



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

VANDBERGUE SANTOS PEREIRA

**DROGAS LEISHMANICIDAS: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
PENTAMIDINA SOBRE O COMPLEXO *Sporothrix schenckii* E ANTAGONISMO DO
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA COM ANTIFÚNGICOS CLÁSSICOS**

FORTALEZA

2017

VANDBERGUE SANTOS PEREIRA

DROGAS LEISHMANICIDAS: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PENTAMIDINA
SOBRE O COMPLEXO *Sporothrix schenckii* E ANTAGONISMO DO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA COM ANTIFÚNGICOS CLÁSSICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raimunda Sâmia
Nogueira Brilhante.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P496d Pereira, Vandbergue Santos.

Drogas leishmanicidas: Atividade antimicrobiana da pentamidina sobre o complexo *Sporothrix schenckii* e antagonismo do antimoníato de meglumina com antifúngicos clássicos / Vandbergue Santos Pereira. – 2017.

96 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. Drogas leishmanicidas. 2. *Sporothrix* spp.. 3. Sensibilidade. 4. Sinergismo. 5. Biofilme. I. Título.

CDD 616.9

VANDBERGUE SANTOS PEREIRA

DROGAS LEISHMANICIDAS: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PENTAMIDINA
SOBRE O COMPLEXO *Sporothrix schenckii* E ANTAGONISMO DO ANTIMONIATO DE
MEGLUMINA COM ANTIFÚNGICOS CLÁSSICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana e Animal.

Aprovada em: 15/12/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Valdemar e Ana Cleide.

Aos meus irmãos, Carlos Vinícius e Venâncio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois creio que Ele é o arquiteto e mentor por trás das obras-primas que são a vida e todo o universo e que, por esse simples e maravilhoso motivo, merece minha gratidão, a qual demonstrarei a Ele até o fim dos meus dias.

Aos meus pais, Ana Cleide e Valdemar, por todo apoio e dedicação prestados para possibilitar a realização de cada sonho almejado, estando sempre ao meu lado em todas as minhas decisões e respeitando cada uma delas, obrigado por serem os pais que qualquer filho sonharia em ter. Nada disso seria possível sem vocês ao meu lado, espero um dia ser ao menos uma parcela do filho que vocês merecem ter.

Ao meu irmão Carlos Vinicius, que mesmo de longe sempre está a se importar e cuidar de mim, que cuida de nossa família com tanto zelo assumindo o seu e o meu papel de filho para que eu possa estar aqui hoje. Ao meu irmão Venâncio, que me mostra a beleza da vida em cada abraço apertado quando volto para casa, seus abraços são a fonte de renovação das minhas forças. E claro a nova integrante da minha família, minha querida Georgia Matos, você só nos trouxe coisas boas, uma pessoa admirável que sempre esteve disposta a ajudar.

À CAPES, ao CNPQ e à FUNCAP pelo apoio financeiro aos projetos, e ao Centro Especializado em Micologia Médica e à Universidade Federal do Ceará pela estrutura que proporcionou a execução desse trabalho.

À professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela oportunidade dada a um estranho que caiu de paraquedas em sua sala com o sonho de se tornar mestre, por toda a confiança depositada em mim, pela dedicação e imenso carinho dispensado a mim ao longo desses dois anos. Obrigado por ter sido a orientadora que necessitei ter, me dando sempre oportunidades de crescer e aprender cada vez mais.

Ao professor Marcos Fábio Gadelha Rocha, que guiou a mim e meus colegas de pós-graduação durante essa jornada.

À professora Rossana de Aguiar Cordeiro, um exemplo a ser seguido por todos os professores/pesquisadores, obrigado pelos momentos de discussão, esclarecimento e ensinamento e por sempre instigar o pensamento crítico de todos no laboratório, nos instigando a ir sempre além.

À professora Débora Castelo-Branco, por ser uma incrível professora, que sempre está disposta a dar o seu melhor para que as coisas sigam da melhor forma possível. Obrigado por sempre estar de ouvidos e coração aberto para resolver problemas e construir soluções.

Ao professor José Júlio da Costa Sidrim, por ser a base de sustentação do CEMM por todos esses anos com sua incrível experiência e dedicação ao estudo da micologia médica.

Aos professores do CEMM e todos os demais professores do PPGMM, muito obrigado. Se hoje enxergo mais longe é porque estou sob ombros de gigantes.

À nossa super Carol, secretária do PPGMM, que faz o possível e impossível para nos ajudar nessa jornada chamada pós-graduação. Obrigado por ser o suporte técnico e psicológico dos alunos, por ser nossa bússola nesse mar bravio que decidimos enfrentar.

À Terezinha de Jesus Rodrigues, nossa amada técnica, e minha mãe adotiva, dona de um abraço que cabe a todos e um coração sempre aberto para receber mais um filho posticho. Tetê, você é a alma e o coração do CEMM, mantendo o funcionamento deste lugar por tanto anos de uma forma tão leve e tão amável.

Aos grandes amigos que fiz durante esse período que passei no CEMM e que sempre farão parte da minha vida. Rosana Serpa, não há um dia que se passe sem eu me lembrar de você e de nosso convívio. A saudade é real e palpável e, por vezes, dói demais, mas sou grato todos os dias por ter te conhecido, por ter aprendido com você. Você foi minha mãe científica e com você me apaixonei ainda mais por esse enorme mundo da ciência que ainda vamos dominar juntos um dia. Jonathas Sales (Jow), não sei como te agradecer nem o que te dizer, você foi mais que um amigo, foi um irmão mais novo (apesar de ser mais velho), que me acolheu mesmo antes que eu entrasse nessa vida acadêmica, você esteve comigo do início ao fim dessa jornada e espero que esteja em todas as próximas que virão, obrigado por ter sido o melhor amigo que eu poderia ter pedido a Deus e por ser exatamente quem você é. Um dia recompensarei tudo o que fez e faz por mim. Como você disse, as definições de irmão não-sanguíneo foram atualizadas.

Aos colegas e amigos que conheci nos últimos dois anos no CEMM, Gleiciane Rocha, Livia Galdino, Fernando Monteiro, Kleybson Sousa, Raquel Collares, Lara de Aguiar, Jaime Acosta, Renan Vasconcelos, Patrícia Mendes, Jônatas Franco e Gessica Araújo. Em especial ao Felipe Magalhães, Lucilene Queiroz, Edmilson Corrêa, Ewerton Caracas, Ana Luiza Ribeiro, Lana Glerieide, Antônio Evangelista (Tony), Jamila Ricarte e Glaucia Guedes. Sempre bom estar na companhia de vocês, a jornada é sempre melhor quando é feita em grupo. Cada um contribuiu para que eu chegasse até esse momento, de uma forma ou de outra. Uma experiência única ter convivido com todos vocês.

Aos amigos que sempre fizeram parte da minha vida, e com os quais sempre dou ótimas risadas e vivo incríveis momentos. Mesmo distantes, os laços que se formam nunca se rompem. Obrigado, Cirilaedna Pereira, Lucas Marques, Jenfte Alencar, Nayara Oliveira, Johnatan

Mendes e Rodrigo Santos. Vocês são muito importante pra mim, são quem me mantêm sã e me lembram que a vida é imensa, que vale a pena e que deve ser vivida.

Ao Paulo Rômulo, obrigado pelos sorrisos bobos que você me faz esboçar e pela sensação de felicidade que me proporciona simplesmente por estar do meu lado. Sei que essa jornada foi difícil pra você tanto quanto foi pra mim, talvez até mais, obrigado pela gigantesca paciência, pelo apoio, pela compreensão, pelo esforço e dedicação, obrigado por ser meu confidente, meu assessor, meu nutricionista e meu enfermeiro que cuidou sempre para que eu chegasse “vivo” até aqui.

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa conquista.

“Não tenho medo do caminho, tenho medo de não
caminhar.”

Augusto Cury

RESUMO

A esporotricose é uma doença subcutânea causada por fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*. Essa doença pode mimetizar diversas outras enfermidades de acometimento dermatológico, dentre elas a leishmaniose. O diagnóstico diferencial entre essas doenças pode ser um desafio e diagnóstico errôneo pode levar pacientes com esporotricose a tratamentos equivocados com drogas leishmanicidas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica dos leishmanicidas antimoniato de meglumina (AMG) e pentamidina (PNT) e as interações entre essas drogas e os antifúngicos anfotericina B (AMB), itraconazol (ITC) e terbinafina (TRB) frente as células planctônicas e sésseis de espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, bem como determinar o efeito da pré-exposição desses fungos aos leishmanicidas diante da sensibilidade aos antifúngicos. Foram utilizadas 19 cepas de *Sporothrix* spp. (10 *S. brasiliensis*, 02 *S. globosa*, 04 *S. mexicana* e 03 *S. schenckii sensu stricto*) para todos os experimentos, exceto para os testes de interação farmacológica, onde utilizou-se 14 cepas (05 *S. brasiliensis*, 02 *S. globosa*, 04 *S. mexicana* e 03 *S. schenckii s. str.*). As drogas foram avaliadas quanto a atividade antifúngica frente a células planctônicas e sésseis desses fungos, nas suas formas filamentosa e leveduriforme, pelo método de microdiluição em caldo. Ainda, foi avaliado o potencial sinérgico entre leishmanicidas e antifúngicos pelo método *checkerboard*. O efeito da pré-exposição de células de *Sporothrix* spp. aos leishmanicidas foi avaliado por testes de microdiluição em caldo, após ciclos de exposição previa aos leishmanicidas. Dentre os leishmanicidas, apenas a PNT apresentou atividade antifúngica, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,13 a 2 µg/mL e 0,06 a 0,25 µg/mL para as formas filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp., respectivamente. A concentração inibitória mínima da PNT capaz de inibir 50% (CIMB₅₀) e 90% (CIMB₉₀) do biofilme, variaram de 4 a 16 µg/mL e de 16 a 32 µg/mL para as formas filamentosa de *Sporothrix* spp. e de 1 a 4 µg/mL e de 4 a 32 µg/mL para a sua forma leveduriforme. Interações sinérgicas foram observadas apenas nas combinações entre PNT e os antifúngicos, em células planctônicas e sésseis, com reduções de até 64 vezes para a sensibilidade planctônica e 128 vezes para a sensibilidade de células sésseis. Apenas a pré-exposição ao AMG alterou o perfil de sensibilidade antifúngica, tanto para células planctônicas como sésseis das espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii s. str.*, aumentando a tolerância das células à AMB e ITC (p<0,001). Conclui-se que o AMG, apesar de não apresentar atividade antifúngica frente espécies do complexo *S. schenckii*, é capaz de diminuir a sensibilidade de *Sporothrix* spp. aos antifúngicos quando pré-expostos ao leishmanicida, enquanto a PNT apresentou considerável atividade

antifúngica frente células planctônicas e sésseis de *Sporothrix* spp., além de apresentar sinergismo com os antifúngicos. Dessa forma, novos estudos fazem-se necessários para avaliar o potencial terapêutico dessa droga no tratamento da esporotricose.

Palavras-chave: Drogas leishmanicidas. *Sporothrix* spp. Sensibilidade. Sinergismo. Biofilme.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous disease caused by dimorphic fungi belonging to the *Sporothrix schenckii* complex. This disease can mimic several other diseases of dermatological involvement, among them leishmaniasis. Differential diagnosis between these diseases may be a challenge and misdiagnosis can lead patients with sporotrichosis treated with leishmanicidal drugs. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of the leishmanicides antiglucomycin (AMG) and pentamidine (PNT) and the interactions between these drugs and the antifungals amphotericin B (AMB), itraconazole (ITC) and terbinafine (TRB) against planktonic and sessile cells of *Sporothrix schenckii* complex species, as well as to determine the effect of the pre-exposure of these fungi to the leishmanicides on antifungal susceptibility. Nineteen *Sporothrix* spp. strains (10 *S. brasiliensis*, 02 *S. globosa*, 04 *S. mexicana*, and 03 *S. schenckii sensu stricto*) were used in all experiments, except for the pharmacological interaction tests, when 14 strains were used (05 *S. brasiliensis*, 02 *S. mexicana*, and 03 *S. schenckii s. str.*). Drugs were evaluated for antifungal activity against planktonic and sessile cells of *Sporothrix* spp., using filamentous and yeast forms of the fungi, by broth microdilution method. Furthermore, synergistic potential between leishmanicides and antifungals was evaluated by the checkerboard assay. Effects of pre-exposure of *Sporothrix* spp. to leishmanicides were evaluated by broth microdilution tests after four cycles of pre-exposure to leishmanicides. Only PNT showed antifungal activity, with minimal inhibitory concentration (MIC) ranging from 0.13 to 2 µg/mL and 0.06 to 0.25 µg/mL for the filamentous and yeast forms of *Sporothrix* spp. respectively. Minimum inhibitory concentration of PNT capable of inhibiting 50% (BMIC₅₀) and 90% (BMIC₉₀) of the biofilm ranged from 4 to 16 µg/mL and from 16 to 32 µg/mL for the filamentous forms of *Sporothrix* spp., and from 1 to 4 µg/mL and from 4 to 32 µg/mL for the yeast form. Synergistic interactions were observed only in combinations of PNT and antifungals against planktonic and sessile cells, with reductions up to 64-fold for planktonic cells susceptibility and 128-fold for the sessile cells susceptibility. As for the pre-exposure of *Sporothrix* spp. cells to leishmanicides, only pre-exposure to AMG altered the antifungal susceptibility profile for both planktonic and sessile cells of *S. brasiliensis* and *S. schenckii s. str.*, increasing cell tolerance to AMB and ITC ($p < 0.001$). It was concluded that AMG, although not having antifungal activity, was able to decrease the susceptibility of *Sporothrix* spp. to antifungals when pre-exposed to fungal cells, whereas PNT presented considerable antifungal activity against planktonic and sessile cells of *Sporothrix* spp. and presented synergisms with

antifungal agents. Therefore, further studies are necessary to evaluate the therapeutic potential of PNT in the treatment of sporotrichosis.

Keywords: Leishmanicidal drugs. *Sporothrix* spp. Susceptibility. Synergism. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Dimorfismo térmico de <i>Sporothrix</i> spp.....	22
Figura 2 –	Rotas de transmissão da esporotricose.....	24
Figura 3 –	Biofilmes de <i>Sporothrix</i> na forma filamentosa e leveduriforme.....	29
Figura 4 –	Lesões presentes na esporotricose cutânea localizada.....	30
Figura 5 –	Lesões presentes na esporotricose linfocutânea.....	31
Figura 6 –	Distribuição das espécies de <i>Sporothrix schenckii</i> s. l. de interesse clínico no mundo.....	33
Figura 7 –	Padrões de distribuição de <i>Sporothrix schenckii</i> s. l. no Brasil.....	35
Figura 8 –	Imagens de microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	66
Figura 9 –	Concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em biofilme dos antifúngicos após a pré-exposição de <i>Sporothrix</i> spp. ao antimoníato de meglumina e a pentamidina.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem e local de isolamento das cepas de espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> utilizadas neste estudo.....	54
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos e leishmanicidas frente a espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> na forma filamentosa.....	61
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos e leishmanicidas frente a espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> na forma leveduriforme.....	62
Tabela 4 – Concentração inibitória mínima dos leishmanicidas e antifúngicos para inibição do biofilme de espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> na forma filamentosa.....	64
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima dos leishmanicidas e antifúngicos para inibição do biofilme de espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> na forma leveduriforme.....	65
Tabela 6 – Concentração inibitória mínima de pentamidina combinada com antifúngicos, frente células planctônicas de <i>Sporothrix</i> spp., nas formas filamentosa e leveduriforme, e índice de concentração inibitória fracionada.....	68
Tabela 7 – Concentração inibitória mínima para biofilme (CIMB) de pentamidina combinada com antifúngicos frente biofilmes de <i>Sporothrix</i> spp., nas formas filamentosa e leveduriforme, e índice de concentração inibitória fracionada.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
AMG	Antomoniato de metil-glucamina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine trifosfato
BHI	Brain heart infusion
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CFM	Concentração fungicida mínima
<i>CHS1</i>	Quitina sintase 1
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima em biofilme
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CNS	Cepa não-selvagem
DHN	1,8-dihidroxinaftaleno
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRK1	Dimorphism-regulating kinase 1
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
E-test	<i>Epsilometer Strip Test</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing</i>
EV	Endovenosa
FF	Forma filamentosa
FL	Forma leveduriforme
GTP	Guanosina trifosfato
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Human immunodeficiency virus
HMDS	Hexametildisilazano
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IM	Intramuscular

ITC	Itraconazol
ITS	Internal Transcribed Spacer
KOH	Hidróxido de potássio
L-DOPA	3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina
MCVL	Microscopia confocal de varredura a laser
MEC	Matriz extracelular polimérica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MG	Média geométrica
MOPS	Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico
NNN	Novy-Neal-Nicolle
PAS	Ácido periódico Schiff
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PLECT	Paracoccidioidomicose, leishmaniose, esporotricose, cromoblastomicose e tuberculose
PNT	Pentamidina
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>s. l.</i>	<i>Lato sensu</i>
<i>s. str.</i>	<i>Sensu stricto</i>
Sb ⁺³	Antimonio trivalente
Sb ⁺⁵	Antimonio pentavalente
SNC	Sistema nervoso central
TRB	Terbinafina
ufc	Unidade formadora de colônia
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilofenilamino]-2-tetrazóliohidróxido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1.	A complexidade de <i>Sporothrix schenckii</i>	19
2.2.	Aspectos morfológicos de <i>Sporothrix schenckii lato sensu</i>	21
2.3.	Aspectos ecológicos de <i>Sporothrix schenckii lato sensu</i>	23
2.4.	A relação <i>Sporothrix</i>-esporotricose	24
2.4.1.	<i>Fatores de virulência do complexo Sporothrix schenckii</i>	25
2.4.1.1.	<i>Biofilmes</i>	27
2.4.2.	<i>Apresentações clínicas da esporotricose</i>	30
2.4.2.1.	<i>Forma cutânea localizada</i>	30
2.4.2.2.	<i>Forma linfocutânea</i>	31
2.4.2.3.	<i>Forma cutânea disseminada</i>	31
2.4.2.4.	<i>Forma extracutânea</i>	32
2.5.	Epidemiologia da esporotricose	32
2.5.1.	<i>Global</i>	32
2.5.2.	<i>No Brasil</i>	34
2.6.	Diagnóstico laboratorial da esporotricose	36
2.6.1.	<i>Diagnóstico micológico</i>	37
2.6.2.	<i>Diagnóstico histopatológico</i>	37
2.6.3.	<i>Diagnóstico imunológico</i>	38
2.6.4.	<i>Diagnóstico molecular</i>	39
2.7.	Tratamento farmacológico da esporotricose	40
2.7.1.	<i>Iodeto de potássio</i>	40
2.7.2.	<i>Itraconazol</i>	41
2.7.3.	<i>Terbinafina</i>	41
2.7.4.	<i>Anfotericina B</i>	42
2.8.	Drogas “não-antifúngicas” com potencial antifúngico	43
2.8.1.	<i>Antimoniais pentavalentes</i>	44
2.8.2.	<i>Pentamidina</i>	45
2.9.	Métodos de estudo da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	46
2.9.1.	<i>Avaliação da atividade antifúngica em biofilmes</i>	49
2.9.2.	<i>Estudo da combinação de drogas</i>	50

3	HIPÓTESES	52
4	OBJETIVOS	53
4.1.	Objetivo geral	53
4.2.	Objetivos específicos	53
5	METODOLOGIA	54
5.1.	Local do estudo	54
5.2.	Microrganismos	54
5.3.	Drogas teste	55
5.4.	Teste de sensibilidade antifúngica planctônica	55
5.5.	Avaliação da atividade antifúngica em biofilme	56
5.5.1.	<i>Formação de biofilmes</i>	56
5.5.2.	<i>Teste de sensibilidade</i>	56
5.5.3.	<i>Avaliação da estrutura e morfologia do biofilme</i>	57
5.6.	Combinação de fármacos leishmanicidas e antifúngicos sobre células planctônicas	58
5.7.	Combinação de fármacos leishmanicidas e antifúngicos sobre células sésseis ...	58
5.8.	Pré-exposição de <i>Sporothrix</i> spp. aos leishmanicidas	59
5.9.	Análises estatísticas	59
6	RESULTADOS	60
6.1.	Ensaio de sensibilidade antifúngica planctônica	60
6.2.	Ensaio de sensibilidade antifúngica em biofilme	63
6.3.	Estrutura e morfologia do biofilme	66
6.4.	Combinação de drogas frente células planctônicas de <i>Sporothrix</i> spp.	66
6.5.	Combinação de drogas frente células sésseis de <i>Sporothrix</i> spp.	69
6.6.	Pré-exposição de <i>Sporothrix</i> spp. aos leishmanicidas	69
7	DISCUSSÃO	71
8	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção subcutânea causada por fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii* que pode acometer homens e animais. As principais espécies envolvidas nessa patologia são *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix mexicana* (CHAKRABARTI et al., 2015).

Essa doença vem ganhando importância nos últimos anos devido à alta prevalência nas mais diversas partes do mundo, como na América Latina, China, Japão, Austrália e partes da África e Europa (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017). A epidemiologia global indica que os países com maior prevalência da doença são o Brasil (5.814 casos), a China (3.299 casos) e a África do Sul (3.154 casos) (ZHANG et al., 2015). Entretanto, por essa não ser uma doença de notificação obrigatória, sua prevalência ainda é subestimada, sendo os dados, em sua maior parte, advindos de publicações científicas.

Classicamente, a esporotricose é caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas nodulares ou ulceradas que podem ter distribuição localizada, linfocutânea ou ainda disseminadas (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). Raramente, a esporotricose desenvolve-se com apresentações extracutânea pulmonar ou disseminada, sendo estas relacionadas a pacientes com imunossupressão (FREITAS et al., 2014). As opções terapêuticas para o tratamento da esporotricose incluem solução saturada de iodeto de potássio, itraconazol, como drogas antifúngicas de primeira escolha, terbinafina e anfotericina B, sendo esta última indicada apenas nos casos de infecção extracutânea e disseminada (ALMEIDA-PAES et al., 2017b).

Para ter a capacidade de infectar diversos nichos no hospedeiro, os microrganismos podem apresentar diversos tipos de mecanismos conhecidos como fatores de virulência (IYALLA, 2017). Para as espécies do complexo *S. schenckii*, vários fatores de virulência podem auxiliar na sobrevivência do microrganismo no meio ambiente ou no hospedeiro, dentre eles, destaca-se a formação de biofilmes (BRILHANTE et al., 2018; SILVA, 2017). Embora existam poucas informações sobre a formação de biofilmes de *Sporothrix* spp., recentemente foi descrito que ambas as formas, filamentosa e leveduriforme, de *Sporothrix* spp. podem formar biofilmes, estando essa apresentação estrutural diretamente associada a menor responsividade do microrganismo, *in vitro*, as drogas antifúngicas (BRILHANTE et al., 2018; SILVA, 2017).

O diagnóstico clínico da esporotricose pode ser um desafio, pois esta doença pode mimetizar muitas outras enfermidades, dentre elas a leishmaniose (CARLOS, 2015). Esse desafio torna-se ainda maior do ponto de vista epidemiológico, uma vez que algumas regiões

do globo são endêmicas para ambas as patologias (CHAKRABARTI et al., 2015; PIGOTT et al., 2014). Em casos onde ocorra diagnóstico equivocado da esporotricose por leishmaniose, o paciente pode ser submetido a tratamento com leishmanicidas, tais como antimoniais pentavalentes e pentamidinas (ARONSON et al., 2016). Contudo, não há relatos sobre os efeitos de drogas leishmanicidas ante espécies do complexo *S. schenckii*.

Dessa forma, dado o contexto de mimetismo clínico entre leishmaniose tegumentar e esporotricose, aos desafios do diagnóstico e os diferentes tratamentos que o seguem, nos propusemos a avaliar o efeito de fármacos leishmanicidas sobre células planctônicas e sesséis de espécies do complexo *S. schenckii*, bem como sua interação com drogas antifúngicas de uso terapêutico e seus efeitos na resposta aos antifúngicos quando essas células são pré-expostas aos leishmanicidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A complexidade de *Sporothrix schenckii*

Em 1898, no *Johns Hopkins Hospital* em Baltimore (EUA), o médico americano Benjamin Robinson Schenck isolou um fungo proveniente de nódulos ulcerados nos dedos e antebraço de um paciente de 36 anos de idade e encaminhou a cultura do microrganismo ao patologista e micologista Erwin Frink Smith, que identificou o fungo como uma espécie pertencente ao gênero *Sporotrichum*, tendo sido este o primeiro caso relatado do agente etiológico da esporotricose. Benjamin Robinson Schenck fez a primeira descrição da esporotricose com a publicação “*On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the Sporotricha*” no *Johns Hopkins Hospital Bulletins*, sendo esta considerada a certidão de nascimento da esporotricose (SCHENK, 1898; TÉLLEZ et al., 2014).

