporos estava fluorescente e não foi observada fluorescência na ZG, ao contrário das amostras marcadas com DAPI nas quais apenas o núcleo dos endosporos maduros e dos imaturos (ZG) brilharam intensamente (**Figura 41**). Nenhum dos fenótipos do *R. seeberi* presentes na amostra não marcada (controle negativo) apresentou autofluorescência, o que indica que a fluorescência observada nas amostras marcadas pelo DAPI e faloidina é confiável, ou seja, proveniente apenas da ligação específica dos marcadores selecionados para o nosso estudo.

7 CONCLUSÃO

1. Nos últimos 100 anos os investigadores descreveram estruturas nucleares nos endosporos contidos dentro dos EM do *R. seeberi*. Recentemente, estudos reforçam que este microrganismo anômalo, possui fases mitóticas próprias de um organismo eucarionte. O resultado desta investigação confirma que as estruturas anteriormente observadas contêm ácidos nucléicos.
2. Os filamentos de actina nuclear não foram visualizados com a utilização da metodologia proposta. Entretanto, o reativo de faloidina, detectou uma substância semelhante à actina nas camadas internas dos EI. Interessantemente, os EM e os endosporos estavam desprovidos desta substância.
3. A microscopia confocal demonstrou possuir uma resolução maior, além de proporcionar imagens de terceira dimensão. Comparativamente com as técnicas de fluorência convencionais, a microscopia confocal demonstrou possuir auto-fluorescência mínima nos endosporos corados com H&E.
4. A coloração de H&E é utilizada para demonstrar a estrutura tecidual em um único plano, enquanto a microscopia confocal possibilita o uso de marcadores específicos e, as estruturas podem ser visualizadas em diferentes planos. Esta característica possibilitou a visualização dos núcleos dos diferentes fenótipos do *R. seeberi*.
5. O ciclo de vida do *R. seeberi* foi amplamente estudado desde sua descrição no ano de 1900. Em termos gerais, o ciclo celular começa com a formação dos endosporos dentro dos EM. Estes são liberados para o tecido, onde os mesmos aumentam seu volume devido à multiplicação dos núcleos internos, que culmina com a formação do EM. Assim, o ciclo se repete. Esta descrição clássica contrasta com os resultados publicados recentemente e nos resultados deste estudo. Estas observações demonstraram que o *R. seeberi* possui um ciclo nuclear complexo incluindo a multiplicação nuclear sem citocinese, e a formação de endosporos procedente de uma região denominada zona germinativa.

8 PERSPECTIVAS

8.1 Tratamento

O nosso estudo demonstrou que o *R. seeberi* possui um ciclo nuclear complexo, que inclui divisões nucleares sem citocinese. Este fato indica que durante o ciclo nuclear deste microrganismo, a expressão de proteínas reguladoras deste processo poderia ser utilizada como alvos para a pesquisa de novos fármacos para o tratamento desta enfermidade que resiste às terapias convencionais presentes no mercado.

8.2 Diagnóstico molecular

Devido às interpretações confusas propostas por vários autores, caracterizando o *R. seeberi* como cianobactéria, fungo, alga ou protista, nosso estudo indica que a utilização de sondas moleculares, por hibridização “in situ”, poderia ser de grande ajuda para detectar os processos de divisão nuclear ainda a serem pesquisados durante o ciclo de vida deste organismo anômalo.

8.3 Caracterização filogenética

Os estudos filogenéticos convencionais tem sido baseados no sequenciamento do rRNA, a saber: 18S e ITS. Os resultados do presente estudo mostram que o *R. seeberi* possui proteínas relacionadas com a divisão nuclear sem citocinese (e, portanto, únicas deste microrganismo) que poderiam acrescentar novos parâmetros a serem utilizados para validação dos estudos filogenéticos até então publicados.

REFERÊNCIAS

- ABEN-ATHAR, J. Um caso de Rhinosporidiose. **Rev Acad Med**, Belém, Pará Brasil. v. 2, p. 3–7, 1944.
- ABUD, L. do N.; PEREIRA, J.C. Rinosporidiose nasal – Relato de quatro casos e revisão de literatura. **Arq Int Otorrinolaringol**, v. 11, n. 2, p. 214-19, Abr-Jun 2007.
- ADL, S.M. et al. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **J Eukaryot Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 399–451, Sep-Oct 2005.
- AFIP. Wednesday Slide Conference (WSC) n. 30, case 1. Washington DC, **Armed Forces Institute of Pathology**, 1998.
- AGRAWAL, S.; SHARMA, K.D.; SHRIVASTAVA, J.B. Generalized rhinosporidiosis with visceral involvement; report of a case. **AMA Arch Derm**, v. 80, n. 1, p. 22-6, Jul 1959.
- AHLUWALIA, K. B. New interpretations in rhinosporidiosis, enigmatic disease of the last nine decades. *J. Sumbmicrosc.* **Cytol. Pathol**, v. 24, n. 1, p. 109-114, Jan 1992.
- ALHUWALIA, K.B. et al. Association of tapioca and chronic inflammation with rhinosporidiosis. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 3, p. 25–7, 1994.
- ALHUWALIA KB. Causative agent of rhinosporidiosis. Author's reply. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 413–5, Jan 2001.
- AHLUWALIA, K.B. Culture of the organism that causes rhinosporidiosis. **J Laryngol Otol**, v. 113, n. 6, p. 523–528, Jun 1999.
- AHLUWALIA, K.B.; MAHESWARI, N.; DEKA, R.C. Rhinosporidiosis: a study that resolves etiologic controversies. **Am J Rhinol**, v. 11, n. 6, p. 479–483, Nov-Dec 1997.
- ALHUWALIA, K.B.; DHAULAKHANDI, D.B.; GARG, L.C. Sequence analysis of 16S rDNA gene in *Rhinosporidium seeberi* shows similarity to plant chloroplast DNA. **Bioinformation**, v. 5, n. 3, p. 89–96, Sep 2010.
- ALLEN, F.R.W.K.; DAVE, M.L. Treatment of rhinosporidiosis in man based on sixty cases. **The Indian Medical Gazette**, v. 71, p. 376-395, 1936.
- ALLINGHAM, J.S.; KLENCHIN, V.A.; RAYMENT, I. Actin-target natural products: structures, properties and mechanisms of action. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 18, p. 2119-34, Sep 2006.
- ALLISON, N. et al. Nasal rhinosporidiosis in two dogs. **J Am Med Assoc**, v. 188, n. 8, p. 869-71, Apr 1986.