Em 1900, em Chicago (EUA), Hektoen e Perkins também descreveram um caso de esporotricose, desta vez em uma criança do sexo masculino, de 5 anos de idade, que apresentou lesões semelhantes as descritas por Benjamin Robinson Schenck, mas que tiveram regressão espontânea. Foram estes pesquisadores que propuseram a criação do gênero *Sporothrix* para o agente etiológico da esporotricose (HEKTOEN; PERKINS, 1900). A partir de 1903 a doença foi descrita na França por Beurmann e Ramond, sendo o fungo isolado por eles denominado como *Sporotrichum beurmanni* (RIPPON, 1988).

Em 1907, Lutz e Splendore relataram pela primeira vez o caso de infecção natural em animais (ratos) no Brasil (LUTZ; SPLENDORE, 1907). Também foi Splendore que em 1908, descreveu a detecção de corpos de asteroides em torno de células de levedura de *Sporothrix* spp., que se tornaria um achado característico em exames histológicos de pacientes com esporotricose (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

Apesar da suscetibilidade de gatos à infecção por *S. schenckii* ter sido demonstrada experimentalmente em 1909 (DE BEURMANN; GOUGEROT; VAUCHER, 1909), a esporotricose felina naturalmente adquirida só foi relatada nos anos 1950 (FREITAS; MIGLIANO; ZANI NETO, 1956).

Até 1962, estes fungos foram classificados dentro do gênero *Sporotrichum* e só a partir de tal ano é que, por diferenciação morfológica, Carmichael determinou que a correta nomenclatura do agente da esporotricose fosse *Sporothrix schenckii* (RIPPON, 1988).

Em 1985, Smith e Batenburg-Van Der Vegte propuseram a heterogeneidade de *S. schenckii* com base em estudos de microscopia eletrônica evidenciando ao menos três padrões

distintos de microporos presente na membrana celular entre os septos (SMITH; BATENBURG-VAN DER VEGTE, 1985). Estudos com diferentes isolados clínicos de *S. schenckii* relatam a existência de variações fenotípicas entre as cepas (FERNANDES et al., 2009b). Tais diferenças incluem alterações na morfologia da colônia, no crescimento em diferentes meios de cultura, na tolerância térmica, na virulência em modelo murino, na sensibilidade às drogas antifúngicas e na expressão de fatores de virulência (ALMEIDA-PAES et al., 2015; FERNANDES et al., 2009b; MARIMON et al., 2008).

Poucos anos após o relato de Lutz e Splendore, Terra e Rabelo descreveram, em 1992, o primeiro caso de esporotricose no Rio de Janeiro no Brasil, sendo descritos vários casos de esporotricose no país deste então (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

Por mais de um século (1898–2006), o fungo patogênico *S. schenckii* foi descrito como o único agente etiológico da esporotricose (MARIMON et al., 2006; SCHENK, 1898). Entretanto, com o advento e refinamento das técnicas de biologia molecular e sua aplicação direta na taxonomia de fungos, demonstrou-se que o agente clássico *S. schenckii* era, na verdade, um complexo de espécies crípticas filogeneticamente relacionadas (MARIMON et al., 2006).

O primeiro indício molecular de que o agente clássico *S. schenckii* fosse representado por duas ou mais espécies baseou-se no sequenciamento e análise filogenética da região ITS (do inglês “*internal transcribed spacer*”) localizada no operon ribossomal (rDNA) destes microrganismos. De acordo com o estudo publicado por De Beer et al. (2003), as análises filogenéticas comportavam dois grupos de *Sporothrix*. As estirpes pertencentes ao grupo I foram isoladas de pacientes infectados com *Sporothrix* nas Américas e África do Sul e as pertencentes ao grupo II foram isoladas diretamente do solo ou de material vegetal em decomposição, com raros casos clínicos. Isto confirmava observações anteriores que ressaltam diferenças morfológicas e fisiológicas entre os isolados de *S. schenckii* de origem clínica e ambiental.

Alguns anos depois, Marimon et al. (2006) reforçaram os estudos de diversidade genética conduzidos por De Beer et al. (2003). A análise filogenética combinada, baseada na sequência de DNA de três *loci* codificadores de proteínas (quitina sintase, β -tubulina e calmodulina) de diversos isolados de *Sporothrix* provenientes de diversas regiões geográficas, sugeriu que além de *S. schenckii*, três novas espécies (*S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*) atuavam como agentes etiológicos da esporotricose, sendo então proposta uma divisão do agente *Sporothrix schenckii* em um complexo, composto por diferentes espécies patogênicas. Atualmente as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* são classificadas dentro do Reino

Fungi, Divisão Ascomycota, Classe Pyrenomycetes, Ordem Ophiostomatales e Família Ophiostomataceae (MARIMON et al., 2007; ZHANG et al., 2015).

O reconhecimento e a introdução na prática clínica dessa nova classificação revelaram aspectos importantes sobre a ecologia, morfologia, virulência, patogenicidade, epidemiologia e sensibilidade às principais drogas antifúngicas do então complexo *Sporothrix schenckii* (CARLOS, 2015). Todavia, deve-se levar em consideração a rica literatura disponível para a doença antes desse período.

Deste modo, para que não houvesse equívocos sobre a taxonomia do agente causal descrito anteriormente, a descrição do complexo *S. schenckii* passou a ser realizada utilizando o termo em latim *lato sensu* (*s. l.*) para designar o patógeno no seu sentido mais amplo, sem que haja a delimitação molecular de espécie ou a aplicação de extensivos testes fisiológicos e bioquímicos para a caracterização do agente etiológico e a expressão *sensu stricto* (*s. str.*) para designar o agente *S. schenckii* no seu sentido mais restrito (espécie), cuja identificação seja realizada primariamente através do sequenciamento de DNA ou outras técnicas de biologia molecular para a caracterização do fungo (CARLOS, 2015; MARIMON et al., 2006).

2.2. Aspectos morfológicos de *Sporothrix schenckii lato sensu*

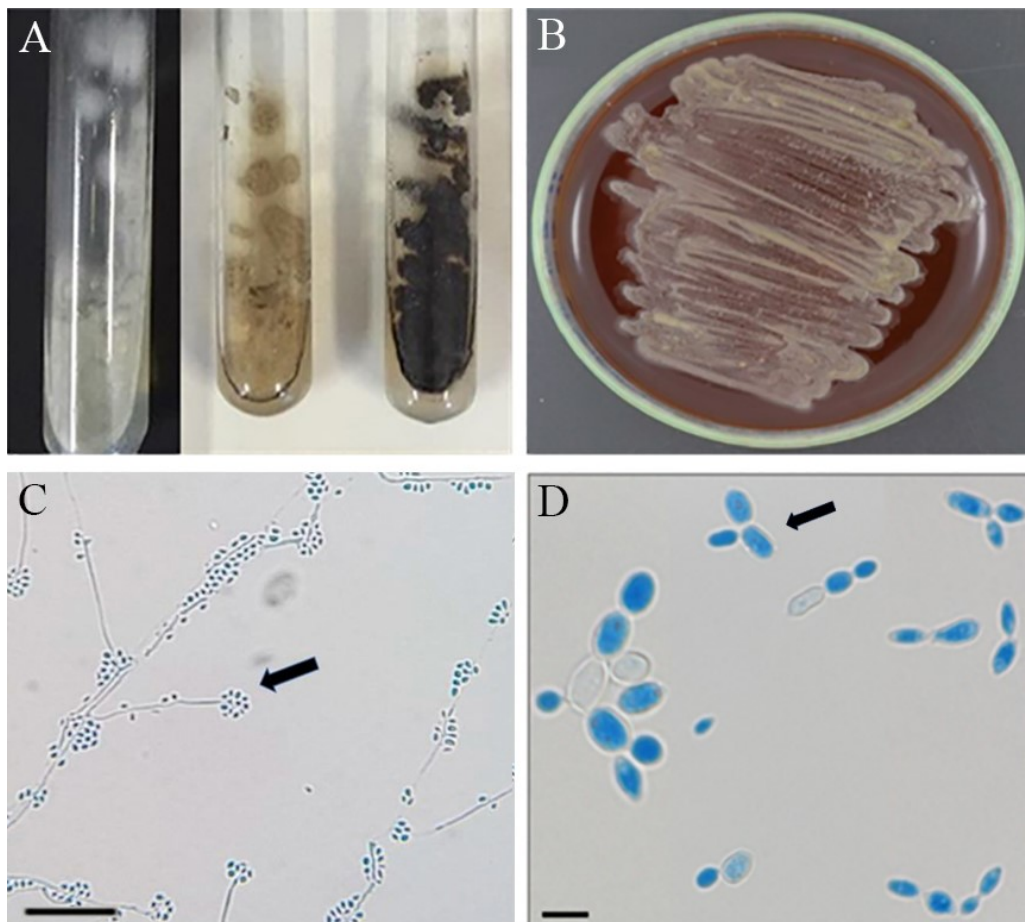
O complexo *S. schenckii* engloba espécies fúngicas classificadas como dimórficas, ou seja, em seu estágio saprófito ou em cultivo a temperatura de 25-28 °C se apresenta na forma filamentosa, e causando infecção ou em cultivo a temperaturas em torno de 35-39 °C, na forma leveduriforme (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

A colônia cultivada à temperatura ambiente de 25-28 °C por 5-7 dias é, a princípio, de branca a creme, coriácea, com superfície sulcada, podendo permanecer com esta tonalidade ou torna-se castanho-escuras a negras com o passar dos dias (Figura 1). O mesmo isolado poderá variar sua coloração durante repiques sucessivos, um fenômeno chamado de plasticidade fenotípica (BONIFAZ et al., 2016). Microscopicamente essa forma caracteriza-se pela presença de hifas hialinas, septadas, com conidióforos eretos e conídios primários hialinos de $2-3 \times 3-6 \mu\text{m}$, dispostos simpodialmente lembrando uma flor de margarida (BONIFAZ et al., 2016) (Figura 1).

À temperatura de 37 °C, *Sporothrix* spp. muda sua morfologia para a forma leveduriforme apresentando, em meios de cultivo, uma colônia de consistência mole, de cor branca a creme e com superfície irregular (Figura 1). Algumas cepas, necessitam de temperaturas mais baixas para conversão, uma vez que não crescem bem a 37 °C, especialmente

aquelas relacionadas à espécie *S. globosa* (MARIMON et al., 2007). Embora sejam necessários meios ricos para a transição do fungo filamentososo para a forma leveduriforme, estas podem ser mantidas a 37 °C em outros meios (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; MAHMOUDI et al., 2016; TÉLLEZ et al., 2014). Microscopicamente, a forma leveduriforme é caracterizada pela presença de estruturas globosas, ovais ou fusiformes (em forma de charuto) com dimensões em torno de 1-3 μm \times 3-10 μm , apresentando um ou vários brotamentos (RODRIGUES et al., 2015a) (Figura 1).

Figura 1 – Dimorfismo térmico de *Sporothrix* spp.



Legenda: A: Macroscopia do crescimento de *Sporothrix* spp. na forma filamentososa a 28 °C, em meio ágar batata após 15 dias de crescimento. B: Macroscopia do crescimento de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme a 37 °C, em meio BHI suplementado com 5 % de sangue de carneiro. C: Microscopia de estruturas de *Sporothrix* spp. na forma filamentososa coradas com lactofenol azul de algodão, onde vemos a presença de hifas hialinas e conídios hialinos terminais dispostos simpodialmente, lembrando uma flor de margarida (seta preta) (Barra = 5 μm). D: Microscopia de estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. coradas com lactofenol azul de algodão, onde vemos blastoconídios com brotamentos (seta preta) (Barra = 5 μm). Fonte: CEMM, 2017.

2.3. Aspectos ecológicos de *Sporothrix schenckii* lato sensu

A ecologia dos fungos de relevância médica é uma área negligenciada em micologia e geralmente não acompanha avanços nos aspectos clínicos, biológicos e moleculares de seus agentes etiológicos. O crescimento de *S. schenckii* lato sensu ocorre principalmente em lugares que possuem as condições climáticas favoráveis, com elevada umidade relativa, acima de 92-100%, e temperatura em torno de 26-30 °C (CARRADA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013). Este fungo existe, normalmente, como sapróbio na natureza e já foi isolado de palha, folha, espinhos de arbusto, madeira, casca de árvore, solo, algas, excretas de animais, aranhas, insetos mortos e larvas (CRUZ, 2013).

A inoculação traumática de *Sporothrix* spp., presente na natureza, na camada subcutânea do hospedeiro, é conhecida como a forma clássica de aquisição da esporotricose. A presença dos agentes etiológicos da esporotricose na natureza pode levar a flutuações no número de transmissões (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016). Transmissões zoonótica (via alternativa) podem ocorrer por mordidas ou arranhões de animais, sendo mais comumente relatados gatos, cães e tatus. Os gatos possuem uma particularidade que os tornam mais susceptíveis a infecção fúngica, adotando posição fundamental na epidemiologia dessa doença, fato esse que se deve ao seu comportamento natural de afiar as unhas em árvores e cavar o solo para enterrar suas fezes, o que facilita o abrigo do fungo na região ungueal. As condições fisiológicas na saliva dos animais, associadas à temperatura corporal felina (intervalo normal 37-39 °C) podem ser um fator de estímulo para a transição micélio-levedura em *Sporothrix* spp. A saliva do gato tem um pH que varia entre 7,5-8,0, ideal para a conversão micélio-levedura segundo estudos *in vitro* (TRAVASSOS; LLOYD, 1980; ZHANG et al., 2015). Como fator agravante, os gatos infectados ainda apresentam na lesão e nas secreções de feridas ulceradas uma carga exuberante desse microrganismo, potencializando dessa forma a transmissão tanto entre gatos como para o homem (MARQUES-MELO et al., 2014).

Por muitos anos a maioria dos casos de esporotricose foram relatados em trabalhadores jovens e saudáveis, cuja ocupação ou hobby os levavam para locais em que o fungo se fazia presente, tradicionalmente agricultores, jardineiros, paisagistas e laboratoristas, pois estão expostos a materiais contaminados e suas atividades diárias apresentam maior risco de inoculação traumática do fungo (via clássica) (BONIFAZ et al., 2016). Entretanto, na última década o perfil dessa doença tem sofrido mudanças, havendo um grande aumento no número de transmissões por via alternativa, acometendo principalmente mulheres e crianças, por

Em linhas gerais, a esporotricose humana pode desenvolver-se com diferentes formas clínicas que dependem do resultado da interação parasita-hospedeiro que é influenciada por diversos fatores. No que concerne ao microrganismo podemos citar seus fatores de virulência, que podem lhe auxiliar no processo de infecção, desde a penetração nos tecidos/órgãos-alvo até a evasão do sistema imunológico (ALSPAUGH, 2015).

2.4.1. Fatores de virulência do complexo *Sporothrix schenckii*

Dentro do complexo *S. schenckii*, os perfis de virulência variam de acordo com as características do patógeno (FERNANDES et al., 2009a) e da imunidade do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2015b). *S. brasiliensis* é a espécie mais virulenta do complexo, capaz de promover intensa invasão tecidual e indução à morte celular, enquanto que *S. schenckii s. str.* apresenta diferentes níveis de patogenicidade, variando de alto à baixa-virulência, e *S. globosa* e *S. mexicana* exibem pouca ou nenhuma virulência em modelos murinos (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; RODRIGUES et al., 2015b). As espécies *S. mexicana*, *S. chilensis* e *S. pallida* apresentam virulência atenuada em modelo murino, com baixo potencial invasivo, e o hospedeiro pode vir a se recuperar da infecção em algumas semanas (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; RODRIGUES et al., 2016). Isto reforça que a virulência é uma propriedade emergente, mutável e altamente complexa (FERNANDES et al., 2009a).

As informações relacionadas aos fatores de virulência de *S. schenckii s. l.* ainda são escassas. Apesar disso, alguns fatores de virulência podem ser encontrados descritos na literatura, tais como o dimorfismo térmico, produção de melanina, adesinas e proteinases (MORA-MONTES et al., 2015) e mais recentemente a formação de biofilme (BRILHANTE et al., 2018).

Sporothrix spp. sofrem uma transição morfológica em resposta à variação da temperatura, desenvolvendo-se em hifas filamentosas durante a fase saprofítica no solo (25 °C) ou como leveduras no tecido hospedeiro durante a fase parasitária (37 °C). A transição morfológica induzida pela temperatura em *Sporothrix* spp. é uma adaptação morfológica importante para a infecção em animais de sangue quente (SIL; ANDRIANOPOULOS, 2015). A eficiência da conversão micélio-levedura é alta entre as espécies de *S. brasiliensis*, *S. schenckii s. str.*, *S. globosa* e *S. luriei*, enquanto que as espécies *S. pallida*, *S. mexicana* e, *S. chilensis* variam consideravelmente com relação a essa capacidade e, em geral, apresentam uma transição morfológica deficiente, produzindo poucas leveduras (RODRIGUES et al., 2015b, 2015a).

Embora pouco se saiba sobre os fatores que induzem a transição do micélio a levedura, existem evidências que sugerem que um gene que codifica a cálcio/calmodulina-quinase desempenhe um papel como efetor de dimorfismo nesse fungo (VALLE-AVILES et al., 2007). Ainda, uma histidina quinase híbrida, DRK1, que é reconhecidamente um regulador universal do dimorfismo e virulência de fungos dimórficos, já foi relatada em *Sporothrix* spp. (HOU et al., 2014). Outra histidina relatada como potencialmente envolvida com o dimorfismo deste fungo é a SsDrk1, estando presente em maior quantidade em células leveduriformes se comparada com a forma micelial (TEIXEIRA et al., 2014).

Outro fator que pode auxiliar na proteção do microrganismo é a produção de melanina. Ambas as formas morfológicas de *Sporothrix* spp. são capazes de sintetizar melanina. A melanização de *S. schenckii* s. l. é um importante fator de proteção ambiental contra radiação ultravioleta, por exemplo. Os conídios geralmente são as partículas fúngicas infectantes do *Sporothrix* spp. e a melanização desses conídios confere uma maior resistência a fagocitose pelos macrófagos, o que facilita o desenvolvimento do processo infeccioso. A melanização também tem um papel na patogênese da esporotricose cutânea, uma vez que os isolados melanizados possuem uma capacidade invasiva maior do que os não melanizados, em modelo animal (MADRID et al., 2010). Além disso, a melanização já foi indicada como uma proteção para o microrganismo, *in vitro*, contra drogas antifúngicas, tais como anfotericina B (MARIO et al., 2015) e terbinafina (ALMEIDA-PAES et al., 2016a).

A adesão primária às células epiteliais, bem como aos componentes da matriz extracelular, é essencial para uma invasão efetiva dos tecidos do hospedeiro pelos agentes patogênicos. Tanto os conídios como as células leveduriformes de *Sporothrix* spp. reconhecem três glicoproteínas importantes da matriz extracelular: fibronectina, laminina e colágeno tipo II (LIMA et al., 2001). Alguns estudos demonstraram que o fungo possui integrinas ou moléculas de adesina como lectina que reconhecem a fibronectina humana em vários pontos da molécula (LIMA et al., 2001). As adesinas de fibronectina estão localizadas na superfície das células leveduriformes e sua expressão está relacionada à virulência fúngica (RUIZ-BACA et al., 2009).

A capacidade de *S. schenckii* s. l. de invadir tecidos cutâneos está associada a produção de proteinases. As infecções experimentais em ratos parecem confirmar isso, uma vez que a inoculação de inibidores dessas enzimas suprime, em grande parte, a formação de nódulos e promove a cicatrização espontânea das lesões (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). Estudos de Sandoval-Bernal et al. (2011) sugerem que o dano à camada epitelial causada pela interação de leveduras de *S. schenckii* s. l. pode ser mediado pela ação de proteases tais

como serina e aspartil proteases, fosfatase ácida, collagenase e gelatinase, desempenhando papel fundamental na patogenicidade do complexo *S. schenckii* (FERNANDES et al., 2013).

2.4.1.1. Biofilmes

O termo “filme”, que se refere à adesão, agregação e multiplicação de microrganismos sobre superfícies, foi utilizado na microbiologia marinha para distinguir aqueles aderidas (sésseis) de outros de nado livre, “planctônicos”, e o termo biofilme foi utilizado pela primeira vez por Zobell e Allen (1935) em um estudo da aderência e crescimento de microrganismos sobre lâminas de vidro submersas em água do mar (HØIBY, 2017).

Atualmente os biofilmes são definidos como uma comunidade microbiana aderida a um substrato biótico ou abiótico e submersa em uma matriz extracelular polimérica (MEC) (KUMAR; MISHRA; SINGH, 2017). As células sésseis do biofilme apresentam fenótipo e genótipo diferentes das células planctônicas em relação à transcrição gênica, taxa de crescimento e resistência antifúngica. Diversos autores apontam que os microrganismos são encontrados no meio ambiente, predominantemente, na forma de biofilme e não em crescimento livre, forma planctônica (DONLAN, 2002; DOUGLAS, 2003; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; TOURNU; VAN DIJCK, 2012). A quantidade de nutrientes disponíveis, moléculas de *quorum-sensing* liberadas pelo microrganismo e o contato com superfícies são alguns dos fatores que contribuem para a formação do biofilme (FANNING; MITCHELL, 2012; HIROTA et al., 2016).

A formação de biofilme propicia aos microrganismo algumas vantagens para sua sobrevivência, uma vez que esse modo de organização celular confere proteção contra o ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica baseada na comunidade (RAMAGE et al., 2012). A MEC do biofilme tem papel essencial na defesa dessa comunidade microbiana contra células fagocitárias, dando suporte a integridade do biofilme e agindo como uma barreira que impede a difusão das substâncias tóxicas. Essas características junto com a complexidade arquitetônica, conferem proteção contra as defesas do hospedeiro (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2015; SANDAI et al., 2016).

A formação do biofilme pode ocorrer em superfícies sólidas inanimadas, bem como em tecidos de organismos vivos, tais como dentes e células da epiderme, como um modo de proteção para as células envolvidas sobreviverem a ambientes hostis (KUMAR; MISHRA; SINGH, 2017). Ademais, estima-se que aproximadamente 65% das infecções nosocomiais e

80% de todas as infecções microbianas sejam causadas pela formação e persistência de biofilmes no hospedeiro ou em dispositivos médico-hospitalares (SOTO, 2014).

Para que ocorra a formação do biofilme há, inicialmente, a fase de fixação dos microrganismos denominados de colonizadores primários. Zobell (1943) propôs a primeira teoria sobre a fase de adesão, que seria composta por duas etapas. Na primeira etapa ocorre a adesão primária, reversível, e na segunda etapa, a adesão torna-se irreversível.

Esta ideia prévia de irreversibilidade se manteve, no entanto, um modelo atual para a formação de biofilme propõe que o processo ocorre, mais detalhadamente, em cinco fases. Fase **I.** ocorre o ataque reversível de células planctônicas que se aproximam da superfície por fluido ou por motilidade. Nessa fase, a adesão é mediada por interação hidrofóbica e por forças de Van der Waals, nesse estágio, os microrganismos ainda são facilmente removidos por lavagem da superfície; **II.** há a transição para a forma irreversível de adesão, a qual se dá por meio de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas, covalentes e por mecanismos moleculares específicos. **III.** desenvolve-se a estrutura do biofilme, na qual a MEC irá caracterizar a sua arquitetura; **IV.** refere-se ao desenvolvimento e maturação do biofilme. Nessa etapa, MEC continua a ser formada, juntamente, com canais de água e poros. O objetivo desses canais é permitir o fornecimento de nutrientes e gases, de forma igualitária, bem como a remoção de produtos residuais. **V.** acontece a dispersão de células do biofilme para que ocorra a formação de um novo biofilme (MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016; VILA; ROZENTAL, 2016).

A crescente conscientização sobre a importância dos biofilmes fúngicos pode ser confirmada pelo aumento do número de publicações sobre a formação de biofilmes por várias espécies leveduras de *Candida*, bem como outras leveduras que causam infecções oportunistas em humanos, como *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula* sp., *Trichosporon asahii*, *Blastoschizomyces* e *Cryptococcus neoformans*. Além disso, a capacidade de formar biofilmes também foi demonstrada em vários fungos filamentosos, incluindo *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium* spp. e em fungos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Coccidioides immitis* (VILA; ROZENTAL, 2016). Entretanto, pouco se sabe sobre o processo de formação de biofilmes por espécies do complexo *S. schenckii*.

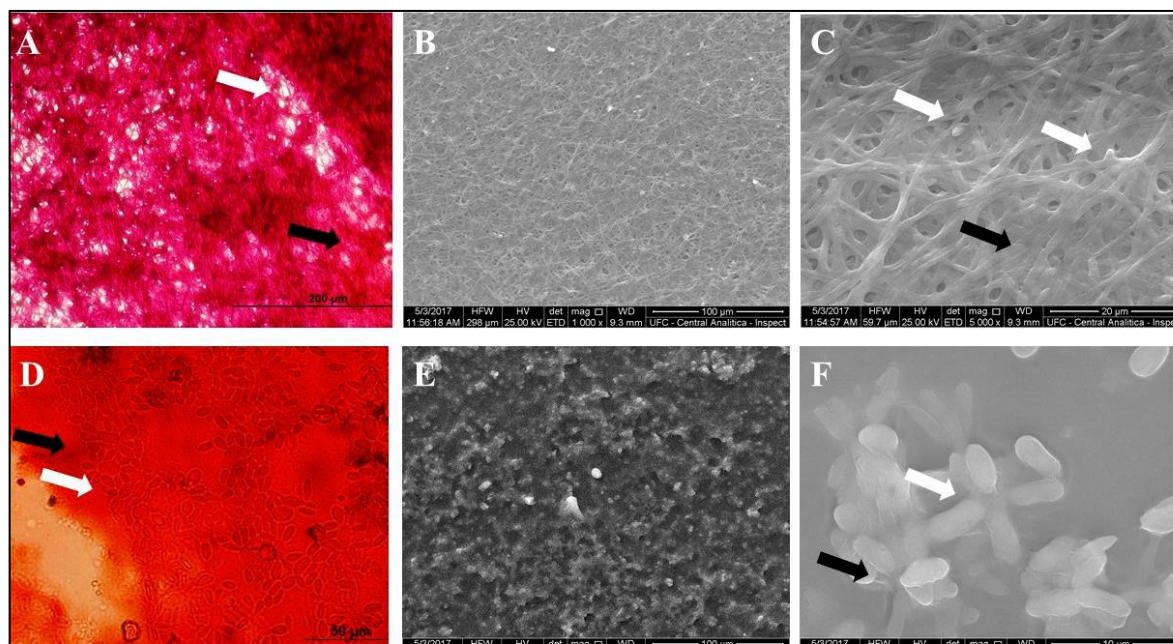
A descoberta da formação de biofilmes por *S. schenckii* s. l. é recente, tendo seu primeiro relato realizado por Sánchez-Herrera et al. (2014), demonstrando a capacidade de formação de biofilme *in vitro* pela forma filamentosa destes fungos. Os estudos de Brilhante et al. (2017) e Silva, (2017) demonstram que as espécies *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, e *S. schenckii* s. str., na sua forma filamentosa, são fortes formadoras de biofilmes, *in vitro*, constituídos de

uma densa camada hifas entrelaçadas e conídios recobertos por MEC (Figura 3A-3C). Os pesquisadores mostraram ainda, por meio de cinéticas de crescimento, que esses biofilmes levam em média 120 horas para atingir a maturação. O mesmo estudo também relatou diminuição na responsividade do microrganismo às drogas antifúngicas clássicas quando na forma de biofilme, tolerando mais de 50 vezes a concentração dos antifúngicos necessária para eliminação da forma planctônica de *Sporothrix* spp.

Silva (2017) descreveu pela primeira vez a formação de biofilmes, *in vitro*, pela forma leveduriforme de *S. schenckii* s. l. (Figura 3D-3F). Esse estudo encontrou perfis distintos quanto a formação de biofilme de *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, e *S. schenckii* s. str., com variações de fraca a forte produção de biofilme intra e interespécies. O tempo médio para a formação de biofilme maduro de *S. schenckii* s. l. na sua forma leveduriforme é de 96 horas de cultivo e a tolerância às drogas antifúngicas foi semelhante ao descrito anteriormente para os biofilmes da forma filamentosa de *S. schenckii* s. l.

Não se sabe ainda se a forma parasitária desse patógenos apresentar-se ou não em biofilme durante o processo infeccioso. Todavia, estudos que abranjam a formação de biofilmes desse microrganismo devem ser incentivados, uma vez que essa pode ser uma das formas de apresentação do patógeno no hospedeiro.

Figura 3 – Biofilmes de *Sporothrix* na forma filamentosa e leveduriforme.



Legenda: A a C: Biofilmes de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa. D a F: Biofilmes de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme. A e D: Biofilmes corados com vermelho Congo para observação de matriz extracelular. B, C, E e F: Biofilmes em microscopia eletrônica de varredura. Setas pretas indicam matriz extracelular e setas brancas estruturas fúngicas. Fonte: CEMM, 2017.

2.4.2. *Apresentações clínicas da esporotricose*

A esporotricose é uma micose subcutânea caracterizada por ser uma doença crônica que pode apresentar-se desde a forma cutânea localizada, com lesão restrita ao local da inoculação, até a forma cutânea disseminada. Em casos mais raros, a esporotricose pode desenvolver-se como uma doença extracutânea grave (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; OYARCE et al., 2016).

2.4.2.1. *Forma cutânea localizada*

A esporotricose localizada é a segunda forma mais comum da esporotricose e abrange cerca de 20% dos casos. Atribui-se esta forma clínica a uma sensibilização prévia do indivíduo ao fungo, notadamente em áreas endêmicas, o que proporciona um melhor controle imunológico do hospedeiro, o qual responde ao microrganismo de forma mais eficaz, limitação da lesão ao local da inoculação. caracteriza-se pela presença de uma única lesão no local de inoculação do fungo (Figura 4A-4B). A lesão única pode ser papulosa ou papulotuberosa, por vezes formando placa verrucosa com ou sem ulceração (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). Esse tipo de lesão também pode estar presente em outras doenças dermatológicas, especialmente as pertencentes ao grupamento PLECT (Paracoccidioidomicose, Leishmaniose, Esporotricose, Cromoblastomicose e Tuberculose) (BAZZI et al., 2016), sendo, portanto, essencial a confirmação laboratorial do diagnóstico.

Figura 4 – Lesões presentes na esporotricose cutânea localizada.



Legenda: Lesões presentes na forma cutânea localizada da esporotricose (A e B), podendo assemelhar-se as lesões observadas em outras doenças dermatológicas, dentre elas a leishmaniose tegumentar (C). Fonte: Carvalho et al. (2017) e Freitas et al. (2014).

2.4.2.2. *Forma linfocutânea*

A esporotricose linfocutânea é a manifestação clínica predominante da doença, representando mais de 75% dos casos de esporotricose (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). Esta forma é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões que, inicialmente, aparecem no local do trauma, constituindo o chamado cancro de inoculação, com posterior desenvolvimento de nódulos indolores ao longo dos vasos linfáticos (Figura 5A), os quais podem amolecer e ulcerar (Figura 5B). As lesões geralmente são úlceras de base infiltrada e eritematosa, podendo ser também pápula, nódulo, placa vegetante e também uma lesão úlcero-gomosa. Esse desenvolvimento pode ocorrer estendendo-se do local da lesão em sentido aos vasos linfáticos ou permanecer próximo e essa cadeia de nódulos. Esse arranjo é tão característico que certas doenças como a leishmaniose, cujas lesões podem assumir aspecto semelhante, são denominadas de esporotricóide (Figura 5C) (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

Figura 5 – Lesões presentes na esporotricose linfocutânea.



Legenda: Forma linfocutânea da esporotricose com lesões nodulares (A) e ulcerativas (B) com seguimento aos vasos linfáticos, podendo ser mimetizada por outras doenças como a leishmaniose esporotricóide (C). Fonte: Carvalho et al. (2017); Freitas et al. (2014) e Mahajan (2014).

2.4.2.3. *Forma cutânea disseminada*

A forma cutânea disseminada se dá pela disseminação hematogênica do fungo. Essas formas atingem menos de 5% dos pacientes e estão geralmente interligadas com algum tipo de imunodepressão ou doenças associadas, ocorrendo muitas vezes juntamente com a forma extracutânea. Inicialmente, observa-se lesões cutâneas por diversas partes do corpo que, após semanas ou meses podem ulcerar. Alcoolismo, diabetes, corticoterapia prolongada, pacientes HIV-positivos ou com síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) são fatores de risco para a manifestação dessa forma clínica (ALMEIDA-PAES et al., 2015; FREITAS et al., 2014).

2.4.2.4. *Forma extracutânea*

A forma extracutânea é considerada a mais rara, ocorrendo em menos de 2% dos pacientes (FREITAS et al., 2014). As lesões são decorrentes da disseminação hematogênica e acredita-se que esse tipo de manifestação se desenvolva após inalação do *Sporothrix* spp., pois em um considerável número de casos não se encontra lesão cutânea primária. Qualquer tipo de tecido ou órgão pode ser acometido, sendo o tecido ósseo, as mucosas e os pulmões os mais acometidos. Os sintomas dessa fase aparecem de acordo com o órgão envolvido, acompanhados de febre e comprometimento geral em alguns casos (FREITAS et al., 2015; LEDERER; SULLIVAN; CRUM-CIANFLONE, 2016; MAHAJAN, 2014).

2.5. Epidemiologia da esporotricose

2.5.1. *Global*

A esporotricose é considerada uma doença cosmopolita, ocorrendo predominantemente em áreas de clima quente e temperado (CHAKRABARTI et al., 2015). Estudos sobre epidemiologia da esporotricose indicam que as regiões endêmicas com maior prevalência da doença ocorrem no Brasil (5.814 casos), China (3.299 casos) e África do Sul (3.154 casos), enquanto que áreas de menor incidência ocorrem no Japão, Austrália, Índia, América central e parte da América do Sul (ZHANG et al., 2015).

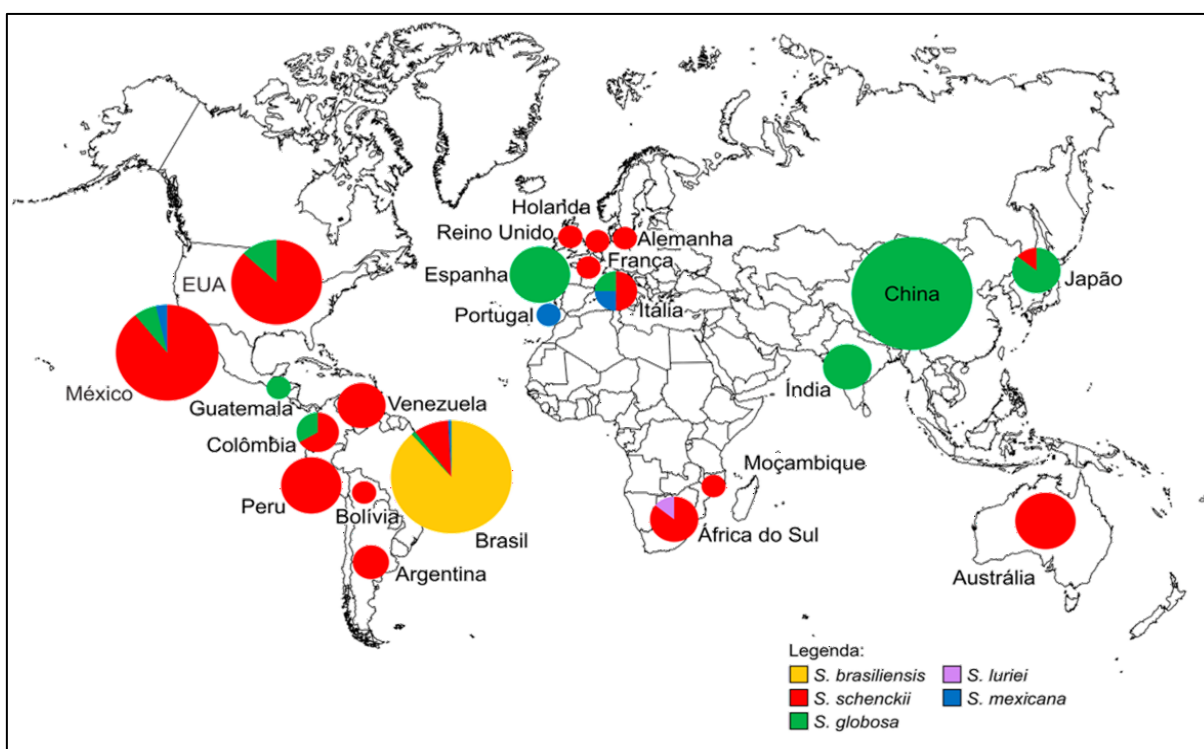
Apesar de sua distribuição cosmopolita, existe uma intrigante divergência na prevalência e distribuição geográfica dos agentes etiológicos (Figura 6). Em quase todas as regiões existe o predomínio de uma espécie em particular. Na Ásia, em especial na China, estima-se que *S. globosa* seja o agente etiológico em 99,3% dos casos de esporotricose humana. Em outras áreas endêmicas, *S. schenckii* s. str. é a espécie mais prevalente como na Austrália e África do Sul (94%), na América do Norte e parte da América do Sul (89%). Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a espécie *S. brasiliensis* (88%) é o principal agente etiológico da esporotricose humana e animal (CHAKRABARTI et al., 2015; ZHANG et al., 2015; ZHOU et al., 2014).

Na Europa os casos de esporotricose são atualmente escassos, tendo sido descritos 2 casos na Espanha, 58 casos na Itália e 55 casos autóctones em outros países do continente, no período de 1963 a 1993 (BARILE et al., 1993; VENTIN et al., 1987).

Na Ásia, já foram relatados 78 casos na Índia de 1999 a 2007 (DEVI et al., 2006; HALDAR; SHARMA; GUGNANI, 2007), 27 casos na Malásia entre 2004 e 2010 (CAPOOR et al., 2011; TANG et al., 2012) e 165 casos em Nagasaki entre 1951 e 2012 (TAKENAKA et al., 2014). No nordeste da China, tem havido um aumento no número de casos de esporotricose, tendo-se registro de mais de 400 casos humanos até 2013 (SONG et al., 2013).

Na África, ocorreu entre 1941 e 1944 a maior epidemia de esporotricose já documentada, na qual aproximadamente 3.000 trabalhadores mineiros contaminados por aquisição da doença a partir do contato com vigas de madeira contaminadas que eram utilizadas na sustentação dos túneis das minas (HELM; BERMAN, 1947). Estudos relatam também 2 casos de esporotricose no Sudão (GUMAA, 1978) e 2 casos na Nigéria entre os anos de 1974 e 1979 (GUMAA, 1978). Na África do Sul, foram relatados 154 casos em 1997 (VISMER; HULL, 1997) e 81 casos em 2011 (GOVENDER et al., 2015).

Figura 6 – Distribuição das espécies de *Sporothrix schenckii* s. l. de interesse clínico no mundo.



Legenda: O tamanho dos gráficos do tipo pizza são proporcionais ao número de isolados identificados e relatados por Chakrabarti et al. (2015), Rodrigues; De Hoog; De Camargo (2016), Zhang et al. (2015) e Zhou et al. (2014).

Na Oceania, no sudoeste da Austrália, ocorreu um surto tendo novamente o feno como material contaminado entre os anos de 2000 e 2003 (FEENEY et al., 2007).

Já na América, nos Estados Unidos, foram registrados surtos relacionados ao trabalho em florestas, no vale do Mississipi e uma microepidemia entre os anos de 1992 e 1993. Existem relatos de casos na América do Sul com 30 casos relatados na Venezuela entre os anos de 1973 e 2013, no Peru, onde a doença é hiperendêmica com uma incidência anual média de 98 casos por 100.000 habitantes, entre 1997 e 1999 e ainda há relatos de casos no Chile, na Colômbia, no México e principalmente no Brasil (OYARCE et al., 2016; ZHANG et al., 2015).

2.5.2. No Brasil

Nas últimas décadas (1998-2017), um grande surto zoonótico de esporotricose vem ocorrendo no Brasil (GREMIÃO et al., 2017). É difícil estimar a magnitude real da epidemia uma vez que a esporotricose não era uma doença de notificação compulsória pelos órgãos de saúde pública nacionais até meados de 2014. Rodrigues et al. (2014b) destacam a ocorrência de casos de esporotricose humana em 14 dos 26 estados brasileiros, representando as principais áreas endêmicas e formas clínicas da doença. *S. brasiliensis*, incluindo casos de origem humana e animal, ocorre em quatro das cinco regiões brasileiras (Figura 7). As regiões Sul e Sudeste do Brasil apresentam uma incidência muito alta de casos humanos, o que está diretamente ligado à grande epidemia de esporotricose transmitida por felino. O genótipo de *S. brasiliensis* infectando gatos é idêntico ao genótipo encontrado em casos humanos na mesma área geográfica, confirmado por métodos moleculares a transmissão zoonótica da doença. Até o presente momento, não houve registros da ocorrência do *S. brasiliensis* fora do território brasileiro (GREMIÃO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2013).

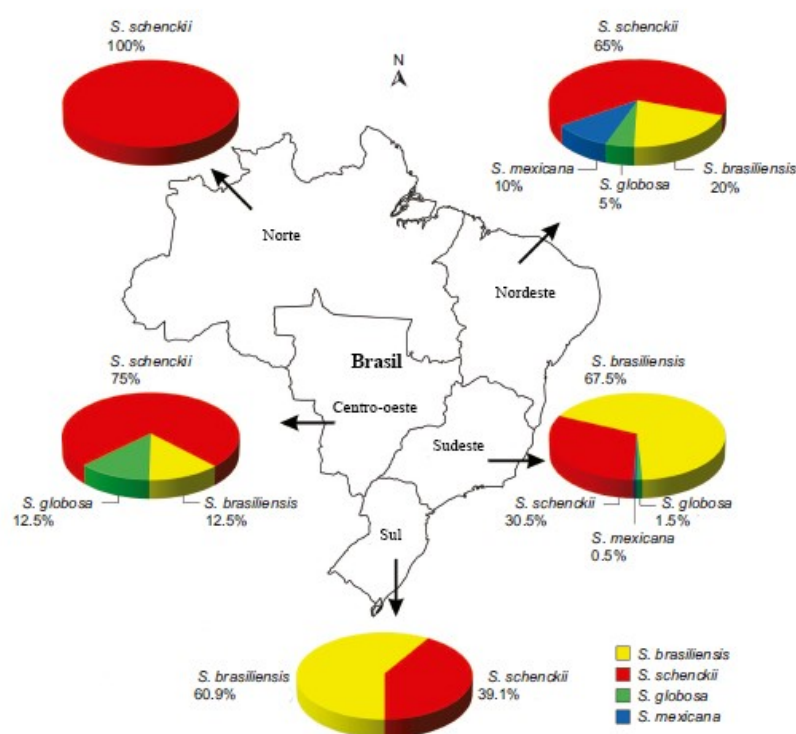
A perigosa combinação entre diagnóstico e tratamento tardio dos gatos infectados leva a uma rápida transmissão da doença entre os animais e os membros da comunidade. Fatores socioeconômicos como o abandono de animais doentes nas ruas, o descarte inadequado da carcaça de animais mortos que frequentemente são enterrados no próprio quintal ou deixados em terrenos baldios, aliado à ausência de políticas públicas para a contenção da epidemia fez com que as transmissões alcançassem proporções epidêmicas. O aumento no número de casos em felinos é geralmente seguido pelo aumento no número de casos humanos, o que constitui um sério problema de saúde pública. Estudos epidemiológicos indicam que o *S. brasiliensis* é dependente do hospedeiro felino para sua emergência no Sul e Sudeste brasileiro (RODRIGUES et al., 2013, 2014a).

S. schenckii s. str. apresenta uma diversidade genética maior e uma distribuição homogênea em todo o território brasileiro, quando comparado ao *S. brasiliensis*. Existe uma

baixa incidência de casos de esporotricose humana por *S. globosa* e *S. mexicana* (Figura 7) (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2014a). Estudos mostram ainda que os indivíduos mais acometidos pela esporotricose são mulheres e crianças, devido o contato direto com o animal de estimação (gato) (ALMEIDA-PAES et al., 2014).

Durante os anos de 2013 a 2016, foram notificados 3.377 casos suspeitos de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. Durante este período o percentual de confirmação dos casos, tanto laboratorial quanto clínico epidemiológico, se manteve acima de 60% (BRASIL, 2016).

Figura 7 – Padrões de distribuição de *Sporothrix schenckii* s. l. no Brasil.



Legenda: (A) Distribuição dos isolados de *Sporothrix* spp. relacionados a esporotricose humana. (B) Distribuição da esporotricose felina no Brasil.

Fonte: Adaptado de Rodrigues et al. (2014b) com atualizações baseadas em Bonifaz e Tirado-Sánchez (2017) e Gremião et al. (2017).

No nordeste brasileiro, os casos de esporotricose reportados são raros, tendo-se descrição de dois casos de esporotricose cutânea humana transmitida por cão no estado do Rio Grande do Norte (RAMOS et al., 2017), um caso de esporotricose cutânea em um felino na cidade de Itaporanga, no estado da Paraíba (NUNES et al., 2013), um caso de esporotricose

felina com transmissão para um humano na cidade de Rio Largo, no estado de Alagoas (MARQUES-MELO et al., 2014), um caso de esporotricose felina, na cidade de Bezerros, além de 45 casos de esporotricose animal e 5 casos humanos na região metropolitana de Recife, no Pernambuco (MARQUES-MELO et al., 2014).

Recentemente o estado da Paraíba tem registrado um número crescente de casos da doença na cidade de João Pessoa. Em 2015, foram registrados 2 casos humanos, em 2016 houveram mais 5 casos humanos e 45 casos felinos, em 2017 mais 16 casos humanos, tendo como principal forma de transmissão o contato com gatos doentes (JORNAL DA PARAÍBA, 2017).

Do ponto de vista epidemiológico e ecológico, o baixo número de casos por *S. schenckii* s. str. sugere que a contaminação dos pacientes ocorra através da via clássica, ou seja, através do contato com solo e material vegetal contaminado. Em comparação com a via alternativa, a via clássica de infecção poderia ser menos eficaz, levando a casos de esporotricose em grupos específicos de pacientes ocupacionais (jardineiros, trabalhadores rurais, etc.), todavia, também ocorrem surtos pela via clássica (GREMIÃO et al., 2017).

Deste modo, é imperativo que vias de transmissões diferentes requerem políticas públicas diferentes para a contenção da epidemia de esporotricose. Na via clássica de transmissão, o uso de ferramentas apropriadas para a manipulação de material vegetal é necessário para a contenção da epidemia. No outro extremo, onde prevalece a transmissão animal horizontal (via gato-gato) e a transmissão zoonótica da esporotricose (via gato-homem), as medidas de contenção devem ser direcionadas para campanhas educacionais para os donos de gatos em áreas endêmicas e implementação do tratamento antifúngico apropriado (BRASIL, 2016; GREMIÃO et al., 2017).

2.6. Diagnóstico laboratorial da esporotricose

A suspeita clínica é essencial no diagnóstico de qualquer doença, sendo construída com base nas manifestações clínicas apresentadas e dados epidemiológicos. Entretanto, a apresentação de nódulos, úlceras ou placas verrucosas são comuns a esporotricose e as demais enfermidades do grupamento PLECT e, portanto, exigem um diagnóstico laboratorial diferencial. Ademais, deve-se ter ciência que a esporotricose apresenta-se em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar em muitas regiões da América Latina. Essa sobreposição de regiões endêmicas acaba por dificultar ainda mais o diagnóstico clínico da esporotricose (CHAKRABARTI et al., 2015; PIGOTT et al., 2014). O padrão ouro de diagnóstico laboratorial

da esporotricose é a cultura; porém métodos histopatológicos, sorológicos e moleculares podem ser adotados como ferramentas auxiliares no diagnóstico (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

2.6.1. Diagnóstico micológico

De forma geral o diagnóstico micológico utiliza o exame direto com a finalidade de observar estruturas fúngicas diretamente do espécime clínico (CRUZ, 2013). Entretanto, no caso da esporotricose o exame direto não tem grandes aplicações, pois excepcionalmente é positivo. Dessa forma o exame direto negativo não descarta o diagnóstico da esporotricose (CASTREJÓN; ROBLES; ARROYO, 1995; MELLO; SCHUBACH; MADEIRA, 2011)

A cultura é o padrão ouro para o diagnóstico da esporotricose. Os meios de cultura comumente utilizados na rotina laboratorial são o ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol ou ainda o ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. Espécimes como pus aspirado de nódulos ou biopsias da lesão, quando semeados nesses meios de cultura a temperatura ambiente resultam no aparecimento de colônias filamentosas entre 5 e 15 dias, porém esse período pode se estender até a 4 semanas. Como *Sporothrix* spp. apresentam dimorfismo térmico reversível e tornam-se leveduriformes quando cultivadas entre 35 e 37 °C, a conversão do fungo para sua forma leveduriforme, *in vitro*, confirma o diagnóstico (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

O meio Novy-Neal-Nicolle (NNN) é um outro meio de cultura que pode ser utilizado no diagnóstico da esporotricose, especialmente em regiões de sobreposição endêmica de esporotricose e leishmaniose, sendo recomendado a sua aplicação como meio alternativo na diferenciação dessas patologias. Todavia esse meio apresenta a desvantagem de ter alto custo, um pouco mais que o dobro dos meios de cultura tradicionais (ANTONIO et al., 2017).