ALONSO, M.J. et al. Description of a case of rhinosporidiosis in Spain. **Mycopathologia**, v. 97, n. 1, p. 9-16, Jan 1987.

AMRITANAND, R. et al. Disseminated rhinosporidiosis destroying the talus: a case report. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 16, n. 1, p. 99-101. Apr 2008.

ANSTEAD, G.M.; SUTTON, D.A.; GRAYBILL, J.R. Adiaspiromycosis causing respiratory failure and a review of human infections due to *Emmonsia* and *Chrysosporium* spp. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 1346-54, Apr 2012.

ARSECULERATNE, S.N. et al. Failure to infect congenitally immunodeficient SCID and NUDE mice with *Rhinosporidium seeberi*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 393-5, Oct 2000.

ARSECULERATNE, S.N. Recent advances in rhinosporidiosis and *Rhinosporidium seeberi*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 119-31, Jul-Sep 2002.

ARSECULERATNE, S.N. et al. Anti-rhinosporidial antibody levels in patients with rhinosporidiosis and in asymptomatic persons, in Sri Lanka. **Mycopathologia**, v. 158, n. 2, p. 157-64, Aug 2004.

ARSECULERATNE, S.N.; MENDOZA, L. Rhinosporidiosis. In: Merz, W. G., Hay, R. (editors) **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**, 10th edition Hodder Arnold: ASM Press. p. 436-75, 2005.

ARSECULERATNE, S.N.; PANABOKKE, R.G.; ATAPATTU, D.N. Lymphadenitis, trans-epidermal elimination and unusual histopathology in human rhinosporidiosis. **Mycopathologia**, v. 153, n. 2, p. 57-69, 2001.

ARSECULERATNE, S.N.; SUMATHIPALA, S.; ERIYAGAMA, N.B. Patterns of rhinosporidiosis in Sri Lanka: comparison with international data. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 41, n. 1, p. 175-191, Jan 2010.

ASHWORTH, J.H. On *Rhinosporidium seeberi* (Wernicke, 1903) with special reference to its sporulation and affinities. **Trans Roy Soc Edin**, v. 53, n. 2, p. 301-42, 1923.

AYUB-UR-REHMAN; MUHAMMAD, M.N.; MOALLAM, F.A. Rhinosporidiosis. **J Coll Physicians Surg Park**, v. 22, n. 10, p. 671-2, Oct 2012.

AZAD, N.S.; AHMAD, Z.; KAYANI, N. Rhinosporidiosis presenting as an urethral polyp. **J Coll Physicians Surg Pak**, v. 18, n. 5, p. 314-5, May 2008.

AZADEH, B.; BAGHOUMIAN, N.; EL-BAKRI, O.T. Rhinosporidiosis: immunohistochemical and electron microscopic studies. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 108, n. 12, p. 1048-54, Dec 1994.

AZEVEDO, P. C. de. ***Rhinosporidium seeberi*: Considerações sobre morfologia, ciclo parasitário e posição sistemática.** Tese. Belém, Pará, Brasil: Faculdade de Medicina, Universidade do Pará; 1958. p. 1–108.

AZIZI, M.H. Photoclinic - Rhinosporidiosis. **Arch Iranian Med**, v. 9, n. 1, p. 81-82, 85, Jan 2006.

BADER, G.; GRUEBER, H.L.E. Histochemical studies of *Rhinosporidium seeberi*. **Virchows Arch A**, v. 350, n. 1, p. 76–86, 1970.

BANDYOPADHYAY, S.N. et al. Disseminated rhinosporidiosis. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 127, n. 10, p. 1020-24, Oct 2013.

BANJARA, H. et al. Bronchial rhinosporidiosis: An unusual presentation. **Lung India**, v. 29, n. 2, p. 173–175, Apr-Jun 2012.

BEATTIE, J.M. *Rhinosporidium kinealyi*: a sporozoon of the nasal mucous membrane. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 11, n. 3, p. 270-75, 1906.

BELLIVEAU, M.J. et al. Bloody tears from lacrimal sac rhinosporidiosis. **Can J Ophthalmol**, v.47, n. 5, p. e23-24, Oct 2012.

BELOU, P. **Tratado de Parasitología Animal: Ilustrado con 301 figuras intercaladas en el texto y 16 láminas en cromo-litografía**, vol. 303. Buenos Aires, Argentina: Arsenio Guidi Buffarini (ed.), 1903. p. 62.

BERROCAL, A.; LÓPEZ, A. Nasal rhinosporidiosis in a mule. **Can Vet J**, v. 48, n. 3, p. 305-6, Mar 2007.

BHARGAVA, S.; GROVER, M.; MAHESHWARI, V. Rhinosporidiosis: intraoperative cytological diagnosis in an unsuspected lesion. **Case Reports in Pathology**, v. 2012, n. 101832, p. 1-3, Sep 2012.

BOCACCI, J.; BECKER, P.F. Sobre um caso de rhinosporidiose palpebral e conjuntival. **Med Cirur**, v. 11, n. 3, p. 42-43, 1949.

BONI, E.S. et al. Rinosporidiose na conjuntiva – Relato de caso. **Arq Bras Oftalmol**, v. 65, n. 1, p. 103-5, Jan-Fev 2002.

BRELJE, T.C.; WESSENDORF, M.W.; SORENSON, R. L. Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. In: MATSUMOTO, B.; editor. **Methods in cell biology: cell biological applications of confocal microscopy**, v. 38. San Diego, California: Academic Press, 1983. chap. 4, 97-181.