2.6.2. Diagnóstico histopatológico

Os achados histopatológicos da esporotricose, em geral, são inespecíficos, muito comumente, são vistos dermatite difusa e infiltrado inflamatório granulomatoso com necrose caseosa ou de liquefação (QUINTELLA et al., 2011).

O quadro histopatológico geral de dermatite difusa granulomatosa é comum à esporotricose e à outras doenças infecciosas como a leishmaniose tegumentar. A principal diferença que se observa é no tipo do granuloma, que tende a ser tuberculóide na leishmaniose

tegumentar e supurativo na esporotricose. Essa diferença, contudo, não é totalmente específica, havendo alguns casos em que uma doença simula a outra. A visualização do agente infeccioso é, assim, imprescindível para se estabelecer o diagnóstico diferencial no exame histopatológico. Entretanto, a visualização de estruturas fúngicas nem sempre ocorre (64,7% dos casos), podendo melhorar depois de examinar vários cortes do histopatológico (CARVALHO et al., 2017; RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

Quando o fungo é corado pelo Gram, apresenta coloração Gram-positiva irregular, sendo melhor corado pela hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico Schiff (PAS) ou métodos de impregnação pela prata de Grocott. As estruturas medem cerca 3-5 μ m e podem ter formato de levedura ou semelhante a um charuto, com único ou múltiplos brotamentos (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017; ZHANG et al., 2011).

Atenção especial é necessária quando utiliza-se colorações com Giemsa, pois o estudo de Mello, Schubach e Madeira (2011) mostra que lâminas de lesões cutâneas coradas com Giemsa podem gerar confusão analítica, uma vez que as estruturas leveduriformes de *S. schenckii* s. l. podem ser confundidas com as formas amastigotas de *Leishmania*.

Nos casos onde o fungo é encontrado, a observação da reação de Splendore-Hoepli dá um forte indício de um caso de esporotricose. O corpo asteroide é formado pela estrutura fúngica basofílica cercada por raios eosinofílicos de complexos antígeno-anticorpos. Esse achado é observado em 20 a 66% dos casos de esporotricose (GEZUELE; DA ROSA, 2005), mas se mostrou ausente em grandes estudos realizados no México (50 casos) e no Brasil (119 casos), onde o corpo asteroide não foi visualizado em nenhum dos casos (ESPINOSA-TEXIS et al., 2001; QUINTELLA et al., 2011). Essa variação entre os estudos pode ser atribuída à diferença nas propriedades antigênicas de diferentes espécies ou dos fatores hospedeiros da população estudada (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

2.6.3. Diagnóstico imunológico

Um dos testes imunológicos mais simples utilizados para detectar resposta imune celular dos pacientes com esporotricose é o teste cutâneo de intradermorreação com esporotriquina. Esse teste não é utilizado como rotina diagnóstica, uma vez que pode ser positivo em pacientes sem doença ativa e negativo nas formas extracutâneas e disseminadas. A sua principal utilização é em inquéritos epidemiológicos para estudos de prevalência em determinadas áreas geográficas, já que é usualmente positivo em mais de 90% dos casos comprovados de esporotricose (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

Outro teste de intradermorreação que pode apresentar resultado positivo para pacientes com esporotricose é o teste de Montenegro. O teste de Montenegro é amplamente difundido na América Latina como um teste auxiliar no diagnóstico de leishmaniose. Barros et al. (2005) mostraram que de 65 pacientes com esporotricose, 52 apresentaram reação positiva no teste de Montenegro. Os autores sugerem que um co-infecção por *S. schenckii s. l.* e *Leishmania* spp. explicaria parcialmente a positividade detectada pelos testes sorológicos, uma vez que 53,8% dos pacientes envolvidos no estudo relataram que viviam em áreas endêmicas para leishmaniose.

Os testes sorológicos como ELISA, são úteis no diagnóstico da esporotricose, embora não sejam utilizadas frequentemente. O resultado positivo dessas provas é sugestivo, porém não confirma o diagnóstico de esporotricose. Esses exames são úteis principalmente em casos com acometimento extracutâneo, em que o acesso à coleta de amostra para análise micológica se torna difícil como, por exemplo, no envolvimento do SNC e ossos (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

O estudo de Barros et al. (2005) mostraram que, de 65 pacientes com esporotricose, dez tiveram reação positiva em teste de ELISA para detecção de *Leishmania* spp., enquanto outros três paciente apresentaram fortes reações positivas na imunofluorescência indireta com títulos superiores a 1:40. Os autores sugerem a possibilidade de reação cruzada entre *S. schenckii s. l.* e *Leishmania* spp., semelhante a conhecida entre os antígenos de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996).

Apesar de técnicas sorológicas demonstrarem alta sensibilidade no diagnóstico de esporotricose, algumas situações podem desencadear reações cruzadas com soros de portadores de leishmaniose tegumentar (BARROS et al., 2005; VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996). Ademais, o custo elevado de equipamentos e reagentes se torna fator limitante para utilização desse tipo de diagnóstico na rotina (CRUZ, 2013).

2.6.4. Diagnóstico molecular

O uso da biologia molecular no diagnóstico da esporotricose é considerado uma área promissora, porque aliada ao mesmo tempo, maior sensibilidade e especificidade em comparação com outros testes descritos (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017). Deve ser destacado, no entanto, que este teste não está disponível na maioria dos centros de referência pelo elevado custo de material, equipamentos e profissionais qualificados (OLIVEIRA et al., 2014).

A primeira PCR para a identificação de *Sporothrix* spp. foi descrita por Kano et al. (2001). Iniciadores baseados no gene codificador da *CHS1* (quitina sintase 1) foram desenhados e a PCR foi capaz de detectar 10 pg de fragmento de DNA genômico de *Sporothrix* spp.

Uma *nested* PCR para detecção de *Sporothrix* spp. foi avaliada em amostras clínicas utilizando como alvo a região do gene 18S rRNA. Essa reação detectou DNA de *Sporothrix* spp. em amostras de tecidos de animais infectados ou de amostras clínicas de pacientes com esporotricose, confirmados por cultura ou coloração histoquímica. O ensaio mostrou uma alta sensibilidade e especificidade, indicando que poderia permitir o diagnóstico rápido, com precisão suficiente para ser útil no diagnóstico de pacientes com esporotricose (HU et al., 2003). Contudo, estes estudos não permitiram a classificação em nível de espécie do complexo *Sporothrix schenckii*.

A PCR *fingerprinting* utilizando o *primer* universal T3B foi descrita para diferenciar as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii sensu stricto*. E essa metodologia gerou padrões de bandas distintos, permitindo assim a correta identificação de isolados clínicos em nível de espécie, confirmados pelo sequenciamento parcial do gene da calmodulina (OLIVEIRA et al., 2015).

2.7. Tratamento farmacológico da esporotricose

A dificuldade no tratamento pode ser atribuída a fatores como: diagnóstico errôneo, diagnóstico tardio, baixo arsenal terapêutico, longa duração do tratamento e desistência da terapia pelos pacientes (REIS-GOMES et al., 2012). A escolha dos antifúngicos adequados no tratamento da esporotricose baseia-se na condição clínica do paciente e na forma de apresentação clínica das lesões e sua extensão. Alguns fármacos são descritos no tratamento da esporotricose, dentre eles o iodeto de potássio, o itraconazol, a terbinafina e a anfotericina B (MAHAJAN, 2014).

2.7.1. Iodeto de potássio

O iodeto de potássio apresenta ótimos resultados na melhora efetiva de pacientes frente às formas cutânea fixa e linfocutânea da esporotricose. Em casos de esporotricose cutânea disseminada ou extra-cutânea não se observa a mesma eficácia, não sendo recomendado seu uso (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). O exato mecanismo de ação do iodeto de potássio permanece desconhecido. Alguns estudos sugerem que o iodeto de potássio gera

aumento da proteólise agindo sobre os granulomas, enquanto outros autores afirmam que este sal pode promover aumento da fagocitose (COSTA et al., 2013).

Efeitos adversos frequentemente relatados são: gosto metálico, náusea, vômitos, anorexia, epigastria e diarreia. Esses efeitos podem ser atenuados pela redução da dose ou suspensão temporária do fármaco. Com o uso prolongado, alguns pacientes podem apresentar sintomas de iodismo (acentuado gosto metálico e queimação na boca, sialorreia, sensibilidade nos dentes e gengivas e cefaleia) ou toxicidade pelo potássio (arritmias, fraqueza, confusão mental, parestesia em mãos). Essa solução não é recomendada para uso em grávidas, pois está associado a hipotireoidismo neonatal, tireomegalia, obstrução respiratória fetal e parto demorado. Devido aos efeitos adversos relacionados ao iodeto de potássio, seu uso vem sendo substituído por fármacos mais efetivos e seguros como o itraconazol (COSTA et al., 2013; MACEDO et al., 2015).

2.7.2. Itraconazol

Nos últimos anos, o itraconazol foi classificado como fármaco de primeira escolha para o tratamento das formas cutânea e linfocutânea da esporotricose (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). O itraconazol é um derivado triazólico age inibindo a enzima 14 α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo assim a demetilação do precursor lanosterol, que converte lanosterol em ergosterol, o principal esteroide da célula fúngica, o que prejudica a permeabilidade da membrana (BORBA-SANTOS et al., 2016).

As vantagens relacionadas a este fármaco levaram a sua intensa utilização, sendo, atualmente, um dos antifúngicos mais utilizados nas clínicas médicas humana e veterinária. Apesar de ser um fármaco com reduzida toxicidade, alguns efeitos adversos foram descritos, como anorexia, hipocalcemia, náuseas, vômitos, hipertensão e cefaleia, e seu uso não é aconselhado para grávidas (MAHAJAN, 2014).

Devido ao seu uso indiscriminado, têm sido observados frequentes relatos de isolados fúngicos resistentes com consequentes falhas terapêuticas e remissão de sintomas das enfermidades micóticas (ALMEIDA-PAES et al., 2016b; SHINOBI; MISAGO; NARISAWA, 2004).

2.7.3. Terbinafina

A terbinafina é outro fármaco que vem sendo utilizado com sucesso na terapia da esporotricose cutânea (HULL; VISMER, 1992; MAHAJAN, 2014). Essa droga é bastante

utilizada como alternativa em casos onde o itraconazol não pode ser utilizado, pois apresenta menos interações farmacológicas (12) descritas até o momento. Ele é um derivado alilamina que atua bloqueando a síntese do ergosterol pela inibição da enzima esqualeno epoxidase. O seu metabolismo é hepático e apresenta, também, pequena ligação com as enzimas do citocromo P450 (em torno de 5% da capacidade total), por isso acredita-se que não altere a disponibilidade de outros fármacos metabolizados por este sistema enzimático. Sua excreção é renal (80%) e em paciente com insuficiência renal e hepática o *clearance* da terbinafina diminui em 50% (MAHAJAN, 2014).

Estudos usando terbinafina em pacientes humanos demonstraram eficácia em doses variando de 250 a 1000 mg/dia. Ainda, essa droga é uma alternativa no tratamento de gestantes com esporotricose (CHAPMAN et al., 2004; FRANCESCONI et al., 2009, 2011). No entanto um fator limitante para a terbinafina, é o seu elevado custo, que chega a ser superior ao do itraconazol, dificultando o seu uso principalmente em países em desenvolvimento (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

2.7.4. Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Seu mecanismo de ação ocorre pela interação com o ergosterol da membrana fúngica, formando poros e alterando a permeabilidade da célula fúngica. Esses poros permitem o escape de constituintes citoplasmáticos, causando desequilíbrio eletrolítico e homeostático. Essa ação impede o crescimento fúngico e leva a morte celular (GRAY et al., 2012).

Essa droga é utilizada em casos mais graves da esporotricose, como a forma disseminada, esporotricose pulmonar, e as formas associada ao HIV (ALMEIDA-PAES et al., 2016b; FREITAS et al., 2012). Ela também pode ser indicada em pacientes com esporotricose osteoarticular ou que não estão respondendo à terapia com o itraconazol (MAHAJAN, 2014). Seus efeitos adversos incluem febre, calafrios, tremores, náuseas e vômitos, dor de cabeça, hipocalcemia, hipomagnesemia, nefrotoxicidade, anemia normocítica e normocrômica (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

Apesar dos agentes antifúngicos disponíveis geralmente proporcionarem terapias antifúngicas eficazes contra os casos de esporotricose, falhas na terapia antifúngica, infecções refratárias e recaídas já foram relatadas (ALMEIDA-PAES et al., 2016b; PAIXÃO et al., 2015; SHINOGI; MISAGO; NARISAWA, 2004; VETTORATO et al., 2018).

2.8. Drogas “não-antifúngicas” com potencial antifúngico

O termo “drogas não-antifúngicas”, engloba o grupo de compostos que são empregados na terapia de doenças de etiologia não-fúngica, mas que podem ter ação sobre fungos. Diversos estudos vêm surgindo no sentido de avaliar o potencial antifúngico de fármacos que já são utilizados na prática clínica para outras finalidades que não o tratamento de infecções fúngicas (AFELTRA; VERWEIJ, 2003; STYLIANOU et al., 2014).

Vários medicamentos já foram identificados como drogas que possuem atividade antifúngica. Dentre estes, temos os antirretrovirais como o ritonavir que apresenta atividade descrita contra, por exemplo, *Candida* spp. (BLANCO et al., 2003) e *Trichosporon* spp. (CORDEIRO et al., 2017). Além disso, o ritonavir apresenta interação *in vivo* com itraconazol, voriconazol e cetoconazol, potencializando o efeitos dessas drogas (CROMMENTUYN et al., 2004; NIERENBERG et al., 2010; SEKAR et al., 2008). Outro exemplo é o levamisol, droga anti-helmínticas, que também foi relatada com potencial antifúngico contra alguns patógenos fúngicos, dentre eles, *Candida* spp. (LAI; LU; ENG, 2002), *H. capsulatum* e *C. posadasii* (BRILHANTE et al., 2015).

Imunossupressores da classe dos inibidores de calcineurina, usados após transplantes de órgãos para reduzir a atividade do sistema imune são outro exemplo de fármacos que apresentam atividade antifúngica. Estudo recente mostrou que o tacrolimo e a ciclosporina A apresentam atividade, *in vitro*, contra *S. brasiliensis* e *S. schenckii* s. str. Ainda, foi relatado que a associação de tacrolimo com itraconazol ou fluconazol apresentou interação sinérgica frente essas espécies de *Sporothrix* (BORBA-SANTOS et al., 2017).

A escolha de drogas não-antifúngicas para o estudo do seu potencial antifúngico muitas vezes é orientada pela semelhança clínica entre a enfermidade de etiologia não-fúngica e fúngica. A exemplo disso temos os estudos com fármacos antituberculose que foram testadas quanto a seu potencial antifúngico frente aos fungos *H. capsulatum* e *C. posadasii*, causadores, respectivamente, da histoplasmose e coccidioidomicose, ambas também apresentam comprometimento pulmonar do paciente (CORDEIRO et al., 2014, 2006). Os fármacos antituberculose mostram-se capaz de inibir o crescimento desses fungos quando testadas isoladamente, como também mostram atuação sinérgica com os antifúngicos clássicos, reduzindo em mais de 10 vezes a concentração inibitória mínima dos antifúngicos (CORDEIRO et al., 2011, 2009).

Semelhante a perspectiva do uso de fármacos antituberculose contra patógenos fúngicos que apresentam semelhanças clínicas com a tuberculose (CORDEIRO et al., 2014), a miltefosina, droga utilizada em alguns partes do mundo no tratamento da leishmaniose, também foi testada frente ao agente etiológico da esporotricose. A miltefosina mostrou-se bastante eficaz contra a forma filamentosa (BRILHANTE et al., 2014) e leveduriforme (SILVA, 2017) de *Sporothrix* spp. Ainda, miltefosina apresentou bons resultados contra os biofilmes formados por esses microrganismos, com resultados de inibição semelhantes aos dos antifúngicos clássicos (SILVA, 2017).

Embora saiba-se que a miltefosina atue contra as formas filamentosa e leveduriforme de espécies do complexo *S. schenckii*, ainda não são conhecidos os efeitos das outras drogas leishmanicidas tidas como de primeira e segunda escolha no tratamento da leishmaniose, sendo estas, respectivamente, antimoniato de meglumina e pentamidina (MASMOUDI et al., 2013).

2.8.1. Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) são drogas consideradas leishmanicidas. Atualmente, os antimoniais pentavalentes estão disponíveis sob duas formas: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio, comercialmente denominado de Pentostam®. Apenas a forma de antimoniato de meglumina é comercializada no Brasil. As duas formulações apresentam eficácias semelhantes, similaridade estrutural e pertencem ao mesmo grupo farmacológico (MASMOUDI et al., 2013).

Os mecanismos de ação dos antimoniais ainda são pouco conhecidos, mas algumas hipóteses foram traçadas: a primeira seria uma interferência no metabolismo oxidativo das formas amastigotas de *Leishmania*, ocorrendo uma inibição tanto na glicólise quanto na oxidação de ácidos graxos, esta inibição seria acompanhada de uma redução na produção de ATP e GTP. Uma segunda hipótese é que haja uma ligação inespecífica do antimônio aos grupos sulfidrílicos das proteínas dos amastigotas. Uma terceira hipótese seria a inibição da síntese de ácidos nucleicos (MOREIRA et al., 2017; ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998). Ainda, Goodwin & Page (1943) sugeriram a hipótese de que o Sb^{+5} atuaria como pró-droga que seria convertida em sua forma mais tóxica, o antimonial trivalente (Sb^{+3}), dentro ou próximo ao seu local de ação. Assim, para tornar-se ativo, teria que entrar na célula do hospedeiro, cruzar a membrana fagolisossomal, passar pela transformação de Sb^{+5} para Sb^{+3} e agir sobre as formas amastigotas intracelulares. A conversão *in vivo* da forma relativamente

inerte (Sb^{+5}) para a mais tóxica (Sb^{+3}) poderia ocorrer dentro das amastigotas ou no interior dos macrófagos (FRÉZARD et al., 2001; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Na forma cutânea a dose recomendada pela OMS para o uso de Glucantime® varia entre 10 a 20mg de Sb^{+5} /Kg/dia por 20 dias. Se não houver cicatrização completa após duas semanas do término do tratamento, o esquema terapêutico deverá ser repetido. Persistindo o insucesso administra-se uma das drogas de segunda escolha (BRASIL, 2017).

O glucantime é uma droga classicamente utilizada de forma parenteral. A toxicidade desta droga é medida pelo aparecimento de eventos adversos e possivelmente tem relação com a dose utilizada, sendo dose dependente. O aumento cumulativo das concentrações basais e a transformação de Sb^{+5} em Sb^{+3} parecem ser os fatores determinantes dos efeitos relacionados ao uso da droga (DZAMITIKA et al., 2006). A frequência do aparecimento dos efeitos adversos é variável, sendo artralgia, mialgia, inapetência, cefaleia, febre, vômitos, tontura e edema no local da administração os mais frequentes. Outros efeitos adversos descritos com menor frequência são alterações da função renal e elevação das enzimas hepáticas, com aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina (MOREIRA et al., 2017).

Alguns estudos evidenciam uma redução importante na incidência de cura, com taxas abaixo de 60%, e vem demonstrando redução em sua eficácia ao longo do tempo (NEWLOVE et al., 2011). A resistência ao fármaco já foi relatada, podendo ocorrer por resistência primária ou pelo uso de doses sub terapêuticas da medicação ou tratamento por tempo prolongado (LÉGARÉ; OUELLETTE, 2017).

No nosso melhor conhecimento, não há estudos *in vitro* que demonstrem os efeitos do antimoniato de meglumina sobre microrganismos fúngicos. Na prática clínica, há apenas um caso relatado de exposição de paciente com esporotricose à glucantime por diagnóstico errôneo de leishmaniose, tendo sido ineficaz o tratamento do paciente com utilização do leishmanicida (MAHMOUDI; ZAINI, 2015).

2.8.2. Pentamidina

Considerada uma das drogas de 2ª escolha para o tratamento da leishmaniose, a pentamidina (isotionato e mesilato) apresenta-se como alternativa terapêutica para a leishmaniose desde 1941 (MANSON-BAHR, 1959). A medicação existe sob duas formulações: mesilato de pentamidina (Lomidine®) e isotionato de pentamidina (Pentacarinat® ou Pentam®), sendo comercializada no Brasil apenas sob a forma de isotionato (AMATO et al., 1996; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

As pentamidinas pertencem ao grupo das diamidinas aromáticas, compostos orgânicos caracterizados por possuírem uma cadeia alceno central inerte, unida através de ligação éter ao grupo amidina polar terminal. A estrutura dos compostos diamidínicos varia no comprimento da cadeia central, com a ligação molecular e na substituição da posição do carbono dois (MURDOCH; KEYSTONE, 1983). O seu mecanismo de ação ocorre por inibição de diferentes processos celulares, ainda não elucidados totalmente. Pode ser um inibidor competitivo do transporte da arginina ou um inibidor não competitivo do transporte da putrescina e espermidina (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). A pentamidina também pode ligar-se preferencialmente ao DNA do cinetoplasto da *Leishmania* e interferir na replicação e transcrição em nível mitocondrial. Ela também induz mudanças estruturais nas mitocôndrias das leishmanias (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; WERBOVETZ, 2006).

A pentamidina é classicamente de uso parenteral, podendo ser administrada por via endovenosa (EV) ou intramuscular (IM), sendo completamente absorvidas após administração. Mais recentemente, novas aplicações foram sugeridas com base em estudos científicos, com aplicação por vias inalatória, oral e intralesional (CLEMENT et al., 2017; SOTO et al., 2016).

As reações observadas com maior frequência devido o uso da pentamidina são dor, náuseas, vômitos, tontura, cefaleia, adinamia, hipotensão, mialgias, lipotimias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (ARONSON et al., 2016).

Alguns autores entretanto indicam efetividade do isotionato de pentamidina com baixa toxicidade em estudos realizados na Guiana Francesa e países vizinhos, incluindo o Brasil (DIMIER-DAVID et al., 1992; GUERRA et al., 2003; PAULA et al., 2003). Atualmente, é utilizado como medicamento de primeira escolha para tratamento de leishmaniose tegumentar em localidades onde há predomínio de *Leishmania guyanensis* (ARONSON et al., 2016).

A pentamidina tem ação microbicida contra outros microrganismos, dentre eles os fungos *Cryptococcus neoformans* (BARCHIESI et al., 1994), *Candida* spp. (DONKOR; CLARK, 1999), *Aspergillus brasiliensis* (GOA; CAMPOLI-RICHARDS, 1987) e *Fusarium* spp. (VENTURINI et al., 2016). Além disso essa droga apresenta sinergismo com anfotericina B contra *Scedosporium prolificans* (AFELTRA et al., 2002), assim como em combinações com itraconazol e cetoconazol contra *Candida albicans* (ST-GERMAIN, 1990). Entretanto, até onde se conhece, não há estudos sobre os efeitos desta droga sobre o agente etiológico da esporotricose.

2.9. Métodos de estudo da atividade antifúngica *in vitro*

O desenvolvimento de métodos de sensibilidade a antifúngicos tem sua história vinculada a necessidade do aperfeiçoamento de testes de sensibilidade para auxiliar na escolha mais adequada da terapêutica antifúngica, ao interesse da indústria farmacêutica em utilizar esses métodos para avaliar o desenvolvimento de novas drogas e necessidade de detecção e acompanhamento epidemiológico de casos de resistência antifúngica (REX; PFALLER, 2002).

As técnicas adotadas para a análise da atividade de agentes antifúngicos são a de disco-difusão, a de diluição em ágar e as de macro e microdiluição em caldo. A técnica de microdiluição em caldo é tida como padrão-ouro ou técnica de referência para avaliação da sensibilidade a antimicrobianos *in vitro*. O objetivo final dos testes de sensibilidade é prever a resposta dos pacientes à terapia a ser instituída. Muitos fatores, no entanto, além do perfil de sensibilidade *in vitro*, influenciam a resposta clínica, como o sítio de infecção, o *status* imunológico do hospedeiro, a farmacocinética da droga e a adesão do paciente à terapia. Portanto, o estabelecimento da correlação clínica direta entre os valores de CIM e o desfecho terapêutico ainda é limitado na terapia antifúngica (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

Assim como para os testes de sensibilidade a antibacterianos, a regra 90-60 também parece ser útil para a avaliação da sensibilidade a antifúngicos, principalmente para os isolados de *Candida* spp., frente aos derivados azólicos. Tal regra preconiza que 90% das infecções causadas por microrganismos que apresentam sensibilidade *in vitro* e 60% das infecções causadas por microrganismos que apresentam resistência *in vitro* respondem bem à terapia antimicrobiana *in vivo*. Assim, a realização de testes de sensibilidade torna-se importante, uma vez que pode orientar a instituição da terapia antifúngica mais adequada, direcionando o paciente aos 90% de sucesso terapêutico (REX; PFALLER, 2002).

Duas organizações, o *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) e o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) possuem normas padronizadas para realizar testes de sensibilidade aos antifúngicos, tendo como objetivo, promover a concordância entre os laboratórios na determinação da sensibilidade fúngica aos agentes antifúngicos, de forma que os métodos padronizados sejam reproduzíveis, sensíveis e viáveis para uso em laboratórios clínicos de rotina. Diferenças entre as normas disponibilizadas por essas duas organizações têm sido amplamente discutidos em vários relatórios. No entanto seus resultados demonstraram ser comparáveis e são utilizados em todo o mundo (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) possui os direitos autorais em língua portuguesa do manual do CLSI e suas atualizações. O acesso gratuito ao

manual diminui o custo laboratorial e possibilita a padronização das técnicas para pesquisa e análise (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

Em 1997 o CLSI divulgou o documento padronizado para avaliação da sensibilidade antifúngica, o M27-A – Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica. Desde então, o documento já passou por duas atualizações, sendo sua última versão, o M27-A3, publicada em 2008. Este documento propõe avaliar a sensibilidade *in vitro* de *Cryptococcus neoformans* e leveduras do gênero *Candida* (CLSI, 2008a).

Em 2002, foi publicado o documento M38-A – Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de fungos filamentosos. Em 2008, foi publicada a segunda edição deste documento (M38-A2), destinada a fungos filamentosos causadores infecções fúngicas oportunistas e invasivas. Atualmente, engloba as espécies *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus arrhizus*, *Scedosporium apiospermum* e *S. schenckii*, bem como, os dermatófitos *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* spp. (CLSI, 2008b).

Ambos os documentos se referem aos principais critérios a serem adotados para a realização dos testes de sensibilidade, tais como: meio de cultura padrão RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) – 1640, tamponado com o ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS) 0,165M a pH 7,0, a carga fúngica e o preparo do inóculo, tempo e temperatura de incubação, leitura visual e determinação de *breakpoints*. Ademais, também incluem as condições de ensaio para as drogas antifúngicas anfotericina B, os azólicos (itraconazol, cetoconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol), terbinafina, griseofulvina, ciclopirox e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) (CLSI, 2008a, 2008b).

A padronização para teste de sensibilidade com espécies de *Sporothrix* ainda não está totalmente estabelecida. O documento M27-A3 do CLSI não prevê testes de sensibilidade para a forma leveduriforme deste fungo e embora o documento M38-A2 traga uma proposta de padronização para testes com a forma filamentosa de *Sporothrix*, muitos pesquisadores citam a necessidade de adaptações do protocolo, principalmente quanto ao tempo de crescimento do microrganismo para leitura do teste (ALMEIDA-PAES et al., 2016a; BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2018; SANCHOTENE et al., 2017; TRILLES et al., 2005). Outro ponto importante é a falta de pontos de corte para interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade realizados com este fungo (CLSI, 2008a, 2008b).

Recentemente dois estudos multicêntricos propuseram pontos de corte epidemiológicos para a interpretação dos testes de sensibilidade antifúngica de algumas drogas frente a forma filamentosa de espécies do complexo *S. schenckii*. Embora os estudos tenham proposto apenas pontos de corte epidemiológico para a forma filamentosa do fungo, essa iniciativa representa um grande passo para a padronização da leitura dos testes de sensibilidade realizados com este microrganismo (ALMEIDA-PAES et al., 2017b; ESPINEL-INGROFF et al., 2017).

Os pontos de corte epidemiológicos propostos classificam os isolados testados entre cepas tidas como selvagens e não-selvagens. Os pontos de corte que classificariam as cepas como não-selvagens seriam $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ para itraconazol e $\geq 0,13 \mu\text{g/mL}$ para terbinafina (ESPINEL-INGROFF et al., 2017).

Embora os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* ainda não sejam padronizados para a forma leveduriforme de fungos pertencentes ao complexo *S. schenckii*, o documento M27-A3 tem sido utilizado com algumas adaptações para este propósito. Essas adaptações incluem principalmente a temperatura e duração de incubação e o critério de leitura (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014b; SANCHOTENE et al., 2017; TRILLES et al., 2005).

Vale salientar que os protocolos citados são voltados para o estudo da concentração inibitória de antifúngicos em células planctônicas. Entretanto, sabe-se que muitos patógenos fúngicos, assim como *Sporothrix* spp., podem apresentar-se na forma de biofilme e que essa organização estrutural lhes confere proteção contra diversos compostos antifúngicos. Portanto, a avaliação do efeito dos compostos antifúngicos sobre biofilmes é um ponto importante a ser avaliado (VILA; ROZENTAL, 2016; WATERS; RATJEN, 2017).

2.9.1. Avaliação da atividade antifúngica em biofilmes

Embora não haja protocolos padronizados para avaliação de biofilmes microbianos, Simitsopoulou, Chatzimochou e Roilides (2016), propõe diversos métodos para avaliar a formação e a sensibilidade dos biofilmes às drogas antifúngicas. Os autores destacam dois grupos principais de análises, os colorimétricos e os microscópicos.

Dentre os métodos colorimétricos o primeiro teste proposto é o que avalia a biomassa do biofilme, quantificando a matriz, as células vivas e mortas, porém sem discriminá-las. Para tanto, pode-se utilizar o cristal violeta, que cora polissacarídeos e moléculas carregadas negativamente. O segundo tipo de ensaio colorimétrico se detém a avaliar a produção de MEC, com base na coloração específica dos seus componentes ou na avaliação geral da produção de

matriz utilizando a coloração com safranina, que possui afinidade por substâncias exopoliméricas. O terceiro tipo abrange os ensaios que demonstram a viabilidade celular do biofilme, para tanto, pode-se utilizar o ensaio de redução do sal de tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT).

O segundo grupo de métodos de avaliação dos biofilmes é voltado para a visualização microscópica da estrutura dos biofilmes. Dentro deste grupo, dois métodos destacam-se por sua ampla utilização em pesquisas científicas, a análise da viabilidade celular por microscopia confocal de varredura a laser e da topografia dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura, para verificar os danos causados no biofilme, após a exposição a um antimicrobiano (SIMITSOPOULOU; CHATZIMOSCHOU; ROILIDES, 2016).

Tratando-se a avaliação da sensibilidade para verificar a eficácia de antimicrobianos no combate aos biofilmes, os métodos indicados por Gupta e Tuohy (2013) e Simitsopoulou, Chatzimoschou e Roilides (2016) são o ensaio de redução do XTT por ser rápido, reprodutível e amplamente utilizado em pesquisas científicas (BRILHANTE et al., 2017; GAO; SUN, 2015; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2016; VALENTÍN et al., 2016; VILA et al., 2016), e de forma complementar, ensaios de visualização microscópica da estrutura dos biofilmes (GUPTA; TUOHY, 2013; SIMITSOPOULOU; CHATZIMOSCHOU; ROILIDES, 2016).

Pelo fato dos biofilmes serem comunidades microbianas que possuem alta tolerância as drogas antifúngicas, muitas vezes necessitando de concentrações elevadas para sua erradicação, vários pesquisadores vêm buscando alternativas terapêuticas eficazes no combate dos biofilmes. Uma das vertentes de pesquisa é a busca de compostos que interajam de forma sinérgica com os antifúngicos reduzindo as concentrações necessárias de ambos, para erradicação do biofilme (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2016; VALENTÍN et al., 2016; VILA; ROZENTAL, 2016).

2.9.2. Estudo da combinação de drogas

Para o estudo da ação combinada de drogas, a concentração inibitória mínima de diferentes drogas em associação pode ser determinada através dos seguintes métodos: E-test (do inglês *Epsilometer Strip Test*), método da cinética de morte (do inglês *time-kill*), e método de *checkerboard*, sendo este último o mais utilizado (ODDS, 2003).

O método de *checkerboard* é um método de fácil execução, que utiliza diferentes diluições de duas drogas combinadas em uma organização que originou o nome da técnica, um tabuleiro de xadrez (O'SHAUGHNESSY et al., 2006). A interpretação desse método é

realizada utilizando o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) (do inglês *Fractional Inhibitory Concentration Index*). Dessa maneira, o método de *checkerboard* é usado para determinar a concentração inibitória fracionada (CIF) de cada combinação de droga testada, definida pela relação entre o CIM da droga usada em combinação e o CIM da mesma droga usada isoladamente, sendo o ICIF considerado o somatório das CIFs de cada droga testada (ODDS, 2003). O cálculo da soma dos CIFs segue a equação:

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{C1} + \text{CIF}_{C2} = \frac{C_{C1}}{\text{CIM}_{C1}} + \frac{C_{C2}}{\text{CIM}_{C2}}$$

Onde, CIM_{C1} é a CIM da droga 1 testada isoladamente; CIM_{C2} é a CIM da droga 2 testada isoladamente; C_{C1} é a CIM da droga 1 testada em combinação com a droga 2; C_{C2} é a CIM da droga 2 testada em combinação com a droga 1 (BUGLI et al., 2013; O'SHAUGHNESSY et al., 2006).

A fim de manter uma uniformização de interpretação, Odds (2003) propôs uma classificação para a interação das drogas baseada nos seguintes intervalos: $\text{ICIF} \leq 0,5$ deve ser considerado como sinérgico; $0,5 < \text{ICIF} < 4$ como indiferente; e $\text{ICIF} \geq 4$ como antagonismo. Um resultado sinérgico ocorre quando duas drogas em combinação atuam significativamente melhor do que a resposta de cada uma delas utilizada separadamente. Uma interação de drogas é considerada indiferente quando o resultado das duas em combinação é igual ao obtido apenas com as drogas isoladamente. Já o antagonismo é verificado quando o resultado das duas drogas em combinação é significativamente pior do que a resposta de cada uma delas utilizada separadamente (ODDS, 2003).

Apesar desta técnica ter sido inicialmente elaborada para estudos com células planctônicas, nos últimos anos ela vêm sendo adaptada para avaliar o efeito da combinação de drogas frente a biofilmes (KOVÁCS et al., 2016; KRAUSE et al., 2016; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2016).

Os possíveis benefícios terapêuticos proporcionados por combinações sinérgicas incluem: aumento na eficácia terapêutica; diminuição da dosagem da droga; e diminuição de resistência aos medicamentos. Desta maneira, o uso de drogas múltiplas com diferentes mecanismos de ação, provavelmente, pode atingir diversos alvos, agindo de modo mais eficaz contra o microrganismo (CHOU, 2006; YIN et al., 2014).

3 HIPÓTESES

- As drogas leishmanicidas, antimoniato de meglumina e pentamidina, possuem potencial antifúngico, *in vitro*, frente as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* nas suas formas filamentosa e leveduriforme em crescimento planctônico e biofilme;
- As drogas leishmanicidas, antimoniato de meglumina e pentamidina, alteram a organização estrutural dos biofilmes de espécies do complexo *Sporothrix schenckii* nas suas formas filamentosa e leveduriforme;
- As drogas leishmanicidas, antimoniato de meglumina e pentamidina, interagem sinergicamente com os antifúngicos, *in vitro*, frente as espécies do complexo *S. schenckii* nas suas formas filamentosa e leveduriforme em crescimento planctônico e biofilme;
- A exposição prévia de células planctônicas e sésseis de espécies do complexo *Sporothrix schenckii* às drogas leishmanicidas, antimoniato de meglumina e pentamidina, altera o perfil de sensibilidade do microrganismo às drogas antifúngicas.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica dos leishmanicidas antimoniato de meglumina e pentamidina, *in vitro*, e as interações entre essas drogas e os antifúngicos em células planctônicas e sésseis de espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, bem como determinar o efeito da pré-exposição de fungo aos leishmanicidas diante da sensibilidade aos antifúngicos.

4.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil de sensibilidade de células planctônicas e sésseis de espécies do complexo *S. schenckii*, em suas formas filamentosa e leveduriforme, frente a fármacos leishmanicidas.
- Investigar alterações morfológicas nos biofilmes de espécies do complexo *S. schenckii*, em suas formas filamentosa e leveduriforme após exposição aos fármacos leishmanicidas.
- Avaliar as interações farmacológicas entre os leishmanicidas e antifúngicos frente às células planctônicas e sésseis de espécies do complexo *S. schenckii*, em suas formas filamentosa e leveduriforme.
- Determinar o efeito da pré-exposição de espécies do complexo *S. schenckii* aos leishmanicidas, sobre a sensibilidade de células planctônicas e sésseis aos antifúngicos.

5 METODOLOGIA

5.1. Local do estudo

As pesquisas foram realizadas nos laboratórios do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), com participação da Central analítica da UFC na obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

5.2. Microrganismos

Nesse estudo foram utilizadas 19 cepas pertencentes ao complexo *S. schenckii*: 10 cepas de *S. brasiliensis*, 02 de *S. globosa*, 04 de *S. mexicana* e 03 de *S. schenckii sensu stricto* (Tabela 1). Os isolados foram obtidos da coleção de cultura do Centro Especializado de Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil.

Tabela 1 – Origem e local de isolamento das cepas de espécies do complexo *Sporothrix schenckii* utilizadas neste estudo.

Cepas	Espécies	Origem
CEMM 05-3-050	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-052	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão
CEMM 05-3-053	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-054	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-055	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-056	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-057	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-058	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-075	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-078	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-004	<i>Sporothrix globosa</i>	Humano
CEMM 05-3-005	<i>Sporothrix globosa</i>	Humano
CEMM 05-3-008	<i>Sporothrix mexicana</i>	Humano
CEMM 05-3-009	<i>Sporothrix mexicana</i>	Humano
CEMM 05-3-100	<i>Sporothrix mexicana</i>	Vegetal
CEMM 05-4-001	<i>Sporothrix mexicana</i>	Solo
CEMM 05-3-048	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Gato
CEMM 05-3-090	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Humano
CEMM 05-4-002	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Solo

Legenda: CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica.

Para a experimentação com a forma filamentosa, cultivos foram realizados em ágar batata dextrose (PDA) (Himedia, Índia) e incubados a 35 °C, durante 5 dias. Para obtenção da

forma leveduriforme, cultivos sucessivos foram realizados em ágar BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro, incubados a 37 °C por 5 dias. Após a reversão as cepas foram mantidas na forma leveduriforme por repiques em ágar BHI. Foram utilizadas as cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 como controles nos experimentos de sensibilidade antifúngica.

5.3. Drogas teste

Os leishmanicidas antimoniato de meglumina (AMG, Sanofi Pharmaceutica, Suzano, SP, Brasil) e isotionato de pentamidina (PNT, Sigma, St Louis, MO, USA) foram preparados conforme recomendações do fabricante em água destilada estéril, a uma concentração de 10.000 µg/mL e 5.000 µg/mL, respectivamente, sendo estocadas a – 20 °C até o momento de uso. Para controle de qualidade das drogas as mesmas foram utilizadas em teste de inibição das formas promastigota e amastigotas de *Leishmania chagasi* (isolado M6445).

Os antifúngicos anfotericina B (AMB, Sigma, St Louis, MO, USA), itraconazol (ITC, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) e terbinafina (TRB, Sigma, St Louis, MO, USA) foram preparadas em como descrito nos documentos M27-A3 e M38-A2 do CLSI (CLSI, 2008a, 2008b).

5.4. Teste de sensibilidade antifúngica planctônica

Os testes de sensibilidade foram realizados em microplacas de 96 poços, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme os documentos M38-A2 (forma filamentosa) e M27-A3 (forma leveduriforme) do CLSI (CLSI, 2008b, 2008a), com adaptações. As drogas foram testadas em concentrações finais de 4,882-2.500 µg/mL (AMG) ou 0,03-16 µg/mL (PNT, AMB, ITC e TRB). Os inóculos foram preparados em solução salina e em seguida ajustados para uma concentração final de $0,4-5 \times 10^4$ ufc/mL (forma filamentosa) e $0,5-2,5 \times 10^3$ ufc/mL (forma leveduriforme) em meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA), tamponado a pH 7,0 com 0,165M de MOPS (Sigma, St Louis, MO, USA). As microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 h (forma filamentosa) e 37 °C por 96 h (forma leveduriforme). A concentração inibitória mínima (CIM) dos leishmanicidas foram definidas como a menor concentração capaz de inibir 100%, 80% e 50% do crescimento fúngico em comparação com o crescimento fúngico nos poços sem a presença da droga. Para os antifúngicos a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% (AMB e ITC) ou 80% (TRB) do crescimento fúngico em

comparação com o crescimento fúngico na ausência das drogas. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controles de qualidade dos experimentos. Os experimentos foram conduzidos em duplicata em dois momentos distintos.

As cepas de *S. brasiliensis* na forma filamentosa foram classificadas como cepas selvagens ou não-selvagens frente anfotericina B, itraconazol e terbinafina, enquanto as cepas de *S. schenckii* s. str. foram classificadas apenas quanto aos resultados de anfotericina B e itraconazol (ESPINEL-INGROFF et al., 2017).

A concentração fungicida mínima (CFM) das drogas leishmanicidas foi determinada por semeadura, em PDA, do conteúdo de todos os poços com ausência de crescimento fúngico visual. O CFM foi considerado como a menor concentração das drogas que matou 99,9% dos inóculos fúngicos (SCORDINO et al., 2015).

5.5. Avaliação da atividade antifúngica em biofilme

5.5.1. Formação de biofilmes

Para formação dos biofilmes filamentosos e leveduriforme, utilizou-se as metodologias descrita por Brilhante et al. (2017) e Silva (2017), respectivamente. Uma alíquota de 200 µL de suspensão fúngica a 1×10^6 conídios/mL (forma filamentosa) ou 2×10^5 células/mL (forma leveduriforme) preparada em meio RPMI 1640 foi adicionada a microplacas de 96 poços e incubado em estufa a 35 °C (forma filamentosa) ou 37 °C (forma leveduriforme) por 24 horas para adesão celular. Após esse período os poços foram lavados com PBS, preenchidos com 200 µL de meio RPMI e incubados novamente por mais 96 horas, nas mesmas condições, para formação e maturação do biofilme.

5.5.2. Teste de sensibilidade

Uma vez formados, os biofilmes foram lavados com PBS e alíquotas de 200 µL de meio RPMI 1640 contendo diluições em série de duas vezes de cada fármaco foram adicionadas as microplacas que foram então incubadas a 35 °C (forma filamentosa) ou 37 °C (forma leveduriforme) por 72 horas. As concentrações das drogas testadas variaram de 19,531-10.000 µg/mL para AMG e 0,25-128 µg/mL para PNT, AMB, ITC e TRB. Após exposição, o efeito das drogas foi avaliado pela quantificação da atividade metabólica, utilizando o ensaio de redução do XTT (Sigma Chemical Corporation, EUA), como descrito por Brilhante et al.

(2017). Para tanto, alíquotas de 150 μ L da solução XTT-menadiona [1 mg/mL de XTT e 1 mM de menadiona (Sigma Chemical Co., EUA)], preparada em PBS e filtrada em membrana de 0,22 μ M, foram adicionadas aos poços e as placas foram incubadas no escuro por 3 h a 35 °C. Posteriormente, a solução de XTT foi transferida para poços de uma nova placa, seguido por leitura em espectrofotômetro a 492 nm.

A concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) foi determinada como a menor concentração capaz de causar 50% (CIMB₅₀) e 90% (CIMB₉₀) de inibição da atividade metabólica do biofilme, quando comparada à atividade metabólica do controle de crescimento sem drogas (VALENTÍN et al., 2016). Os experimentos foram conduzidos em duplicata em dois momentos distintos.

5.5.3. Avaliação da estrutura e morfologia do biofilme

Os efeitos da pentamidina sobre a estrutura e morfologia dos biofilmes foram avaliados de forma representativa utilizando uma cepa de *S. brasiliensis* (CEMM 05-3-052). Os biofilmes foram formados conforme descrito anteriormente, sobre lâminas de Thermanox® (Thermo Fisher Scientific, New York City, USA) em placas de 24 poços (BRILHANTE et al., 2018; SILVA, 2017). Os biofilmes foram tratados com pentamidina na CIMB₉₀ e avaliados por microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura.

Para a análise por microscopia confocal, os biofilmes foram lavados com tampão PBS e corados por 30 minutos com corante fluorescente Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As lâminas foram observadas em microscópio Confocal Nikon C2, utilizando lasers a 488 nm para detecção do fluorocromo Syto9, que identifica células vivas, e a 561nm para detecção do fluorocromo iodeto de propídeo, que identifica células mortas ou com dano de membrana. Para as análises, imagens tridimensionais foram coletadas de cinco pontos equidistantes do biofilme, a fim de se obterem resultados representativos da amostra (BRILHANTE et al., 2018).

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura, os biofilmes foram fixados com 1000 μ L de solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma Aldrich, St Louis, USA) em tampão cacodilato de sódio (0,15M) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield) com azul de alcian 0,15% (Sigma Aldrich, St Louis, USA), pH 7,2. Os biofilmes ficaram em contato com o fixador por 6 horas a 25 °C. Após a fixação, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato de sódio (0,15M) e seguiu-se uma série de desidratações alcoólicas ascendente: 30, 50, 70, 80, 90 e 100% de etanol, por 10 minutos cada desidratação, repetindo-se mais uma vez a

desidratação com etanol a 100%. Após secagem, os biofilmes foram desidratados com hexametildisilazano (Polysciences Europe, Hirschberg an der Bergstraße, Germany) durante 10 minutos. Em seguida as lâminas foram recobertas com 20 nm de ouro (Emitech Q150T, Quorum Technologies Ltd, Laughton, Lincolnshire, England) e observados em microscópio eletrônico de varredura (Quanta FEG 450), em modo alto vácuo a 20 kV utilizando o detector de elétrons secundários (BRILHANTE et al., 2018).

5.6. Combinação de fármacos leishmanicidas e antifúngicos sobre células planctônicas

Para a avaliação das interações farmacológicas entre os leishmanicidas e os antifúngicos em células planctônicas de *Sporothrix* spp. nas formas filamentosa e leveduriforme, foram utilizadas 14 cepas (05 *S. brasiliensis*; 02 *S. globosa*; 04 *S. mexicana*; 03 *S. schenckii sensu stricto*), empregando-se o método de microdiluição em caldo (*checkerboard*) descrito por Almeida-Paes et al. (2016), com adaptações. Foram testadas combinações de AMG (4,882-2.500 µg/mL) ou PNT (0,008-1 µg/mL) com AMB, ITC ou TRB (0,016-8 µg/mL), adicionando-se 50 µL de cada concentração dos leishmanicidas com 50 µL de cada concentração dos antifúngicos, obtendo-se um design de xadrez 8 por 11. Os valores de CIM obtidos foram utilizados para determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). As combinações com $ICIF \leq 0,5$ foram consideradas sinérgica, aquelas com $0,5 < ICIF \leq 4$ foram tidas como indiferentes e apenas aquelas com $ICIF > 4$ foram classificadas como antogônicas (ODDS, 2003). Os experimentos foram conduzidos em duplicatas em dois momentos distintos.