BRENSEKE, B.M.; SAUNDERS, G.K. Concurrent nasal adenocarcinoma and rhinosporidiosis in a cat. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, n.1, p. 155–157, Jan 2010.

BREVIS, P. et al. Um nuevo caso clínico de rinosporidiosis en Chile. **Rev Iberoam Micol**, v. 27, n. 4, p. 183-5, Oct-Dic 2010.

BURGESS, H.J. et al. Equine laryngeal rinosporidiosis in western Canada. **J Vet Diagn Invest**, v. 24, n. 4, p. 777-80, Jul 2012.

CAPUA, M. Considerações em torno de seis observações de pólipos sangrantes do septo. **An Paulistas Med Cirurg**, v. 47, p. 351, 1944.

CAPUTO, L.F.G.; GITIRANA, L. de B.; MANSO, P.P. de A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.) **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOV, 2010. cap. 3, p. 89-188.

CARINI, A. Sobre um parasito semelhante ao "*Rhinosporidium*", encontrado em quistos da pele de uma "Hyla". **Arq Inst Biol**, v. 11, p. 93-96, 1940.

CHITRAVEL, V. et al. Recurrent rinosporidiosis in man-case reports. **Mycopathologia**, v. 73, n. 2, p. 79-82, Feb 1981a.

CHITRAVEL, V. et al. Cell mediated immune response in human cases of rinosporidiosis. **Sabouraudia**, v. 19, n. 2, p. 135-142, Jun 1981b.

CHITRAVEL, V. et al. Detection of circulating antigen in patients with rinosporidiosis. **Sabouraudia**, v. 20, n. 3, p. 185-91, Sep 1982.

CHOUDHURY, M. *Rhinosporidium seeberi* in nasal smears. **Diagnostic Cytopathology**, v. 39, n. 8, p. 593-4, Oct 2010.

COELHO, B. Um caso de rinosporidiose nasal. **Res Clin Cient**, v. 9, n. 9, p. 521-24, 1942.

COETZEE, T. Rhinosporidiosis of the conjunctiva. **Brit J Ophthal**, v. 43, p. 309-11, May 1959.

COHEN, J. et al. Oculosporidiosis. **Arch Ophthalmol**, v. 115, n. 10, p. 1340-1, Oct 1997.

CROSARA, P.F.T.B. et al. Rinosporidiose nasal: diagnóstico diferencial de sinusite fúngica e papiloma invertido. **Arq Int Otorrinolaringol**, v.13, n. 1, p. 93-95, Jan-Mar 2009.

CRUZ, E. M. de la; POLLARD, T. D. Transient Kinetic Analysis of Rhodamine Phalloidin Binding to Actin Filamentst. **Biochemistry**, v. 33, n. 48, p. 14387-92, Dec 1994.

DAS, S. et al. A. Nasal rinosporidiosis in humans: new interpretations and a review of the literature of this enigmatic disease. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 311–315, Apr 2011.

DATTA, S. *Rhinosporidium seeberi*, its cultivation and identity. **J Vet Sci Anim Husban**, v. 35, p. 1–17, 1965.

DAVIDSON, W.R.; NETTLES, V.F. Rhinosporidiosis in a wood duck. **J Am Med Assoc**, v. 171, n. 9, p. 989-90, Nov 1977.

DE DONCKER, R.M.L. et al. Scleral melting in a patient with conjunctival rhinosporidiosis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 74, n. 10, p. 635-37, Oct 1990.

DEAN, P.N. Unit 2.8 Confocal microscopy: principles and practices. **Current protocols in cytometry**, p. 5.2.8.1-5.2.8.12, 2001.

DELLINGER, M.; GÈZE, M. Detection of mitochondrial DNA in living animal cells with fluorescence microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 204, pt. 3, p. 196-202, Dec 2001.

DESHMUKH, R.S.; KARANDE, P. A case of swelling in the right maxilla. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 15, n. 1, p. 119-20, Jan-Apr 2011.

DESHPANDE, A.H.; AGARWAL, S.; KELKAR, A.A. Primary cutaneous rhinosporidiosis diagnosed on FNAC: a case report with review of literature. **Diagnostic Cytopathology**, v. 37, n. 2, p. 125-7, Nov 2008.

DHAULAKHANDI, D.B. et al. Comparative RAPD analysis of causative agent of rhinosporidiosis and *Microcystis* isolated from waters. **Curr Sci**, v. 86, n. 3, p. 386–8, Feb 2004.

DHAULAKHANDI, D.B. et al. Detection of 16S rDNA gene in round bodies isolated from polyps of rhinosporidiosis. **Infect Gen Evol**, v. 6, n. 4, p. 331–6, Jul 2006.

DHAYAGUDE, R.G. Unusual rhinosporidial infection in man. **Indian Med Gaz**, v. 76, p. 513-5, Sep 1941.

DICK, A.M. Nasal Rhinosporidiosis – Report of a case in Natal. **S Afr Med J**, v. 25, n. 16, p. 270-1, Apr 1951.

EASLEY, J.R. et al. Nasal Rhinosporidiosis in the Dog. **Vet Pathol**, v. 23, n. 1, p. 50-6, Jan 1986.

ECHEJOH, G.O. et al. Nasal rhinosporidiosis. **J Natl med Assoc**, v. 100, n. 5, p. 713-5, Jun 2008.

EIRAS, J.C.; SILVA-SOUZA, A.T. A *Dermocystidium* infection in *Trichomycterus* sp. (Osteichthyes, Trichomyctaridae). **Parasite**, v. 7, n. 4, p. 323-6, Dec 2000.

ELLES, N.B. Rhinosporidiosis seeberi infection in the eye. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 38, p. 369-97, 1940.

ELLIOT, R.H.; INGRAM, A.C. A case of *Rhinosporidium kinealyi* of the conjunctiva. **Ophthalmoscope**, v. 10, p. 428-30, 1912.

FAIN, A.; HERIN, V. Deux cas de rhinosporidiose nasale chez oie et un canard sauvages a Astrida (Ruanda-Urundi). **Mycopathol Mycol Appl**, v. 8, n. 1, p. 54-61, Feb 1957.

FELDMAN, S.H.; WIMSATT, J.H.; GREEN, D.E. Phylogenetic classification of the frog pathogen *Amphibiothecum (Dermosporidium) penneri* based on small ribosomal subunit sequence. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 701-6, Oct 2005.

FERREIRA FILHO, A.; SALLES, F.J.M. Rinosporidiose nasal. **Arq Inst Penido Burnier (São Paulo)**, v. 8, p. 104-12, 1949.

FERRI, A.G.; NEVES, J.G. Rinosporidiose em luar. **Rev Fac Med Vet S Paulo**, v. 5, n. 2, p. 215-26, 1954.

FIALHO, A. et al. Um caso de rhinosporidiose nasal (nota prévia). **O Hospital**, v. 17, n. 6, p. 945-6, 1940.

FIALHO, A. **Localizações pulmonares da micose de Lutz**. Tese. Rio de Janeiro. Jornal do Comércio, 1946.

FIROUZ-ABADI, A.; MOGHIMI, M.; AZAD, Y. Rhinosporidiosis in Iran (Persia) – a study of seventy-four cases. **Mycopathologia et Mycologia applicata**, v. 44, n. 3, p. 249-60, May 1971.

FRANÇA Jr., G.V. et al. Rinosporidiose nasal na infância. **Jornal da Pediatria**, v. 70, n. 5, p. 299-301, Set-Out 1994.

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, May-Jun 2000.

FRICKMANN, H. et al. Detection of tropical fungi formalina-fixed, paraffin-embedded tissue: still a indication for microscopy in times of sequence-based diagnosis? **Biomed Res int**, v. 2015, n. 938721, p. 1-11, Apr 2015.

GORI, S.; SCASSO, A. Cytologic and differential diagnosis of rhinosporidiosis. **Acta Cytol**, v. 38, n. 3, p. 361-6, May-Jun 1994.

GHORPADE, A. Rhinosporidiosis: gigantic cells with engufed sporangia of *Rhinosporidium seeberi* in the case of dermosporidiosis. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 7, p. 694-5, Jul 2008.

GHORPADE, A.; RAMANAN, C. Verrucoid cutaneous rhinosporidiosis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 10, p. 269-270, May 1998.

GICHUHI, S. et al. Ocular rhinosporidiosis mimicking conjunctival squamous papilloma in Kenya – a case report. **BMC Ophthalmology**, v. 14, n. 45, p. 1-4, Apr 2014.

GOSH, A. et al. Rhinosporidiosis – unusual presentations. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 60, n. 2, p. 159-62, Apr-Jun 2008.

GRÄF, R.; RIETDORF, J.; ZIMMERMANN, T. Live cell spinning disk microscopy. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, v. 95, p. 57-75, 2005.

GROVER, S. *Rhinosporidium seeberi*: a preliminary study of the morphology and life cycle. **Sabouraudia**, v. 7, p. 219–31, Feb 1969.

GUARNER, J.; BRANDT, M.E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 2, p. 247-80, Apr 2011.

HARISSI-DAGHER, M. et al. Histopathologically confirmed ocular rhinosporidiosis in two Canadians. **Can J Ophthalmol**, v. 41, n. 2, p. 226-9, Apr 2006.

HERR, R.A. et al. Immunolocalization of an endogenous antigenic material of *Rhinosporidium seeberi* expressed only during mature sporangial development. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 23, p. 205-12, n. 3, Mar 1999a.

HERR, R.A. et al. Phylogenetic analysis of *Rhinosporidium seeberi*'s 18S small-subunit ribosomal DNA groups this pathogen among members of the protistan Mesomycetozoa clade. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 9, p. 2750–4, Sep 1999b.

INGRAM, A.C. *Rhinosporidium kinealyi* in unusual situations. **Lancet**, v. 2, p. 726, 1910.

JACOB, P. et al. Tectonic corneal graft for conjunctival rhinosporidiosis with scleral melt. **Indian J Ophthalmol**, v. 59, n. 3, p. 251–253, May-Jun 2011.

JAIN, S.N.; RAO, P.V.R. Rhinosporidiosis. **IJO &HNS**, v. 49, n. 1, p. 5-10, Jan-Mar 1997.

JOB, A. et al. Medical therapy of rhinosporidiosis with dapsone. **J Laryngol Otol**, v. 107, n. 9, p. 809-12, Sep 1993.

JUSTICE, J.M. et al. Progressive left nasal obstruction and intermittent epistaxis. **JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, v. 139, n. 9, p. 955-956, Sep 2013.

KAIMBO, KW.D.; PARYS-VAN GINDERDEUREN, R. Conjunctival rhinosporidiosis: a case report from a Congolese patient. **Bull Soc Belge Ophthalmol**, v. 309-310, p. 19-22, 2008.

KAMESWARAN, M. et al. KTP-532 laser in the management of rhinosporidiosis. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 57, n. 4, p. 298-300, Oct-Dec 2005.

KANNAN-KUTTY, M.; GOMEZ, J. B. The ultrastructure and the life history of *Rhinosporidium seeberi*. **S E Asian J Trop Med Publ Health**, v. 2, n. 1, p. 9-16, Mar 1971.

KANNAN-KUTTY, M.; TEH, E.C. *Rhinosporidium seeberi*: an ultrastructural study of its life cycle. **Pathology**, v. 6, p. 63-70, 1974a.

KANNAN-KUTTY, M.; TEH, E.C. *Rhinosporidium seeberi*: cell wall formation in sporoplasts. **Pathology**, v. 6, p. 183-185, 1974b.

KANNAN-KUTTY, M.; TEH, E.C. *Rhinosporidium seeberi*: an ultrastructural study of its endosporulation phase and trophocyte phase. **Arch Pathol**, v. 99, n. 1, p. 51-4, 1975.