5.7. Combinação de fármacos leishmanicidas e antifúngicos sobre células sésseis

Para a avaliação das interações entre os leishmanicidas e os antifúngicos em células sésseis de *Sporothrix* spp. nas formas filamentosa e leveduriforme, foram utilizadas 14 cepas (05 *S. brasiliensis*; 02 *S. globosa*; 04 *S. mexicana*; 03 *S. schenckii sensu stricto*), empregando-se o método de microdiluição em caldo (*checkerboard*) descrito por Valentín et al. (2016), com adaptações. Os biofilmes foram formados como descrito previamente e expostos a concentrações combinadas das drogas AMG (78,125-10.000 µg/mL) ou PNT (0,06-8 µg/mL) com AMB, ITC ou TRB (0,06-128 µg/mL), adicionando-se 50 µL de cada concentração dos leishmanicidas com 50 µL de cada concentração dos antifúngicos, obtendo-se um design de xadrez 8 por 12. O ICIF para cada combinação realizada foi determinado e interpretado como

descrito anteriormente, utilizando-se a CIMB₉₀ ao invés da CIM. Os experimentos foram conduzidos em duplicatas em dois momentos distintos.

5.8. Pré-exposição de *Sporothrix* spp. aos leishmanicidas

A pré-exposição de *Sporothrix* spp. aos leishmanicidas foi realizada com base na metodologia de Rajendran et al. (2015) e Rocha et al. (2016), com adaptações. Suspensões de 1×10^3 células/mL de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme foram expostas a concentrações sub-inibitórias de AMG (1250 µg/mL) ou PNT (MIC/2) em caldo BHI e incubadas a 37 °C durante 7 dias. Após esse período as células eram centrifugadas a $4,583 \times g$ durante 10 minutos, lavadas com PBS por duas vezes e exposição novamente as drogas nas mesmas condições. Esse procedimento foi repetido quatro vezes. Após os ciclos de exposições, utilizou-se as células no preparo dos inóculos para os testes de sensibilidade antifúngica de células planctônicas e sésseis. Os ensaios foram realizados em duplicata em dois momentos distintos.

5.9. Análises estatísticas

Nas comparações entre dados que apresentaram distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste de T de Student ou ANOVA seguido do pós-teste de Tukey's. Nas comparações em que os dados apresentaram assimetria foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon ou Friedman seguidos do pós-teste de Dunn's. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 95 % ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1. Ensaio de sensibilidade antifúngica planctônica

Dentre os leishmanicidas apenas a pentamidina apresentou atividade inibitória frente as espécies do complexo *S. schenckii* na sua forma filamentosa (Tabela 2) e leveduriforme (Tabela 3), não sendo obtido valores de CIM para o antimoniato de meglumina.

Os valores de CIM da pentamidina para a forma filamentosa de *Sporothrix* spp. variaram de 0,03 a 0,5 µg/mL para 50% de inibição do crescimento; de 0,06 a 1 µg/mL para 80% de inibição e de 0,13 a 2 µg/mL para 100% de inibição. Para as drogas antifúngicas os valores de CIM obtidos variaram de 0,25 a 4 µg/mL para anfotericina B; de 0,25 a 4 µg/mL para itraconazol e de 0,03 a 0,25 µg/mL para terbinafina. Dentre as 10 cepas de *S. brasiliensis*, algumas foram classificadas como cepas não-selvagens (Tabela 2), sendo uma cepa baseada na CIM para anfotericina B, três para itraconazol e cinco para terbinafina. A pentamidina apresentou valores de CIM para 100% de inibição estatisticamente semelhantes aos obtidos para anfotericina B e itraconazol ($p < 0,05$) e de CIM para 80% de inibição semelhantes aos observados para terbinafina ($p < 0,05$). Com relação aos valores de CFM da pentamidina foram observados resultados variando de 0,13 a 2 µg/mL, sem diferenças estatísticas com a CIM para 100% de inibição fúngica.

Quanto aos resultados de CIM da pentamidina para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., as mesmas variaram de concentrações menores que 0,03 até 0,06 µg/mL para 50% de inibição do crescimento fúngico; de 0,03 a 0,13 µg/mL para 80% de inibição e de 0,06 a 0,25 µg/mL para 100% de inibição. Para as drogas antifúngicas os valores de CIM observados encontravam-se entre 0,03 a 0,5 µg/mL para anfotericina B, 0,03 a 1 µg/mL para itraconazol e 0,03 a 0,13 µg/mL para terbinafina. A pentamidina apresentou valores de CIM para 100% de inibição semelhantes aos encontrados para anfotericina B e mostrou valores significativamente menores que os obtidos para itraconazol ($p < 0,05$). A CIM para 80 % de inibição é semelhante a CIM de terbinafina ($p < 0,05$). Com relação aos valores de CFM da pentamidina foram observados resultados variando de 0,06 a 0,25 µg/mL, sem diferenças estatísticas entre a CFM e a CIM para 100% de inibição fúngica ($p < 0,05$).

Ainda foi observado que os valores de CIM da pentamidina, bem de anfotericina B e itraconazol, foram significativamente menores ($p < 0,05$) para a forma leveduriforme do fungo quando comparada com sua forma filamentosa.

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos e leishmanicidas frente a espécies do complexo *Sporothrix schenckii* na forma filamentosa.

Espécie	Agentes antifúngicos			Agentes leishmanicidas				
	Anfotericina B	Itraconazol	Terbinafina	Antimoniato de meglumina	Pentamidina			
	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM			CFM
				50%	50%	80%	100%	
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=10)	0,25 (2)*	0,25 (1)	0,03 (2)	>2500 (10)	0,03 (2)	0,06 (2)	0,13 (2)	0,13 (1)
	0,5 (2)	0,5 (3)	0,06 (3)		0,13 (2)	0,25 (1)	0,5 (2)	0,25 (1)
	2 (5)	1 (3)	0,13 (3) ^{CNS}		0,25 (6)	0,5 (6)	1 (6)	1 (5)
	4 (1) ^{CNS}	2 (2) ^{CNS}	0,25 (2) ^{CNS}					2 (3)
		4 (1) ^{CNS}						
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)	0,5 (1)	1 (1)	0,06 (2)	>2500 (2)	0,13 (1)	0,25 (1)	0,5 (1)	0,5 (1)
	2 (1)	2 (1)			0,25 (1)	0,5 (1)	1 (1)	2 (1)
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)	0,5 (1)	0,5 (1)	0,13 (3)	>2500 (4)	0,13 (1)	0,25 (1)	0,5 (1)	1 (3)
	1 (2)	1 (1)	0,25 (1)		0,25 (3)	0,5 (3)	1 (3)	2 (1)
	4 (1)	2 (2)						
<i>Sporothrix schenckii</i> <i>sensu stricto</i> (n=3)	0,25 (1)	0,5 (1)	0,13 (1)	>2500 (3)	0,25 (2)	0,5 (2)	1 (2)	1 (2)
	1 (2)	1 (2)	0,25 (2)		0,5 (1)	1 (1)	2 (1)	2 (1)

Legenda: *: Números dentro dos parênteses representam a quantidade de cepas inibidas por essa concentração de droga. CIM: Concentração Inibitória Mínima (µg/mL). CFM: Concentração Fungicida Mínima (µg/mL). CNS: Cepas não-selvagens segundo a classificação de Espinel-Ingroff et al. (2017).

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos e leishmanicidas frente a espécies do complexo *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme.

Espécie (n)	Agentes antifúngicos			Agentes leishmanicidas				
	Anfotericina B	Itraconazol	Terbinafina	Antimoniato de meglumina	Pentamidina			
	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM			CFM
				50%	50%	80%	100%	
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=10)	0,13 (3)*	0,25 (3)	0,03 (5)	>2500 (10)	< 0,03 (2)	0,03 (2)	0,06 (2)	0,06 (1)
	0,25 (3)	0,5 (7)	0,13 (5)		0,03 (5)	0,06 (5)	0,13 (5)	0,13 (4)
	0,5 (4)				0,06 (3)	0,13 (3)	0,25 (3)	0,25 (5)
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)	0,03 (1)	0,03 (1)	0,03 (2)	>2500 (2)	0,03 (1)	0,06 (1)	0,13 (1)	0,25 (2)
	0,25 (1)	0,25 (1)			0,06 (1)	0,13 (1)	0,25 (1)	0,25 (1)
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)	0,13 (1)	0,25 (2)	0,03 (1)	>2500 (4)	< 0,03 (1)	0,03 (1)	0,06 (1)	0,13 (2)
	0,25 (1)	0,5 (1)	0,13 (3)		0,03 (2)	0,06 (2)	0,13 (2)	0,25 (2)
	0,5 (2)	1 (1)			0,06 (1)	0,13 (1)	0,25 (1)	
<i>Sporothrix schenckii</i> <i>sensu stricto</i> (n=3)	0,06 (2)	0,25 (1)	0,03 (1)	>2500 (3)	0,03 (1)	0,06 (1)	0,13 (1)	0,13 (1)
	0,13 (1)	0,5 (2)	0,13 (2)		0,06 (2)	0,13 (2)	0,25 (2)	0,25 (2)

Legenda: *: Números dentro dos parênteses representam a quantidade de cepas inibidas por essa concentração de droga. CIM: Concentração Inibitória Mínima (µg/mL). CFM: Concentração Fungicida Mínima (µg/mL).

6.2. Ensaio de sensibilidade antifúngica em biofilme

Dentre os leishmanicidas apenas a pentamidina apresentou atividade inibitória ante os biofilmes de *Sporothrix* spp. na sua forma filamentosa (Tabela 4) e leveduriforme (Tabela 5).

Os valores de CIMB₅₀ de pentamidina para a forma filamentosa de *Sporothrix* spp. variaram de 4 a 16 µg/mL, enquanto a CIMB₉₀ variou de 16 a 64 µg/mL. Para as drogas antifúngicas os valores de CIMB₅₀ variaram de 16 a 64 µg/mL para anfotericina B e itraconazol e de 1 a 16 µg/mL para terbinafina. Quanto a CIMB₉₀, os antifúngicos apresentaram valores variando de 32 a 128 µg/mL para anfotericina B, de 64 a 128 µg/mL para itraconazol e de 4 a 64 µg/mL para terbinafina.

Quanto aos biofilmes de *Sporothrix* spp. na sua forma leveduriforme, as CIMB₅₀ e CIMB₉₀ de pentamidina variaram, respectivamente, de 1 a 4 µg/mL e de 4 a 16 µg/mL. Para as drogas antifúngicas as mesmas variaram, respectivamente de 1 a 64 µg/mL e de 4 a 128 µg/mL para anfotericina B, de 4 a 32 µg/mL e 16 a 128 µg/mL para itraconazol e de 1 a 8 µg/mL e 8 a 32 µg/mL para terbinafina.

A pentamidina apresentou valores de CIMB₅₀ e CIMB₉₀ estatisticamente menores que os observados para anfotericina B e itraconazol, e semelhantes aos obtidos para terbinafina para ambas as formas filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp. ($p < 0,05$).

Ainda foi observado que os valores de CIMB₅₀, assim como os de CIMB₉₀, de pentamidina e anfotericina B são significativamente menores ($p < 0,05$) para a forma leveduriforme do fungo quando comparada com sua forma filamentosa.

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima dos leishmanicidas e antifúngicos para inibição do biofilme de espécies do complexo *Sporothrix schenckii* na forma filamentosa.

Espécie	Agentes antifúngicos						Agentes Leishmanicidas		
	Anfotericina B		Itraconazol		Terbinafina		Antimoniato de meglumina	Pentamidina	
	CIMB ₅₀	CIMB ₉₀	CIMB ₅₀	CIMB ₉₀	CIMB ₅₀	CIMB ₉₀	CIMB ₅₀	CIMB ₅₀	CIMB ₉₀
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=10)	16 (2)*	32 (2)	16 (1)	64 (4)	1 (2)	4 (2)	> 10000 (10)	4 (6)	16 (3)
	32 (6)	64 (2)	32 (8)	128 (6)	2 (3)	8 (3)		8 (1)	32 (4)
	64 (2)	128 (6)	64 (1)		4 (3)	16 (3)		16 (3)	64 (3)
					8 (2)	64 (2)			
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)	32 (2)	64 (1)	32 (2)	128 (2)	4 (2)	8 (2)	> 10000 (2)	4 (1)	32 (2)
		128 (1)						8 (1)	
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)	16 (1)	32 (1)	16 (2)	64 (1)	8 (3)	16 (2)	> 10000 (4)	4 (2)	32 (2)
	32 (1)	64 (1)	32 (2)	128 (3)	16 (1)	32 (1)		8 (2)	64 (2)
	64 (2)	128 (2)				64 (1)			
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i> (n=3)	16 (1)	32 (1)	16 (2)	64 (2)	8 (2)	16 (1)	> 10000 (3)	4 (1)	16 (1)
	32 (2)	128 (2)	32 (1)	128 (1)	16 (1)	32 (2)		8 (1)	32 (2)
								16 (1)	

Legenda: *: Números dentro dos parênteses representam a quantidade de cepas inibidas por essa concentração de droga. CIMB₅₀: Concentração inibitória mínima em biofilme (µg/mL) capaz de inibir 50% da atividade metabólica do biofilme. CIMB₉₀: Concentração inibitória mínima em biofilme (µg/mL) capaz de inibir 90% da atividade metabólica.

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima dos leishmanicidas e antifúngicos para inibição do biofilme de espécies do complexo *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme.

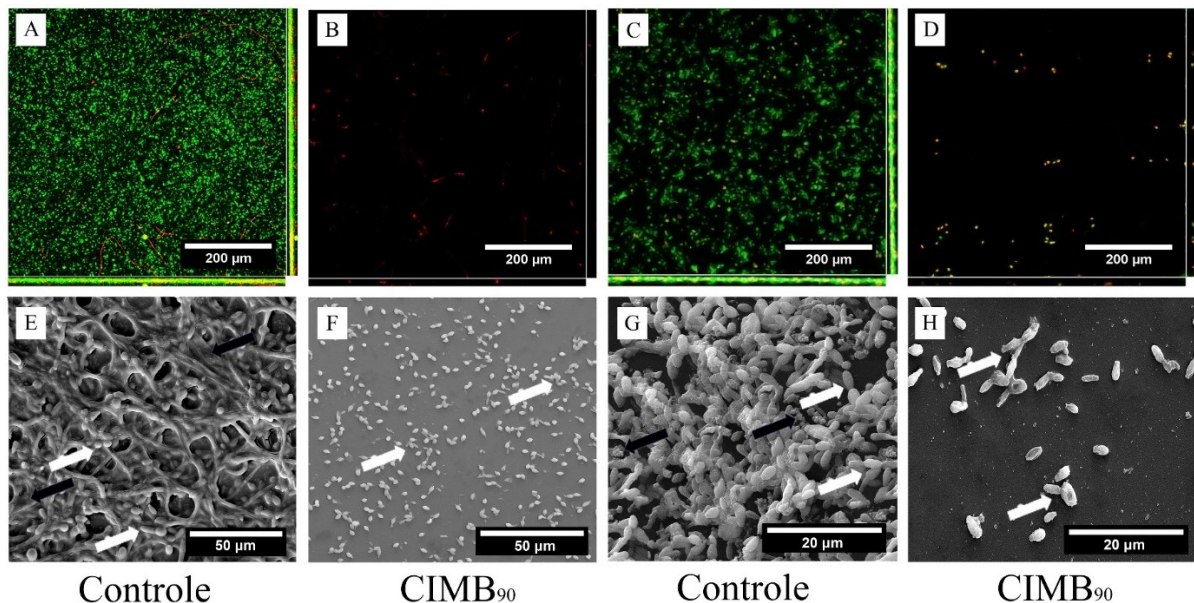
Espécie	Agentes antifúngicos						Agentes Leishmanicidas		
	Anfotericina B		Itraconazol		Terbinafina		Antimoniato de meglumina	Pentamidina	
	CIMB ₅₀	CIMB ₉₀	CIMB ₅₀	CIMB ₉₀	CIMB ₅₀	CIMB ₉₀	CIMB ₅₀	CIMB ₅₀	CIMB ₉₀
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=10)	4 (1)*	16 (3)	16 (6)	64 (5)	2 (5)	8 (5)	> 10000 (10)	1 (2)	4 (1)
	8 (3)	32 (2)	32 (4)	128 (5)	4 (1)	16 (2)		2 (5)	8 (6)
	16 (3)	64 (2)			8 (4)	32 (3)		4 (3)	16 (3)
	32 (1)	128 (3)							
	64 (2)								
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)	8 (1)	32 (1)	32 (1)	64 (1)	1 (2)	16 (2)	> 10000 (2)	2 (1)	8 (1)
	16 (1)	64 (1)	16 (1)	128 (1)				4 (1)	16 (1)
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)	4 (1)	16 (2)	16 (1)	64 (1)	2 (2)	8 (2)	> 10000 (4)	1 (1)	8 (2)
	8 (3)	32 (2)	32 (3)	128 (3)	4 (2)	16 (1)		2 (2)	16 (1)
						32 (1)		4 (1)	32 (1)
<i>Sporothrix schenckii</i>	1 (2)	8 (2)	16 (2)	64 (3)	2 (2)	16 (2)	> 10000 (3)	2 (2)	8 (2)
<i>sensu stricto</i> (n=3)	2 (1)	16 (1)	32 (1)		8 (1)	32 (1)		4 (1)	16 (1)

Legenda: *: Números dentro dos parênteses representam a quantidade de cepas inibidas por essa concentração de droga. CIMB₅₀: Concentração inibitória mínima em biofilme (µg/mL) capaz de inibir 50% da atividade metabólica do biofilme. CIMB₉₀: Concentração inibitória mínima em biofilme (µg/mL) capaz de inibir 90% da atividade metabólica.

6.3. Estrutura e morfologia do biofilme

Através da microscopia confocal de varredura a laser e da microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a estrutura dos biofilmes de *S. brasiliensis* em suas formas filamentosa e leveduriforme antes e após exposição a pentamidina (Figura 8).

Figura 8 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Sporothrix brasiliensis*.



Legenda: Biofilmes de *Sporothrix brasiliensis* (CEMM 05-3-052) na forma filamentosa (A, B, E e F) e leveduriforme (C, D, G e H). A, C, E e G: Biofilmes maduros sem exposição à pentamidina. B, D, F e H: Biofilmes maduro após exposição por 72 horas a pentamidina na sua concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% da atividade metabólica do biofilme (CIMB₉₀). Setas brancas indicam estruturas fúngicas. Setas pretas indicam presença de matriz extracelular. Após exposição dos biofilmes a CIMB₉₀ de pentamidina nota-se a redução da biomassa do biofilme causada pela desestruturação do biofilme, observando-se apenas algumas células aderidas a superfícies. Magnificação: 5000 × (C e D), 4032 × (A), 2000 × (B) e 400× (E, F, G e H). Escala: 200 μm (E e F), 100 μm (G e H), 50 μm (A e B) e 20 μm (C e D). Lasers: 488 nm para detecção de SYTO9 (cora em verde as células viáveis) e 561 nm para detecção de iodeto de propídio (cora em vermelho as células mortas ou com danos na membrana).

O biofilme da forma filamentosa sem exposição a pentamidina apresentou camadas de hifas entrelaçadas e conídios recobertos por matriz extracelular (Figura 8E), enquanto o biofilme exposto a droga perdeu essa organização em camadas, sendo observado apenas alguns conídios aderidos a lâmina de Thermanox (Figura 8F). A microscopia confocal revelou que as poucas estruturas fúngicas aderidas a lâmina de Thermanox estavam inviáveis (Figura 8B).

No biofilme leveduriforme foi observado agregados de células, com uma espessura reduzida e pouca matriz extracelular recobrindo e unindo essas células (Figura 8G). Quando exposto a pentamidina na CIMB₉₀, foi possível observar que havia raras células aderidas a lâmina de Thermanox e ausência de matriz extracelular (Figura 8H). A microscopia confocal mostrou que as poucas células observadas após exposição do biofilme apresentavam-se mortas ou com dano de membrana (Figura 8D).

6.4. Combinação de drogas frente células planctônicas de *Sporothrix* spp.

Para a forma filamentosa de *Sporothrix* spp., as combinações entre o antimoniato de meglumina e os antifúngicos apresentaram apenas interações tidas como indiferentes ($ICIF = 0,5 < ICIF \leq 4$). As combinações entre pentamidina e anfotericina B mostraram efeito sinérgico contra 13 das 14 cepas testadas, observando-se indiferença frente uma cepa de *S. brasiliensis*. Quanto as combinações entre pentamidina e itraconazol, assim como pentamidina e terbinafina, foram observadas interação sinérgica com todas as cepas testadas. Os valores de ICIF para as combinações de pentamidina com os antifúngicos variaram de 0,14 a 0,5 para combinação com anfotericina B, de 0,25 a 0,5 para combinação com itraconazol e de 0,25 a 0,75 para combinação com terbinafina.

Para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., também foram observadas apenas interações indiferentes ($ICIF = 0,5 < ICIF \leq 4$) para as combinações entre o antimoniato de meglumina e os antifúngicos. As combinações entre pentamidina e anfotericina B, mostraram efeito sinérgico contra 13 das 14 cepas testadas, tendo sido observado indiferença contra uma cepa de *S. globosa*. As combinações de pentamidina com itraconazol e pentamidina e terbinafina resultaram sinergismo frente todas as cepas testadas. Os valores de ICIF para as combinações da pentamidina e os antifúngicos variaram de 0,16 a 0,63 para combinação com anfotericina B, de 0,18 a 0,5 para combinação com itraconazol e de 0,31 a 0,5 para combinação com terbinafina.

Na tabela 6 são expressos os valores de média geométrica, por espécies de *Sporothrix*, da CIM das drogas isoladas e combinadas com a pentamidina, bem como o ICIF obtido para as formas filamentosa e leveduriforme do fungo em crescimento planctônico.

Tabela 6 – Concentração inibitória mínima de pentamidina combinada com antifúngicos, frente células planctônicas de *Sporothrix* spp., nas formas filamentosa e leveduriforme, e índice de concentração inibitória fracionada.

Espécie (n)		Concentração inibitória mínima (µg/mL) [#]							Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) [#]		
		Drogas isoladas				Drogas combinadas			PNT + AMB	PNT + ITC	PNT + TRB
		PNT	AMB	ITC	TRB	PNT / AMB	PNT / ITC	PNT / TRB			
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=5)	FF	0,38	2,3	1,74	0,08	0,06 / 0,16	0,06 / 0,25	0,06 / 0,02	0,26 ^S	0,32 ^S	0,47 ^{S*}
	FL	0,13	0,22	0,38	0,09	0,02 / 0,02	0,02 / 0,04	0,02 / 0,02	0,31 ^S	0,28 ^S	0,4 ^S
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)	FF	0,71	1	1,41	0,06	0,04 / 0,18	0,06 / 0,35	0,13 / 0,02	0,24 ^S	0,34 ^S	0,43 ^S
	FL	0,18	0,09	0,28	0,03	0,03 / 0,02	0,02 / 0,02	0,02 / 0,01	0,48 ^{S*}	0,21 ^S	0,4 ^S
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)	FF	0,84	1,19	1,19	0,15	0,21 / 0,13	0,13 / 0,21	0,15 / 0,04	0,38 ^S	0,37 ^S	0,43 ^S
	FL	0,13	0,3	0,42	0,09	0,03 / 0,03	0,03 / 0,03	0,03 / 0,01	0,37 ^S	0,29 ^S	0,4 ^S
<i>Sporothrix schenckii</i> <i>sensu stricto</i> (n=3)	FF	1,26	0,63	0,79	0,2	0,16 / 0,1	0,16 / 0,16	0,2 / 0,03	0,29 ^S	0,35 ^S	0,33 ^S
	FL	0,2	0,08	0,4	0,08	0,02 / 0,02	0,05 / 0,02	0,05 / 0,01	0,39 ^S	0,3 ^S	0,41 ^S

Legenda: [#]: Valores expressos em média geométrica. PNT: Pentamidina. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. FF: forma filamentosa. FL: forma leveduriforme. ^S: Sinergismo. ^{S*}: Sinergismo, exceto para uma cepa que apresentou indiferença.

6.5. Combinação de drogas frente células sésseis de *Sporothrix* spp.

Para a forma filamentosa de *Sporothrix* spp., as combinações entre o antimoniato de meglumina e os antifúngicos apresentaram apenas interações tidas como indiferentes ($ICIF = 0,5 < ICIF \leq 4$) (dados não mostrados). As combinações entre pentamidina e anfotericina B e entre pentamidina e itraconazol apresentaram efeito sinérgico com as cepas de *S. brasiliensis*, *S. mexicana* e *S. schenckii sensu stricto*, sendo observado indiferenças frente as cepas de *S. globosa*. Quanto as combinações entre pentamidina e terbinafina, foram observadas interação sinérgica apenas com as cepas de *S. brasiliensis* e *S. schenckii sensu stricto*. Os valores de ICIF para as combinações de pentamidina com os antifúngicos variaram de 0,38 a 0,75 para combinação com anfotericina B e itraconazol e de 0,31 a 1,5 para combinações com terbinafina.