KARPOVA, M. F. On the morphology of rhinosporidiosis. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 23, n. 4, p. 281-286, Nov 1964.

KARUNARATNE, W.A.E. The pathology of rhinosporidiosis. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 42, n. 1, 193-202, Jan 1936.

KARUNARATNE, W. A. E. **Rhinosporidiosis in man**. London, Toronto, New York: University of London: The Athlone Press. 1964. 146 p.

KAYE, H. A case of rhinosporidiosis on the eye. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 22, n. 8, p. 449-55, Aug 1938.

KENNEDY, F.A.; BUGGAGE, R.R.; AJELLO, L. Rhinosporidiosis: a description of an unprecedented outbreak in captive swans (*Cygnus* spp.) and a proposal for revision of the ontogenic nomenclature of *Rhinosporidium seeberi*. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 33, n. 3, p. 157-165, May-Jun 1995.

KRISHNAMOORTHY, S. et al. Culture of *Rhinosporidium seeberi*: preliminary report. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 103, n. 2, p. 178-80, Feb 1989.

KUBOTA, Y.; KUBOTA, K.; TANI, S. DNA binding properties of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) analogs having an imidazoline ring or a tetrahydropyrimidine ring: Groove-binding and intercalation. **Nucleic Acid Symp Ser.** n. 44, p. 53-4, 2000.

KUNDU, A.K. et al. Osseous involvement in rhinosporidiosis. **Indian J Orthop**, v 47, n. 5, p. 523-5, Sep-Oct 2013.

KURIAKOSE, E.T. Oculosporidiosis – rhinosporidiosis of the eye. **Brit J Ophthal**, v. 47, p. 346-9, Jun 1963.

KUTNICK, S.L.; KERTH, J.D. Rhinosporidiosis. **Laryngoscope**, v. 86, n. 10, p. 1579-83, Oct 1976.

KUTTY, M.K.; UNNI, P.N. Rhinosporidiosis of the urethra. **Trop Geog Med**, v. 21, p. 338-40, 1969.

LAI, R.; RÍOS, B.; SÁNCHEZ, G. Rhinosporidiosis. **Rev Méd Panamá**, v. 11, n. 2, p. 82-6, May 1986.

LASSER, A.; SMITH, H.W. Rhinosporidiosis. **Arch Otolaryngol**, v. 102, n. 5, p. 308-10, May 1976.

LAVERAN, A.; PETIT, A. Sur une épizootic des truites. **C R Acad Sci Paris**, v. 151, p.421-23, 1910.

LAXMISHA, C.; THAPPA, D.M. Subcutaneous swellings due to rhinosporidiosis. **The Journal of Dermatology**, v. 32, n. 2, p. 150-2, Feb 2005.

LEEMING, G. et al. Equine rhinosporidiosis: an exotic disease in the UK. **Veterinary Record**, v. 160, n. 16, p. 552-554, Apr 2007.

LEI, P-P. et al. Comparison of methods to identify the presence of fibrocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded archival cardiac tissue with coronary heart disease. **Pathol Res Prac**, v. 210, n. 12, p. 929-33, Dec 2014.

LEIVA-GARCÍA, R.; GARCÍA-ANTÓN, J.; MUÑOZ-PORTERO, M.J. (2011). Application of confocal laser scanning microscopy to the in-situ and ex-situ study of corrosion processes. In: Wang, C-C.; editor. **Laser Scanning, Theory and Applications**. InTech. p. 431-48, Apr 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/laser-scanning-theory-and-applications/application-of-confocal-laser-scanning-microscopy-to-the-in-situ-and-ex-situ-study-of-corrosionproc>>. Acesso em 8 jan. 2015.

LEVY, M.G.; MEUTEN, D.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Cultivation of *Rhinosporidium seeberi* in vitro: interaction with epithelial cells. **Science**, v. 234, n. 4775, p. 474-6, Oct 1986.

LOH, K.S. et al. Rhinosporidiosis: differential diagnosis of a large nasal mass. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 124, n. 1, p. 121-2, Jan 2001.

LONDERO, A.T.; SANTOS, M.N.; FREITAS, C.J.B. Animal rhinosporidiosis in Brazil. Report of three additional cases. **Mycopathologia**, v. 60, n. 3, p. 171-3, Apr 1977.

MADANA, J. et al. Rhinosporidiosis of the upper airways and trachea. **The J Laryngol Otol**, v. 124, n. 10, p. 1139-41, Oct 2010.

MADKE, B. et al. Disseminated cutaneous with nasopharyngeal rhinosporidiosis: Light microscopy changes following dapsona therapy. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 52, n. 2, p. e4-6, May 2011.

MAYORGA, R. Prevalence of subcutaneous mycoses in Latin America. In: Pan American Health Organization. **Proceedings: International Symposium on Mycoses**. Washington, D.C.: PAHO; Feb 1970. (Scientific Publication 205).

MEARS, T.; AMERASINGHE, C. View from beneath: pathology in focus – Rhinosporidiosis. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 106, n. 5, p. 467, May 1992.

MEIER, W. A. et al. Cytologic identification of immature endospores in a dog with rhinosporidiosis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 3, p. 348-52, Sep 2006.

MELO, M.T. de. **Estudos sôbre o *Rhinosporidium seeberi***. Tese. Rio de Janeiro, Brasil: Estudos Gráficos, Muniz Press; 1946, p. 1–145.

MENDIOLA, R.; CORTES OCHOA, R. Rhinosporidiosis; first case encountered in Mexico. **Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop**, v. 11, n. 2-3-4, p. 159-165, Dec 1950.

MENDOZA, L. et al. In vitro studies on the mechanisms of endospore release by *Rhinosporidium seeberi*. **Mycopathologia**, v. 148, n. 1, p. 9–15, 1999.

MENDOZA, L.; VILELA, R. Presumptive synchronized nuclear divisions without cytokinesis in the *Rhinosporidium seeberi* parasitic life cycle. **Microbiology**, v. 159, pt. 8, p. 1545-51, Aug 2013.

MICRON OXFORD – Confocal microscopy; lecture 8. Disponível em: < http://www.micron.ox.ac.uk/microngroup/resources/Lecture_08_confocal.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.

MINCHIN, E.A.; FANTHAM, H.B. *Rhinosporidium kinealyi* n.g., n.sp. a new sporozoan from the mucous membrane of the septum nasi of man. **Q J Microsc Sci**, v. 49, p. 521-32, 1905.

MINSKY, M. **Microscopy Apparatus**. U.S. Patent n. 3013467, Nov 1957 (awarded 1961).

MINSKY, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. **Scanning**, v. 10, n. 4, p. 128-38, Aug 1988.

MITHAL, C.; AGARWAL, P.; MITHAL, N. Ocular and adnexal rhinosporidiosis: the clinical profile and treatment outcomes in a tertiary eye care centre. **Nepal J Ophthalmol**, v. 4, n. 1, p. 45-8, Jan-Jun 2012.

MIYAKAWA, I. et al. Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Sci**, v. 88, pt. 4, p. 431-9, Mar-Nov 1987.

MIZIARA, H.L.; SANTOS, F.A.M.; KALIL, R.K. Rinosporidiose nasal – Aspectos epidemiológicos e anátomo-patológicos em 10 casos. **Rev Pat Trop**, v. 1, n. 4, p. 473-80, 1972.

MOISAN, P.G.; BAKER, S.V. Rhinosporidiosis in a cat. **J Vet Diagn Invest**, v. 13, n. 4, p. 352–354, Jul 2001.

MONDAL, S.; CHOWDHURY, A. Rhinosporidiosis of the left wrist joint: a case report. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 21, n. 2, p. 245-8, Aug 2013.

MORA, J.A.; SALAZAR, J.A.; CALDERÓN, C.; GARCÍA, R. Rinosporidiosis en Costa Rica: revisión del tema e informe dell primero caso en nuestro país. **Acta Méd Costarric**, v. 28, n. 2, p. 122-5, May 1985.

MORELLI, L. et al. Human nasal rhinosporidiosis: an Italian case report. **Diagnostic Pathology**, v. 1, n. 25, p. 1-4, Aug 2006.

MOSES, J.S. et al. Epidemiology of rhinosporidiosis in Kanyakumari district of Tamil Nadu. **Mycopathologia**, v.101, n. 3, p. 177–9, Mar 1988.

MOSES, J.S. et al. *Rhinosporidium seeberi*: Light, phase contrast, fluorescent and scanning electron microscopic study. **Mycopathologia**. v. 114, n. 1, p. 17-20, Apr 1991.

MOSES, J.S.; BALACHANDRAN, C. Rhinosporidiosis in bovines of Kanyakumari district, Tamil Nadu, India. **Mycopathologia**, v. 100, n. 1, p. 23-6, Oct 1987.

MUKHERJEE, B. et al. Infection of the lacrimal sac by *Rhinosporidium seeberi*: a clinicopathological case report. **Indian J Ophthalmol**, v. 61, n. 10, p. 588-90, Oct 2013.

NAKANO, A. Spinning-disk confocal microscopy – a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. **Cell structure and function**, v. 27, n. 5, p. 349-55, Oct 2002.

NATH, A.K. et al. Disseminated rhinosporidiosis with unusual involvement of the nail apparatus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 34, n. 8, p. e886-8, Dec 2009.

NERURKAR, N.K. et al. Lacrimal sac rhinosporidiosis: a case report. **Am J Otolaryngol**, v. 25, n. 6, p. 423-5, Nov-Dec 2004.

NEVES, C.D. Rinosporidiose nasal canina: relato de caso no Brasil. **R Bras Ci Vet**, v. 21, n. 4, p. 223-25, Out-Dez 2014.

NGAMDU, Y.B. et al. Nasal rhinosporidiosis: a case report and review of literature. **Journal of case reports**, v. 4, n. 1, p. 26-8, Jan-Jun 2014.

O'KINEALY, F. Localised psorospermosis of the mucous membrane of the septum nasi. In: **Proceedings of the Laryngology Society of London**, v.10, p. 109–12, 1903.

PADDOCK, S.W. Confocal laser scanning microscopy. **BioTechniques**, v. 27, n. 5, p. 992-6, 998-1002, 1004, Nov 1999.

PADDOCK, S.W. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. **Molecular biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 127-49, Oct 2000.

PAL, D.K.; MOULIK, D.; CHOWDHURY, M.K. Genitourinary rhinosporidiosis. **Indian J Urol**, v. 24, n. 3, p. 419-21, Jul-Sep 2008.

PANDA, S. et al. Rhinosporidiosis in the parotid duct: a rare case report. **J Investig Clin Dent**, v. 4, n. 4, p. 271-4, Nov 2013.

PARODI, S. La rinosporidiosis em Sudamerica. **Medicina de los Paises Calidos**, v. 3, n.1, p. 55-62, 1930.

PEREIRA, C.N. et al. The pathogen of frogs and *Amphibiocystidium ranae* is a member of the order Dermocystida in the class Mesomycetozoa. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 192–8, Jan 2005.

PÉREZ, R.I.P. et al. Diagnóstico diferencial de la rinosporidiosis: a propósito de um caso. **Iatreia**, v. 25, n. 3, p. 272-6, Jul-Sep 2012.

PRAKASH, P. Y. Observations regarding the clinical manifestations and management of extranasal Rhinosporidiosis in Southern India. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 31, n. 4, p. 30-1, Feb 2009.

PRINS, C.; TANGE, R.A.; DINGEMANS, K.P. Rhinosporidiosis in The Netherlands. A case report including ultramicroscopic features. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**, v. 45, n. 5, p. 237-244, 1983.

PURI, R et al. Isolated tracheal rhinosporidiosis – a case report. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 52, n. 4, p. 380-1, Oct-Dec 2000.

RAGAN, M.A. et al. A novel clade of protistan parasites near the animal-fungal divergence. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n. 21, p. 11907–12, Oct 1996.