Para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., também foram observadas apenas interações indiferentes ($ICIF = 0,5 < ICIF \leq 4$) para as combinações entre o antimoniato de meglumina e os antifúngicos. As combinações entre pentamidina e anfotericina B, itraconazol e terbinafina foram todas classificadas como sinérgicas, para todas as cepas testadas. Os valores de ICIF para as combinações da pentamidina e os antifúngicos variaram de 0,16 a 0,38 para combinação com anfotericina B, de 0,08 a 0,38 para combinação com itraconazol e de 0,13 a 0,5 para combinação com terbinafina.

Na tabela 7 são expressos os valores de média geométrica, por espécies de *Sporothrix*, da CIMB₉₀ das drogas isoladas e combinadas com a pentamidina, bem como o ICIF obtido para as formas filamentosa e leveduriforme do fungo em biofilme.

6.6. Pré-exposição de *Sporothrix* spp. aos leishmanicidas

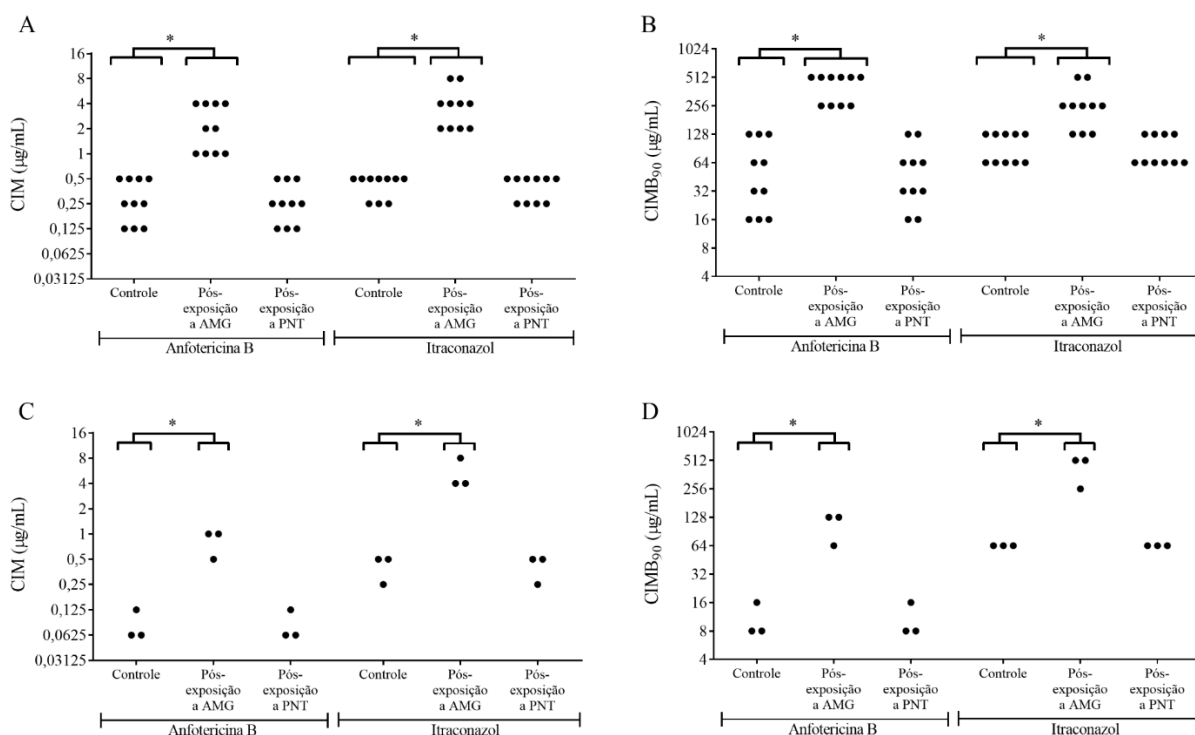
A exposição previa das células leveduriformes de *Sporothrix* spp. ao antimoniato de meglumina provocou um aumento significativo ($p < 0,001$) na tolerância de células planctônicas e sésseis de *S. brasiliensis* e *S. schenckii sensu stricto* frente a anfotericina B e itraconazol (Figura 9). Não foram observadas diferenças na tolerância a terbinafina. Também não foi observado alterações na responsividade das células quando as mesmas foram pré-expostas a pentamidina.

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima para biofilme (CIMB) de pentamidina combinada com antifúngicos frente biofilmes de *Sporothrix* spp., nas formas filamentosa e leveduriforme, e índice de concentração inibitória fracionada.

Espécie (n)		CIMB ₉₀ (µg/mL) [#]							Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) [#]		
		Drogas isoladas				Drogas combinadas					
		PNT	AMB	ITC	TRB	PNT / AMB	PNT / ITC	PNT / TRB	PNT + AMB	PNT + ITC	PNT + TRB
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=5)	FF	24,25	128	128	21,11	6,06 / 24,25	6,06 / 21,11	6,06 / 1,52	0,45 ^S	0,42 ^S	0,32 ^S
	FL	6,96	32	97,01	12,13	1,15 / 4,59	1,32 / 5,28	1,32 / 2	0,35 ^S	0,25 ^S	0,37 ^S
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)	FF	32	90,51	128	8	16 / 22,63	16 / 32	8 / 8	0,75 ^I	0,75 ^I	1,25 ^I
	FL	11,31	45,25	90,51	16	1,41 / 2	1,41 / 2,83	1 / 0,71	0,17 ^S	0,16 ^S	0,14 ^S
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)	FF	45,25	76,11	107,63	26,91	11,31 / 19,03	9,51 / 22,63	22,63 / 19,03	0,5 ^S	0,43 ^S	1,22 ^I
	FL	13,45	22,63	107,63	13,45	1,68 / 3,36	1,41 / 2	1,68 / 1,19	0,28 ^S	0,13 ^S	0,22 ^S
<i>Sporothrix schenckii</i> <i>sensu stricto</i> (n=3)	FF	25,4	80,63	80,63	20,16	6,35 / 16	6,35 / 20,16	6,35 / 5,04	0,45 ^S	0,5 ^S	0,5 ^S
	FL	12,7	10,08	64	10,08	1,26 / 1,59	1 / 8	1 / 0,79	0,27 ^S	0,21 ^S	0,16 ^S

Legenda: [#]: Valores expressos em média geométrica. CIMB₉₀: Concentração inibitória mínima em biofilme capaz de inibir 90% da atividade metabólica do biofilme. PNT: Pentamidina. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. FF: forma filamentosa. FL: forma leveduriforme. ^S: Sinergismo. ^I: Indiferença.

Figura 9 – Concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em biofilme dos antifúngicos após a pré-exposição de *Sporothrix* spp. ao antimoníato de meglumina e a pentamidina.



Legenda: Concentração inibitória mínima (A e C) e Concentração inibitória mínima em biofilme (B e D) de anfotericina B e itraconazol antes e após pré-exposição da forma leveduriforme de *Sporothrix brasiliensis* (n=10) (A e B) e *Sporothrix schenckii* (n=3) (C e D) ao antimoníato de meglumina e a pentamidina. Controle: Células sem pré-exposição ao antimoníato de meglumina ou pentamidina. Pré-exposição: Células pré-expostas a concentrações sub-inibitórias de antimoníato de meglumina ou pentamidina. *: diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

7 DISCUSSÃO

Dado o contexto de mimetismo clínico da esporotricose com a leishmaniose, aos desafios do diagnóstico e os diferentes tratamentos que o seguem, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de fármacos leishmanicidas sobre o crescimento planctônico e em biofilme de espécies do complexo *S. schenckii*, suas interações com os antifúngicos, bem como os efeitos da pré-exposição desses fungos aos leishmanicidas diante da sensibilidade aos antifúngicos.

Inicialmente obtivemos as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das cepas em crescimento planctônico. Os resultados obtidos para as drogas antifúngicas anfotericina B, itraconazol e terbinafina estão na mesma faixa de concentrações descrita por outros estudos

(ALMEIDA-PAES et al., 2016a; BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2018; FRANCESCONI et al., 2009). Com bases nos pontos de corte epidemiológicos propostos por Espinel-Ingroff et al. (2017), algumas cepas de *S. brasiliensis* na sua forma filamentosa foram consideradas como cepas não-selvagens quando observado os valores de CIM para anfotericina B (1/10), itraconazol (3/10) e terbinafina (5/10). Cepas com essa classificação são estimadas como causadoras de infecções resistentes ao tratamento com os antifúngicos (ESPINEL-INGROFF et al., 2017).

Quanto ao efeito antifúngico das drogas leishmanicidas no crescimento planctônico de *Sporothrix* spp., foi observado nesse estudo que o AMG não foi capaz de inibir o crescimento fúngico em nenhuma das concentrações testadas, enquanto que a PNT apresentou CIMs para 50%, 80% e 100% de inibição do crescimento para ambas as formas, filamentosa e leveduriforme, de *Sporothrix* spp., com valores semelhantes aos obtidos para as drogas antifúngicas.

No presente estudo também foi observado que os valores de CIM de PNT para 100% de inibição do crescimento de *Sporothrix* spp. e a CFM eram semelhantes, não havendo diferenças estatísticas entre esses parâmetros, indicando que esta droga pode ter ação fungicida sobre *Sporothrix* spp. Além disso, de forma geral a forma leveduriforme apresentou CIMs em torno de 4 vezes menores que os obtidos para a forma filamentosa. Essa diferença na sensibilidade entre as formas de *Sporothrix* spp. já foram relatadas anteriormente (SANCHOTENE et al., 2017) e está relacionada possivelmente com a presença de melanina na parede celular deste fungo, que atua protegendo o microrganismo contra drogas antifúngicas (ALMEIDA-PAES et al., 2016a; MADRID et al., 2010; MARIO et al., 2016), sendo produzida em menor quantidade pela forma leveduriforme se comparada com a forma filamentosa do fungo (ALMEIDA-PAES et al., 2017a).

Com base no biofilme como fator de resiliência para sobrevivência dos microrganismos, investigamos a atividade antifúngica das drogas AMB, ITC, TRB, AMG e PNT nos biofilmes maduros de *Sporothrix* spp. Foi observado que as CIM₉₀ para AMB, ITC, TRB e PNT foram em média 128 vezes maiores que as respectivas CIMs, demonstrando a alta tolerância dos biofilmes a estas drogas. Esse aumento na concentração das drogas necessárias para combater esses biofilmes está possivelmente relacionado a superexpressão de bombas de efluxo, a baixa expressão de alvos moleculares utilizados pelos fármacos para exercerem sua ação, mudanças na fisiologia geral das células, alta densidade celular e a presença de matriz extracelular (RAMAGE et al., 2012). Assim como observado para células planctônicas, o AMG não apresentou atividade inibitória para os biofilmes de *Sporothrix* spp.

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que a CIMB₉₀ da PNT desfez a organização estrutural do biofilme, sendo encontradas apenas algumas células ainda aderidas na superfície da Thermanox. Embora houvesse ainda algumas células aderidas à Thermanox, a microscopia confocal relevou que essas células estavam mortas ou com dano de membrana.

O resultado, *in vitro*, da ação do AMG vai ao encontro do relato de Mahmoudi e Zaini, (2015) onde foi relatado o uso de AMG em paciente com esporotricose que recebeu diagnóstico inicial de leishmaniose, sem resposta terapêutica, indicando que essa droga de fato não tem atividade contra *Sporothrix* spp. Esse fato pode estar diretamente relacionado com o mecanismo de ação dessa droga, uma vez que uma das teorias mais aceitas é que o princípio ativo dessa medicação, o antimônio pentavalente (Sb⁺⁵), funciona como um pró-fármaco que precisa ser metabolizado no interior de macrófagos ou amastigotas da *Leishmania* spp. para a sua forma trivalente (Sb⁺³) tida como a forma tóxica do composto (DUQUE et al., 2016).

Embora existam alguns estudos sobre o efeito, *in vitro*, da PNT em células planctônicas de fungos como *Cryptococcus neoformans* (BARCHIESI et al., 1994), *Candida* spp. (DONKOR; CLARK, 1999), *Aspergillus brasiliensis* (GOA; CAMPOLI-RICHARDS, 1987) e *Fusarium* spp. (VENTURINI et al., 2016), não foram encontrados em nossas buscas estudo sobre seu efeito em espécies de *Sporothrix*. Vale ressaltar que além de ter aplicação no tratamento da leishmaniose, essa droga também é utilizada no tratamento de pneumocistose, infecção fúngica causadas por *Pneumocystis jirovecii*, tendo portanto seu potencial antifúngico comprovado *in vivo* (CREEMERS-SCHILD et al., 2016). Ainda, destaca-se que este trabalho é pioneiro na avaliação da PNT sobre biofilmes fúngicos.

Quanto ao efeito dos leishmanicidas em combinação com os antifúngicos, observou-se que o AMG não apresentou interação com os antifúngicos, tendo sido todas as combinações classificadas com indiferentes. A PNT por outro lado apresentou efeito sinérgico com os três antifúngicos testados frente o crescimento planctônico e biofilme de *Sporothrix* spp., com reduções de até 64 vezes a CIM e 128 vezes a CIMB₉₀ dos antifúngicos, sendo encontradas indiferenças entre PNT e os antifúngicos apenas para os biofilmes da forma filamentosa de *S. globosa* e entre PNT e terbinafina para os biofilmes da forma filamentosa de *S. mexicana*.

Outros estudos também demonstraram sinergismo quando PNT foi combinada com antifúngicos, como a AMB contra *S. proliferans* e com ITC frente *C. albicans*, em crescimento planctônico (AFELTRA et al., 2002; ST-GERMAIN, 1990). Vários mecanismos de ação foram propostos para PNT, tais como inibição de síntese de DNA, RNA e proteínas (DONKOR;

CLARK, 1999), entretanto como o mecanismo de ação da PNT não é totalmente elucidado, torna-se difícil caracterizar o sinergismo observado com os antifúngicos.

Por ter vias de aplicação intravenosa, inalatória, oral e intralesional (CLEMENT et al., 2017; SOTO et al., 2016), PNT poderia ser combinada com antifúngicos na prática clínica de diversas formas: aplicação inalatória combinada com AMB para o tratamento de esporotricose sistêmica ou pulmonar, reduzindo a dose de ambas as drogas e consequentemente seus efeitos tóxicos; uso oral ou aplicação intralesional combinada com ITC ou TRB no tratamento de esporotricose fixa ou linfocutânea, aumentando ainda mais a efetividade do tratamento. Embora a combinação entre PNT e AMB tenha sido observada *in vitro*, neste e em outros estudos, sua utilização clínica combinada deve ser realizada com muita cautela, uma vez que ambas as drogas são nefrotóxicas, devendo-se acompanhar sua utilizações com exames laboratoriais para avaliação da função renal constantemente (PHARMACEUTICALS, 2008).

A concentração sanguínea de PNT pode variar de 0,5 a 3,2 µg/mL (VENTURINI et al., 2016), nesse estudo relatamos valores de CIM de PNT frente a forma parasitária de *Sporothrix* spp. menores que seu pico plasmático, indicando que sua ação *in vivo*, isoladamente é possível. E embora a PNT tenha apresentado valores de inibição para os biofilmes da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., acima da sua concentração sanguínea, quando combinada com os antifúngicos, seus valores, assim como os de TRB, foram reduzidos para concentrações clinicamente viáveis, representando, portanto, uma possível estratégia no combate a biofilmes de *Sporothrix* spp. Uma vez que o Ministério da Saúde possui um programa de distribuição gratuita desses medicamentos leishmanicidas com repasse aos estados, a possibilidade de uso destas drogas torna-se ainda maior (BRASIL, 2017).

A exposição previa das células leveduriformes de *Sporothrix* spp. ao AMG, provocou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) na sensibilidade de células planctônicas e biofilmes de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* s. str. aos antifúngicos AMB e ITC, não sendo observadas alterações na sensibilidade a terbinafina. A pré-exposição a PNT também não gerou alterações significativas na sensibilidade aos antifúngicos.

Diminuição da sensibilidade aos antifúngicos devido pré-exposição a outras drogas já foi relatada. A pré-exposição de *Candida parapsilosis* ao tetraconazol gerou uma resistência cruzada a esta droga e ao fluconazol, após ciclo de exposição contínua. (ROCHA et al., 2016) Assim como a pré-exposição de *Aspergillus fumigatus* ao voriconazol diminuiu a sensibilidade do seu biofilme a AMB (RAJENDRAN et al., 2015). Alterações na sensibilidade devido a pré-exposição de células fúngicas a outros compostos não antifúngicos também já foram relatadas como, por exemplo, alterações na sensibilidade de biofilmes de *Trichosporon asahii* e

Trichosporon inkin a AMB, após ciclos sucessivos de exposição ao antirretroviral ritonavir (CORDEIRO et al., 2017).

O mecanismo pelo qual o AMG pode ter reduzido a sensibilidade de *Sporothrix* spp. aos antifúngicos não está elucidado. No entanto, sabe-se que o uso prolongado de AMG está relacionado à aquisição de resistência de *Leishmania* spp. aos antimoniais pentavalentes, devido a alterações na biossíntese de ergosterol e superexpressão de genes que codificam transportadores do tipo “ATP-binding cassette” (ABC) e/ou pertencentes a “Major facilitator superfamily” (MFS) (ARONSON et al., 2016).

Esses transportadores são bombas de efluxo que aumentam a tolerância de *Leishmania* spp. a substâncias nocivas (KAUR; RAJPUT, 2014; LÉGARÉ; OUELLETTE, 2017). As bombas de efluxo ABC e MFS também são encontradas em células de fungos e, portanto, hipotetizamos que a pré-exposição das células de *Sporothrix* spp. a AMG pode ter desencadeado uma regulação positiva de genes que codificam essas bombas, levando ao aumento do efluxo de drogas antifúngicas, como o itraconazol (PRASAD; RAWAL, 2014), ou ainda desencadeado uma redução no teor de ergosterol na membrana plasmática fúngica, prejudicando a atividade da AMB (MARTEL et al., 2010).

Além dos mecanismos mencionados acima, outros também podem estar envolvidos com o aumento na tolerância de biofilmes de *Sporothrix* spp. aos antifúngicos Al-Fattani e Douglas (2006) mostraram que quantidades mais elevadas de matriz extracelular reduzem a penetração de azólicos e poliênicos nos biofilmes de *Candida* spp. Bizerra et al. (2008) relataram que células sésseis de *Candida* spp., com superexpressão de genes envolvidos na biossíntese de ergosterol e na atividade de bombas de efluxo, possuíam uma reduzida sensibilidade a drogas antifúngicas.

Este estudo levanta um alerta para a possibilidade de redução da resposta terapêutica à antifúngicos por pacientes com esporotricose, que foram previamente tratados para leishmaniose com MGA (MAHMOUDI; ZAINI, 2015).

O presente estudo torna-se importante para nortear e estruturar futuros estudos *in vivo* para melhor entender os processos envolvidos na ação dos leishmanicidas sobre espécies do complexo *S. schenckii* e as possíveis aplicações clínicas desses efeitos.

8 CONCLUSÃO

- Antimoniato de meglumina não possui efeito inibitório contra espécies do complexo *S. schenckii*.
- Pentamidina possui atividade antifúngica frente a células planctônicas e sésseis de espécies do complexo *S. schenckii* em ambas as suas formas, filamentosa e leveduriforme.
- Antimoniato de meglumina apresenta apenas interações tidas como indiferentes quando combina com anfotericina B, itraconazol e terbinafina frente a espécies do complexo *S. schenckii*,
- Pentamidina apresenta potencial de interação sinérgica com anfotericina B, itraconazol e terbinafina frente células planctônicas e sésseis de espécies do complexo *S. schenckii* em ambas as suas formas, filamentosa e leveduriforme.
- Antimoniato de meglumina diminui a sensibilidade de espécies de *S. schenckii* s. str. e *S. brasiliensis* à anfotericina B e itraconazol, quando essas são pré-expostas ao leishmanicida.
- Pentamidina não altera a sensibilidade de espécies do complexo *S. schenckii* aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina quando essas espécies são pré-expostas ao leishmanicida.

REFERÊNCIAS

- AFELTRA, J.; DANNAOUI, E.; MEIS, J. F. G. M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; VERWEIJ, P. E.; NETWORK, E. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 10, p. 3323–3326, 2002.
- AFELTRA, J.; VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, n. 7, p. 397–407, 2003.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 8, p. 999–1008, 2006.
- ALMEIDA-PAES, R.; BORBA-SANTOS, L. P.; ROZENTAL, S.; MARCO, S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; DA CUNHA, M. M. L. Melanin biosynthesis in pathogenic species of *Sporothrix*. **Fungal Biol. Rev.**, v. 31, n. 1, p. 50–59, 2017a.
- ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 9, p. e3094, 2014.
- ALMEIDA-PAES, R.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BRITO-SANTOS, F.; ALMEIDA-SILVA, F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2016a.
- ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the *Sporothrix* Complex. **Biomed Res. Int.**, v. 2015, p. 1–10, 2015.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M.; FREITAS, D. F.; VALLE, A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to *in vivo* resistance. **Med. Mycol.**, v. 55, n. 5, p. 507–517, 2016b.
- ALMEIDA-PAES, R.; BRITO-SANTOS, F.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; MACHADO, A. C. S.; OLIVEIRA, M. M. E.; PEREIRA, S. A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 5, p. 376–381, 2017b.
- ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genet. Biol.**, v. 78, p. 55–58, 2015.
- AMATO, V. S.; PAULA, J. G. DE; IMAMURA, R.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M. I.

S.; BOULOS, M. I. C.; BOULOS, M.; NICODEMO, A. C.; MENDONÇA, J. S. DE. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana, com lesão em mucosa, por meio do isotionato de pentamidina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29, n. 5, p. 477–481, 1996.

ANTONIO, L. DE F.; PIMENTEL, M. I. F.; LYRA, M. R.; MADEIRA, M. DE F.; MIRANDA, L. DE F. C.; ALMEIDA-PAES, R.; BRITO-SANTOS, F.; CARVALHO, M. H. G. F.; SCHUBACH, A. DE O. *Sporothrix schenckii* Lato sensu identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 87, n. 2, p. 118–120, 2017.

ARONSON, N.; HERWALDT, B. L.; LIBMAN, M.; PEARSON, R.; LOPEZ-VELEZ, R.; WEINA, P.; CARVALHO, E. M.; EPHROS, M.; JERONIMO, S.; MAGILL, A. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clin. Infect. Dis.**, v. 63, n. 12, p. e202–e264, 2016.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, n. 7, p. 651–655, 2009.

BARCHIESI, F.; POETA, M. DEL; MORBIDUCCI, V.; ANCARANI, F.; SCALISE, G. Effect of pentamidine on the growth of *Cryptococcus neoformans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 33, n. 6, p. 1229–1232, 1994.

BARILE, F.; MASTROLONARDO, M.; LOCONSOLE, F.; RANTUCCIO, F. Cutaneous sporotrichosis in the period 1978–1992 in the province of Bari, Apulia, Southern Italy. **Mycoses**, v. 36, n. 5-6, p. 181–185, 1993.

BARROS, M. B. D. L.; ALMEIDA-PAES, R. DE; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 4, p. 293–308, 2011.

BARROS, M. B. DE L.; SCHUBACH, A.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; SCHUBACH, T. M. P.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DE MATOS SALGUEIRO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; REIS, R. S.; DE FÁTIMA MADEIRA, M.; CUZZI, T.; QUINTELLA, L. P.; DA SILVA PASSOS, J. P.; CONCEIÇÃO, M. J.; DE ALMEIDA MARZOCHI, M. C. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Acta Trop.**, v. 93, n. 1, p. 41–47, 2005.

BAZZI, T.; MELO, S. M. P. DE; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D. Clinical, epidemiological, histomorphological and histochemical characteristics of the feline sporotrichosis. **Pesqui. Veterinária Bras.**, v. 36, n. 4, p. 303–311, 2016.

BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; DE POERSCH, C.; ESTIVALET SVIDZINSKI, T. I.; BORSATO QUESADA, R. M.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S. F. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, n. 3, p. 442–450, 2008.

BLANCO, M. T.; HURTADO, C.; PEREZ-GIRALDO, C.; MORAN, F. J.; GONZALEZ-VELASCO, C.; GÓMEZGARCÍA, A. C. Effect of ritonavir and saquinavir on *Candida*

albicans growth rate and in vitro activity of aspartyl proteinases. **Med. Mycol.**, v. 41, n. 2, p. 167–170, 2003.