RAHAT, N.; SADIQ, S. Rhinosporidiosis. **Pak J Med Sci**, v. 21, n. 4, p. 494-96, Oct-Dec 2005.

RAO, M.A.N. Rhinosporidiosis in bovines in Madras Presidency, with discussion of probable mode of infection. **Ind J Vet Sc Anim Husb**, v. 8, p. 187, 1938.

RAVEENTHIRAN, V. Metastatic rhinosporidioma in a child. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 41, n. 4, p. 853-5, Apr 2006.

REDDY, D.; LAKSHMINARAYANA, C.S. Investigation into transmission, growth and serology in rhinosporidiosis. **Ind J Med Res**, v. 50, p. 363-70, 1962.

REIDY, J.J. et al. Infection of the conjunctiva by *Rhinosporidium seeberi*. **Surv Ophthalmol**, v. 41, n. 5, p. 409-13, Mar-Apr 1997.

ROLÓN, P. A. Rinosporidiosis - Epidemiologia en la Republica del Paraguay. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 52, n. 3-4, p. 155-171, Apr 1974.

RUCHMAN, J. Rhinosporidiosis (Seeber) – First occurrence in a female in North America. **Archives of Otolaryngology**, v. 30, n. 2, p. 239-46, Aug 1939.

SAHA, J. et al. Atypical presentations of rhinosporidiosis: a clinical dilemma? **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 63, n. 3, p. 243-6, Jul-Sep 2011.

SAHA, S. et al. A molecular approach (multiplex polymerase chain reaction) for diagnosis of rhinosporidiosis. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 54, n. 4, Oct-Dec 2002.

SATYNARAYANA, C. Rhinosporidiosis: with a record of 255 cases. **Acta otolaryngologica**, v. 51, n. 3-4, p. 348-66, Mar 1960.

SAVINO, D.F.; MARGO, C.E. Conjunctival rhinosporidiosis: light and electron microscopic study. **Ophthalmology**, v. 90, n. 12, p. 1482-1489, Dec 1983.

SCHMITZ, S. et al. Malaria parasite actin filaments are very short. **J Mol Biol**, v. 349, n. 1, p. 113-25, May 2005.

SCHÜLER, H.; MUELLER, A-N.; MATUSCHEWSKI, K. Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. **FEBS letters**, v. 579, n. 3, p. 655-60, Jan 2005.

SEEBER, G.R. *Rhinosporidium kinealyi* et *Rhinosporidium seeberi* une question de priorité. Buenos Aires, Argentina: **La Ciencia Médica**, 1912. p. 10.

SEEBER, G.R. **Un nuevo esporozuario parasito del hombre. Dos casos encontrados en polypos nasales.** Tese. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de Buenos Aires, Imprenta Libreria Boullosa, 1900.

SEFU, U.; FAUZIA, A. Human nasal rhinosporidiosis: a case report from Malawi. **Pan african Medical Journal**, v. 9, n. 27, p. 1-5, Jul 2011.

SEMWOGERERE, D.; WEEKS, E.R. Chapter 67 - Confocal microscopy. In: Wnek, G.; Bowlin, G.; editors. **Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering**, 2nd edition, London: Taylor & Francis. p. 705-14, May 2008.

SENBA, M.; YAMASHITA, H. Autofluorescence of *Rhinosporidium seeberi*. **Am J Clin Pathol**, v. 83, n. 1, p.132, Jan 1985.

SHETTY, V.; MOHAN, A. A rare case of disseminated rhinosporidiosis highlighting the need for specific management control. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology**, v. 25, n. 1, p. 61-4, Jan 2013.

SHIIBA, D. et al. Isolation of giant mitochondrial nucleoids from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Protoplasma**, v. 198, n. 3-4, p. 177-85, 1997.

SHRESTHA, S.P.; HENNIG, A.; PARIJA, S.C. Prevalence of rhinosporidiosis of the eye and its adnexa in Nepal. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 2, p. 231-4, Aug 1998.

SILVA, J.F.da. et al. Rinosporidiose nasal – Estudo de 11 casos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 9, n. 1, p. 19-25, Jan-Fev, 1975.

SILVA, N.R. de. et al. Cell-mediated immune responses (CMIR) in human rhinosporidiosis. **Mycopathologia**, v. 152, n. 2, p. 59-68, 2001.

SILVA, V. et al. Molecular evidence for multiple host-specific strains in the genus *Rhinosporidium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1865-8, Apr 2005.

SINGH, R.K. et al. Endobronchial rhinosporidiosis. **J Bronchol Intervent Pulmonol**, v. 20, n. 2, p.164-6, Apr 2013.

SINHA, A. et al. Clinicopathological study of rhinosporidiosis with special reference to cytodagnosis. **J Cytol**, v. 29, n. 4, p. 246-9, Oct-Dec 2012.

SOOD, N.; AGARWAL, M.C.; GUGNANI, H.C. Ocular rhinosporidiosis: a case report from Delhi. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 11, p. 825-27, Nov 2012.

SPANGGAARD, B.; HUSS, H.H.; BRESCIANP, J. Morphology of *Ichthyophonus hoferi* assessed by light and scanning electron microscopy. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, n. 6, p. 567-577, Nov 1995.

STACHOWSKY, L. Rhinosporidiosis. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 15, n. 1, p. 429-438, 1961.

SUÁREZ, M. H. et al. Reporte del primer caso de rinosporidiosis en la provincia Ciego de Avila, Cuba. **Bol. Micol**, v. 11, n. 1 2, p. 15-16, Jul-Dec 1996.

SUDARSHAN, V. et al. Rhinosporidiosis of the parotid duct presenting as a parotid duct cyst – a report of three cases. **Indian J Med Microbiol**, v. 30, n. 1, p. 108-11, Jan-Mar 2012.

SUDASINGHE, T. et al. The regional sero-epidemiology of rhinosporidiosis in Sri Lankan humans and animals. **Acta Tropica**, v. 120, n. 1-2, p. 72-81, Oct-Nov 2011.

SUGA, H.; RUIZ-TRILLO, I. Development of Ichthyosporean sheds light on the origin of metazoan multicellularity. **Dev Biol**, v. 377, n. 1, p. 284-92, May 2013.

SUH, L.H. et al. Ocular rhinosporidiosis presenting as chronic follicular conjunctivitis in a contact lens wearer. **Arch Ophthalmol**, v. 127, n. 8, p. 1076-77, Aug 2009.

SURYAWANSHI, P.V. et al. Rhinosporidiosis isolated to the distal clavicle: a rare presentation clinicoradiologically mimicking a bone tumor. **Skeletal Radiol**, v. 40, n. 2, p. 225-8, Feb 2011.

SYMMERS, W.ST.C. Deep-seated fungal infections currently seen in the histopathologic service of a medical school laboratory in Britain. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 5, p. 514-37, Nov 1966.

TEH, E. C.; KANNAN-KUTTY, M. *Rhinosporidium seeberi*: spherules and their significance. **Pathology**, v. 7, n. 2, p. 133-7, Apr 1975.

THANKAMANI, V. *Rhinosporidium seeberi* grown in culture. A ray of hope for the thousands of patients with rhinosporidiosis!!! **South Asian J Socio-Political Studies**, v. 5, p. 118–23, Jun 2005.

THANKAMANI, V.; LIPIN-DEV, M.S. Demonstration of viability and development stages of 10 years old refrigerated culture of *Rhinosporidium seeberi* (?) UMH.48 first ever isolated from nasal Rhinosporidiosis yet another milestone, a tribute to Guillermo Seeber. **IJPI's J Biotech Biother**, v.1 p. 11–21, 2011.

THANKAMANI, V.; LIPIN DEV, M.S. *Rhinosporidium seeberi* proven as a fungus for the first time after a century since its discovery. **Research in Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 41-46, 2012.

THIANPRASIT, M.; THAGERNGPOL, K. Rhinosporidiosis. In: McGinnis, M. R., Borges, M. (editors) **Curr Top Med Mycol**, v. 3. New York, N.Y: Springer Verlag, 1989, p. 64–85.

THOMAS, P.A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 730-97, Oct 2003.

THOMAS, T.; GOPINATH, N.; BETTS, R.H. Rhinosporidiosis of the brochus. **The British Journal of Surgery**, v. 44, n. 185, p. 316-9, Nov 1956.

TIRUMURTI, T.S. *Rhinosporidium kinealyi*. **Practitioner**, v. 93, p. 704-19, plates 1149-52, 1914.

TROTTE, M.N. de S. et al. Histopatologia de lesões tumoriformes presentes na cavidade nasal de eqüídeos do Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n. 9, p. 2535-39, Dez 2008.

TZELIKIS, P.F.de M. et al. Afilamento escleral em paciente com rinosporidiose conjuntival. **Rev Bras Oftalmol**, v. 66, n. 5, p. 337-40, Set-Out 2007.

UKETY, T.O. et al. Conjunctival rhinosporidiosis – report of three cases from Zaire. **Ann Soc Belge Med Trop**, v. 72, n. 3, p. 219-23, Sep 1992.

VALLARELLI, A.F.A; ROSA, S.P.; SOUZA, E.M.de. Rinosporidiose: manifestação cutânea. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 2, p. 373-4, Jul-Ago 2011.

VAN DER COER, J.M.G.I. et al. Rhinosporidiosis in Europe. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 106, n. 5, p. 440-443, May 1992.

VANBREUSEGHEM, R. Ultrastructure of *Rhinosporidium seeberi*. **Int J Dermatol**, v. 12, n. 1, p. 20-8, Jan-Feb 1973.

VARSHNEY, S. et al. Lacrimal sac diverticulum due to rhinosporidiosis. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 59, n. 4, p. 353-6, Oct-Dec 2007.

VÉLEZ, A.; SALAZAR, G.I.; MONSALVE, P. Rinosporidiosis ocular, presentación de tres casos e revisión de la literatura científica. **Infectio**, v. 15, n. 3, p. 202-204, Sep 2011.

VENKATACHALAM, V.P.; ANAND, N.; BHOOSHAN, O. Rhinosporidiosis: its varied presentations. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 59, n. 2, p. 142-4, Apr-Jun 2007.

VILELA, R.; MENDOZA, L. The taxonomy and phylogenetics of the human and animal pathogen *Rhinosporidium seeberi*: A critical review. **Rev Iberoam Micol**, v. 29, n. 4, p. 185-99, Oct-Dec 2012.

VON HAACKE, N.P.; MUGLISTON, T.A.H. Rhinosporidiosis. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 96, n. 8, p. 743-50, Aug 1992.

WATVE, J.K. et al. Lacrimal sac rhinosporidiosis. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 58, n. 4, p. 399-400, Dec 2006.

WELLER, C.V.; RIKER, A.D. *Rhinosporidium seeberi*: pathological hitology and reporto f the third case from the United States. **Am J Pathol**, v. 6, n. 6, p. 721-32, Nov 1930.

WILSON, W. D. et al. DNA Sequence Dependent Binding Modes of 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). **Biochemistry**, v. 29, n. 36, p. 8452-61, Sep 1994.

WRIGHT, R.E. *Rhinosporidium* kinealyi on the conjunctiva. **Indian Med Gaz**, v. 57, p. 82-3, 1922.

YADAV, S.K.; SHRESTHA, S. Rhinosporidiosis of the parotid duct. **Case Reports in Dentistry**, v. 2014, n. 131794, p. 1-5, 2014.

ZOROQUIAIN, P.; MORENO, A.; ODDÓ, D. Rinosporidiosis conjuntival diagnosticada mediante estudio histopatológico. **Rev. Chilena Infectol**, v. 31, n. 3, p. 213-5, Abr 2014.

ZSCHOKKE, E. Ein *Rhinosporidium* beim pferd. **Schweizer Arch Tierheilkd**, v. 55, p. 641-50, 1913.