BONIFAZ, A.; ROJAS-PADILLA, R.; TIRADO-SÁNCHEZ, A.; PONCE, R. M. Sporotrichosis: The-State-of-The-Art. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAI, M. (Eds.). **Medical Mycology - Current Trends and Future Prospects**. New York: CCR Press, 2016. p. 234–253.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. **J. Fungi**, v. 3, n. 6, p. 1–13, 2017.

BORBA-SANTOS, L. P.; REIS DE SÁ, L. F.; RAMOS, J. A.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; ROZENTAL, S.; FERREIRA-PEREIRA, A. Tacrolimus Increases the Effectiveness of Itraconazole and Fluconazole against *Sporothrix* spp. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 1759, 2017.

BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; DE CAMARGO, Z. P.; NUCCI, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.; ROZENTAL, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Med. Mycol.**, v. 53, n. 2, p. 178–188, 2015.

BORBA-SANTOS, L. P.; VISBAL, G.; GAGINI, T.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. $\Delta 24$ -Sterol Methyltransferase Plays an Important Role in the Growth and Development of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Front. Microbiol.**, v. 7, n. 311, p. 1–13, 2016.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico esporotricose 007/2016, 2016**. Disponível em: <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=9pOG0Y0K14I%3D>>. Acesso em: 22 out. 2017.

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2017.

BRILHANTE, R. S. N.; MALAQUIAS, Â. D. M.; CAETANO, É. P.; DE SOUZA COLLARES MAIA CASTELO-BRANCO, D.; DE LIMA, R. A. C.; DE FARIAS MARQUES, F. J.; SILVA, N. F.; DE ALENCAR, L. P.; MONTEIRO, A. J.; DE CAMARGO, Z. P.; DE JESUS PINHEIRO GOMES BANDEIRA, T.; RODRIGUES, A. M.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Med. Mycol.**, v. 52, n. 3, p. 320–325, 2014.

BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, E. P.; LIMA, R. A. C.; CASTELO BRANCO, D. S. C. M.; SERPA, R.; OLIVEIRA, J. S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C. In vitro antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. **J. Appl. Microbiol.**, v. 119, n. 4, p. 962–969, 2015.

BRILHANTE, R. S. N.; DE OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A. J. DE J.; PEREIRA, V.

S.; ALENCAR, L. P.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C.; CÂMARA, L. M. C.; DE LIMA-NETO, R. G.; CORDEIRO, R. DE A.; SIDRIM, J. J. C. In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Med. Mycol.**, p. doi:10.1093/mmy/myx088, 2017.

BRILHANTE, R. S. N.; AGUIAR, F. R. M.; SILVA, M. L. Q.; OLIVEIRA, J. S.; CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, V. S.; SERPA, R.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C.; CORREIA, E. E. M.; PEREIRA-NETO, W. A.; CORDEIRO, R. DE A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. **Med. Mycol.**, v. 56, n. 3, p. 297–306, 2018.

BUGLI, F.; POSTERARO, B.; PAPI, M.; TORELLI, R.; MAIORANA, A.; STERBINI, F. P.; POSTERARO, P.; SANGUINETTI, M.; DE SPIRITO, M. *In vitro* interaction between alginate lyase and amphotericin B against *Aspergillus fumigatus* biofilm determined by different methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 3, p. 1275–1282, 2013.

CAPOOR, M. R.; RAMESH, V.; KHANNA, G.; SINGH, A.; AGGARWAL, P. Sporotrichosis in Delhi among the migrant population from Uttarakhand, India. **Trop. Doct.**, v. 41, n. 1, p. 46–48, 2011.

CARLOS, I. Z. **Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects**. New York: Springer, 2015.

CARRADA-BRAVO, T.; OLVERA-MACÍAS, M. I. New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Rev. Latinoam. Patol. Clínica**, v. 60, n. 1, p. 5–24, 2013.

CARVALHO, L. M. V. DE; PIMENTEL, M. I. F.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; VALETE-ROSALINO, C. M.; LYRA, M. R.; SALGUEIRO, M. DE M.; SAHEKI, M. N.; MADEIRA, M. DE F.; MOUTA-CONFORT, E.; ANTONIO, L. DE F. Sporotrichoid leishmaniasis: a cross-sectional clinical, epidemiological and laboratory study in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 59, n. e53, p. 1–6, 2017.

CASTREJÓN, O. V.; ROBLES, M.; ARROYO, O. E. Fatal fungaemia due to *Sporothrix schenckii*. **Mycoses**, v. 38, n. 9-10, p. 373–376, 1995.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Med. Mycol.**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.

CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P.; KAUFFMANN, C.; SMITH, E. B.; DIETZE, R.; TIRABOSCHI-FOSS, N.; RESTREPO, A.; BUSTAMANTE, A. B.; OPPER, C.; EMADY-AZAR, S. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day⁻¹) in the treatment of cutaneous or lymphocutaneous sporotrichosis. **Mycoses**, v. 47, n. 1-2, p. 62–68, 2004.

CHOU, T.-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacol. Rev.**, v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006.

CLEMENT, B.; KOTTHAUS, J.; KOTTHAUS, J.; SCHADE, D. **US9662308B2 - Orally bioavailable pentamidine prodrugs for the treatment of diseases** Google Patents, , 2017.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition**. CLSI document M27A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2008a.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi ; Approved Standard - Second Edition**. CLSI document M38A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.

CORDEIRO, R. DE A.; MARQUES, F. J. DE F.; BRILHANTE, R. S. N.; E SILVA, K. R. DE C.; MOURÃO, C. I.; CAETANO, É. P.; FECHINE, M. A. B.; RIBEIRO, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; DE LIMA, R. A. C. Synergistic effect of antituberculosis drugs and azoles in vitro against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 9, p. 4482–4484, 2011.

CORDEIRO, R. DE A.; MARQUES, F. J. DE F.; CORDEIRO, R. DE A.; DA SILVA, M. R.; MALAQUIAS, A. D. M.; DE MELO, C. V. S.; MAFEZOLI, J.; DE OLIVEIRA, M. DA C. F.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Synthesis and antifungal activity in vitro of isoniazid derivatives against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 5, p. 2504–2511, 2014.

CORDEIRO, R. DE A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; CAMARGO, Z. P. DE; SIDRIM, J. J. C. In vitro inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, n. 3, p. 575–579, 2006.

CORDEIRO, R. DE A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; MEDRANO, D. J. A.; MONTEIRO, A. J.; TAVARES, J. L.; DE LIMA, R. A. C.; DE CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. In vitro synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 34, n. 3, p. 278–280, 2009.

CORDEIRO, R. DE A.; SERPA, R.; MENDES, P. B. L.; EVANGELISTA, A. J. DE J.; ANDRADE, A. R. C.; FRANCO, J. DA S.; PEREIRA, V. D. S.; ALENCAR, L. P. DE; OLIVEIRA, J. S. DE; CAMARGO, Z. P. DE; LIMA NETO, R. G. DE; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling**, v. 33, n. 8, p. 640–650, 2017.

COSTA, R. O.; MACEDO, P. M. DE; CARVALHAL, A.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. **An. Bras. Dermatol.**, v. 88, n. 3, p. 396–402, 2013.

CREEMERS-SCHILD, D.; KROON, F. P.; KUIJPER, E. J.; BOER, M. G. J. Treatment of Pneumocystis. **Infection**, v. 44, n. 3, p. 291–299, 2016.

CROMMENTUYN, K. M. L.; MULDER, J. W.; SPARIDANS, R. W.; HUITEMA, A. D. R.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. Drug-drug interaction between itraconazole and the

antiretroviral drug lopinavir/ritonavir in an HIV-1-infected patient with disseminated histoplasmosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 8, p. e73–e75, 2004.

CRUZ, L. C. H. DA. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootec.**, v. 20, p. 8–28, 2013.

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

DE BEURMANN, L.; GOUGEROT, H.; VAUCHER, A. B. Sporotrichose expérimentale du chat. **Comptes Rendus Des Seances La Soc. Biol.**, v. 66, n. 1, p. 370–372, 1909.

DEVI, K. R.; DEVI, M. U.; SINGH, T. N.; DEVI, K. S.; SHARMA, S. S.; SINGH, L. R.; SINGH, H. L.; SINGH, N. B. Emergence of sporotrichosis in Manipur. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 24, n. 3, p. 216, 2006.

DIMIER-DAVID, L.; VALDA, L.; INOFUENTES, A.; MALLEA, F.; DAVID, C.; DEDET, J. P. Traitement de la lésion cutanée primaire de la leishmaniose à *Leishmania braziliensis*: échec de l'iséthionate de pentamidine. **Médecine Mal. Infect.**, v. 22, n. 12, p. 1183–1186, 1992.

DONKOR, I. O.; CLARK, A. M. In vitro antimicrobial activity of aromatic diamidines and diimidazolines related to pentamidine. **Eur.J.Med.Chem.**, v. 34, n. 7–8, p. 639–643, 1999.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DOUGLAS, L. J. Candida biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 1, p. 30–6, 2003.

DUQUE, M. C. DE O.; VASCONCELLOS, É. DE C. F.; PIMENTEL, M. I. F.; LYRA, M. R.; PACHECO, S. J. B.; MARZOCHI, M. C. DE A.; ROSALINO, C. M. V.; SCHUBACH, A. DE O. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 49, n. 6, p. 774–776, 2016.

DZAMITIKA, S. A.; FALCAO, C. A. B.; DE OLIVEIRA, F. B.; MARBEUF, C.; GARNIER-SUILLEROT, A.; DEMICHELI, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; FRÉZARD, F. Role of residual Sb (III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, n. 3, p. 217–224, 2006.

ESPINEL-INGROFF, A.; ABREU, D. P. B.; ALMEIDA-PAES, R.; BRILHANTE, R. S. N.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; HAGEN, F.; CÓRDOBA, S.; GONZALEZ, G. M.; GOVENDER, N. P. Multicenter and international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values (ECVs) for species of *Sporothrix* identified by molecular methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 10, p. e01057-17, 2017.

ESPINOSA-TEXIS, A.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F.; LAVALLE, P.; BARBA-

RUBIO, J.; LOPEZ-MARTINEZ, R. Study of 50 patients with sporotrichosis. Clinical and laboratory assessment. **Gac. Med. Mex.**, v. 137, n. 2, p. 111–116, 2001.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FEENEY, K. T.; ARTHUR, I. H.; WHITTLE, A. J.; ALTMAN, S. A.; SPEERS, D. J. Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 8, p. 1228, 2007.

FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; AMARAL, C. C.; SASAKI, A. A.; GODOY-MARTINEZ, P.; CAMARGO, ZP. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: a forgotten and re-emergent pathogen. **Open Mycol. J.**, v. 3, n. 1, p. 48–58, 2009a.

FERNANDES, G. F.; DO AMARAL, C. C.; SASAKI, A.; MARTINEZ GODOY, P.; DE CAMARGO, Z. P. Heterogeneity of proteins expressed by Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates. **Med. Mycol.**, v. 47, n. 8, p. 855–861, 2009b.

FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; RODRIGUES, A. M.; SASAKI, A. A.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241–249, 2013.

FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix — involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 83, n. 2, p. 165–169, 2015.

FRANCESCONI, G.; VALLE, A. C.; PASSOS, S.; REIS, R.; GALHARDO, M. C. Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. **J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.**, v. 23, n. 11, p. 1273–1276, 2009.

FRANCESCONI, G.; FRANCESCONI DO VALLE, A. C.; PASSOS, S. L.; DE LIMA BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; CURI, A. L. L.; LIPORAGE, J.; PORTO, C. F.; GALHARDO, M. C. G. Comparative Study of 250 mg/day Terbinafine and 100 mg/day Itraconazole for the Treatment of Cutaneous Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 349–354, 2011.

FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F.; DA SILVA, M. B. T.; CAMPOS, D. P.; LYRA, M. R.; DE SOUZA, R. V.; VELOSO, V. G.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; BASTOS, F. I.; GALHARDO, M. C. G. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 8, p. e3110, 2014.

FREITAS, D. F. S.; LIMA, M. A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; LAMAS, C. C.; DO VALLE, A. C. F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Sporotrichosis in the Central Nervous System Caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 61, n. 4, p. 663–664, 2015.

FREITAS, D. F. S.; DE SIQUEIRA HOAGLAND, B.; DO VALLE, A. C. F.; FRAGA, B. B.;

DE BARROS, M. B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; CUZZI, T.; ROSALINO, C. M. V.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Sabouraudia**, v. 50, n. 2, p. 170–178, 2012.

FREITAS, D.; MIGLIANO, M.; ZANI NETO, L. Esporotricose: Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). **Rev. da Fac. Med. Veterinária e Zootec. da Univ. São Paulo**, v. 5, n. 4, p. 601–604, 1956.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C. S.; COSTA, M. A. P. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 3, p. 913–916, 2001.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

GAO, L.; SUN, Y. In vitro interactions of antifungal agents and tacrolimus against *Aspergillus biofilms*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 11, p. 7097–7099, 2015.

GEZUELE, E.; DA ROSA, D. Importance of the sporotrichosis asteroid body for the rapid diagnosis of sporotrichosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, n. 3, p. 147–150, 2005.

GOA, K. L.; CAMPOLI-RICHARDS, D. M. Pentamidine Isethionate: A Review of its Antiprotozoal Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in *Pneumocystis carinii* Pneumonia. **Drugs**, v. 33, n. 3, p. 242–258, 1987.

GOODWIN, L. G.; PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem. J.**, v. 37, n. 2, p. 198, 1943.

GOVENDER, N. P.; MAPHANGA, T. G.; ZULU, T. G.; PATEL, J.; WALAZA, S.; JACOBS, C.; EBONWU, J. I.; NTULI, S.; NAICKER, S. D.; THOMAS, J. An outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis among mine-workers in South Africa. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 9, p. e0004096, 2015.

GRAY, K. C.; PALACIOS, D. S.; DAILEY, I.; ENDO, M. M.; UNO, B. E.; WILCOCK, B. C.; BURKE, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, n. 7, p. 2234–2239, 2012.

GREMIÃO, I. D. F.; MIRANDA, L. H. M.; REIS, E. G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.

GUERRA, J. A. DE O.; TALHARI, S.; PAES, M. G.; GARRIDO, M.; TALHARI, J. M. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, p. 587–590, 2003.

GUMAA, S. A. Sporotrichosis in Sudan. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 6, p. 637–640, 1978.

GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G. **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. London: Springer, 2013.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MONZÓN, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal susceptibility profile in vitro of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: Microdilution and E-test: Original article. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 227–231, 2010.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F.; ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Epidemiological Aspects of Sporotrichosis Epidemic in Brazil. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 9, n. 4, p. 238–245, 2015.

HALDAR, N.; SHARMA, M. K.; GUGNANI, H. C. Sporotrichosis in north-east India. **Mycoses**, v. 50, n. 3, p. 201–204, 2007.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **J. Exp. Med.**, v. 5, n. 1, p. 77, 1900.

HELM, M.; BERMAN, C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. **Proc. Transvaal Mine Med. Off. Assoc. Sporotrichosis Infect. mines Witwatersrand**, p. 59–67, 1947.

HIROTA, K.; YUMOTO, H.; SAPAAR, B.; MATSUO, T.; ICHIKAWA, T.; MIYAKE, Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. **J. Appl. Microbiol.**, v. 122, p. 321–330, 2016.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 272–275, 2017.

HOU, B.; LIU, X.; ZHENG, F.; XU, X.; ZHANG, Z. Molecular cloning, modeling and differential expression of a gene encoding a silent information regulator-like protein from *Sporothrix schenckii*. **Int. J. Mol. Med.**, v. 33, n. 6, p. 1415–1422, 2014.

HU, S.; CHUNG, W.-H.; HUNG, S.-I.; HO, H.-C.; WANG, Z.-W.; CHEN, C.-H.; LU, S.-C.; KUO, T.; HONG, H.-S. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1414–1418, 2003.

HULL, P. R.; VISMER, H. P. Treatment of cutaneous sporotrichosis with terbinafine. **J. Dermatolog. Treat.**, v. 3, n. sup1, p. 35–38, 1992.

IYALLA, C. A review of the virulence factors of pathogenic fungi. **African J. Clin. Exp. Microbiol.**, v. 18, n. 1, p. 53–58, 2017.

JOHNSON, E. M.; CAVLING-ARENDRUP, M. Susceptibility test methods: yeasts and filamentous fungi. In: **Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition**. New York: American Society of Microbiology, 2015. p. 2255–2281.

JORNAL DA PARAÍBA. **Doença provocada por fungo vem atingindo gatos, na Paraíba**,

e prode prejudicar humanos. Disponível em: <<http://g1.globo.com/pb/paraiba/jpb-leducacao/videos/v/doenca-provocada-por-fungo-vem-atingindo-gatos-na-paraiba-e-prode-prejudicar-humanos/5815227/>>. Acesso em: 22 out. 2017.

KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. **Mycoses**, v. 44, n. 7-8, p. 261–265, 2001.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. **J. Parasitol. Res.**, v. 2014, n. 726328, p. 1–11, 2014.

KOVÁCS, R.; BOZÓ, A.; GESZTELYI, R.; DOMÁN, M.; KARDOS, G.; NAGY, F.; TÓTH, Z.; MAJOROS, L. Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 47, n. 4, p. 304–310, 2016.

KRAUSE, R.; MOISSEL-EICHINGER, C.; HALWACHS, B.; GORKIEWICZ, G.; BERG, G.; VALENTIN, T.; PRATTES, J.; HÖGENAUER, C.; ZOLLNER-SCHWETZ, I. Mycobioome in the Lower Respiratory Tract – A Clinical Perspective. **Front. Microbiol.**, v. 7, n. 2169, p. 1–9, 2016.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; SINGH, S. Advanced acuity in microbial biofilm genesis, development, associated clinical infections and control. **J. des Anti-infectieux**, v. 19, n. 1, p. 20–31, 2017.

LAI, W.-H.; LU, S.-Y.; ENG, H.-L. Levamisole aids in treatment of refractory oral candidiasis in two patients with thymoma associated with myasthenia gravis: report of two cases. **Chang Gung Med. J.**, v. 25, n. 9, p. 606–611, 2002.

LEDERER, H. T.; SULLIVAN, E.; CRUM-CIANFLONE, N. F. Sporotrichosis as an unusual case of osteomyelitis: A case report and review of the literature. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 11, p. 31–35, 2016.

LÉGARÉ, D.; OUELLETTE, M. Drug Resistance in *Leishmania*. In: MATLASHEWSKI, G. et al. (Eds.). **Handbook of Antimicrobial Resistance**. New York: Springer, 2017.

LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; MORANDI, V.; BEZERRA, L. M. L. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6874–6880, 2001.

LÓPEZ-ROMERO, E.; DEL ROCÍO REYES-MONTES, M.; PÉREZ-TORRES, A.; RUIZ-BACA, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; MORA-MONTES, H. M.; FLORES-CARREÓN, A.; TORIELLO, C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiol.**, v. 6, n. 1, p. 85–102, 2011.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos (Contribuição para o conhecimento das assim chamadas sporotricoses). **Rev. Médica São Paulo**, v. 10, p.

443–450, 1907.

MACEDO, P. M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; OROFINO-COSTA, R. New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients. **J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.**, v. 29, n. 4, p. 719–724, 2015.

MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; GUIM, T. N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. DE O.; ARAÚJO MEIRELES, M. C. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 2, p. 162–165, 2010.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatol. Res. Pract.**, v. 1, n. 272376, p. 1–13, 2014.

MAHMOUDI, S.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P.; SAFARA, M.; HEIDARI, M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. **Med. Mycol.**, v. 54, n. 6, p. 593–599, 2016.

MAHMOUDI, S.; ZAINI, F. Sporotrichosis in Iran: A mini review of reported cases in patients suspected to cutaneous leishmaniasis. **Curr. Med. Mycol.**, v. 1, n. 2, p. 39, 2015.

MANSON-BAHR, P. E. C. 1959. East African kala-azar with special reference to the pathology, prophylaxis and treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 2, p. 123IN1127-126IN2136, 1959.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Comparison of the antifungal activity of micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, n. 9, p. 2498–2501, 2016.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M. D. S.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, 2006.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 2, p. 732–734, 2008.

MARIO, D. A. N.; SANTOS, R. C. V.; DENARDI, L. B.; VAUCHER, R. DE A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 33, n. 1, p. 21–25, 2016.

MARQUES-MELO, E. H.; LESSA, D. F. DA S.; GARRIDO, L. H. A.; NUNES, A. C. B. T.; CHAVES, K. P.; PORTO, W. J. N.; NOTOMI, M. Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano - relato do primeiro caso no estado de alagoas. **Rev. Baiana**

Saúde Pública, v. 38, n. 2, p. 490–498, 2014.

MARTEL, C. M.; PARKER, J. E.; BADER, O.; WEIG, M.; GROSS, U.; WARRILOW, A. G. S.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14 α -demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 9, p. 3578–3583, 2010.

MASMOUDI, A.; HARIZ, W.; MARREKCHI, S.; AMOURI, M.; TURKI, H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **J. Dermatol. Case Rep.**, v. 7, n. 2, p. 31, 2013.

MELLO, C. X. DE; SCHUBACH, A. DE O.; MADEIRA, M. DE F. Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 1, p. 127, 2011.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 9, p. e1005828, 2016.

MORA-MONTES, H. M.; DANTAS, A. DA S.; TRUJILLO-ESQUIVEL, E.; DE SOUZA BAPTISTA, A. R.; LOPES-BEZERRA, L. M. Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. **FEMS Yeast Res.**, v. 15, n. 6, 2015.

MOREIRA, V. R.; DE JESUS, L. C. L.; SOARES, R.-E. P.; SILVA, L. D. M.; PINTO, B. A. S.; MELO, M. N.; DE ANDRADE PAES, A. M.; PEREIRA, S. R. F. Meglumine antimoniate (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 6, p. e02360-16, 2017.

MURDOCH, J. K.; KEYSTONE, J. S. Two forms of pentamidine. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 128, n. 5, p. 508, 1983.

NEWLOVE, T.; GUIMARÃES, L. H.; MORGAN, D. J.; ALCÂNTARA, L.; GLESBY, M. J.; CARVALHO, E. M.; MACHADO, P. R. Antihelminthic therapy and antimony in cutaneous leishmaniasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients co-infected with helminths and *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 4, p. 551–555, 2011.

NIERENBERG, N. E.; THOMPSON III, G. R.; LEWIS, J. S.; HOGAN, B. K.; PATTERSON, T. F. Voriconazole use and pharmacokinetics in combination with interferon- γ for refractory cryptococcal meningitis in a patient receiving low-dose ritonavir. **Med. Mycol.**, v. 48, n. 3, p. 532–536, 2010.

NUNES, G. D. L.; DOS SANTOS CARNEIRO, R.; FILGUEIRA, K. D.; FILGUEIRA, F. G. F.; FERNANDES, T. H. T. Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. **Arq. Ciências Veterinárias e Zool. da UNIPAR**, v. 14, n. 2, 2013.

O'SHAUGHNESSY, E. M.; MELETIADIS, J.; STERGIOPOULOU, T.; P. DEMCHOK, J.; WALSH, T. J. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, n. 6, p. 1168–1176, 2006.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 31, n. 1, p. 2–6, 2014.

OLIVEIRA, M. M. E.; FRANCO-DUARTE, R.; ROMEO, O.; PAIS, C.; CRISEO, G.; SAMPAIO, P.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. ARIA. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 362, n. 6, p. 1–7, 2015.

OYARCE, J. A.; GARCÍA, C.; ALAVE, J.; BUSTAMANTE, B. Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer nivel en Lima-Perú, entre los años 1991 y 2014. **Rev. Chil. infectología**, v. 33, n. 3, p. 315–321, 2016.

PAIXÃO, A. G.; GALHARDO, M. C. G.; ALMEIDA-PAES, R.; NUNES, E. P.; GONÇALVES, M. L. C.; CHEQUER, G. L.; LAMAS, C. DA C. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. **AIDS Res. Ther.**, v. 12, p. 16, 2015.

PAULA, C. D. R. DE; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop**, p. 365–371, 2003.

PHARMACEUTICALS, A. **PENTAM 300 - pentamidine isethionate injection, powder, lyophilized, for solution.** Disponível em:

<<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=cc2b635e-4840-4dc3-a177-5484371680e8>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING, N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F. Global distribution maps of the leishmaniasis. **Elife**, v. 3, p. e02851, 2014.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Front. Pharmacol.**, v. 5, n. 202, p. 1–13, 2014.

QUINTELLA, L. P.; LAMBERT PASSOS, S. R.; FRANCESCONI DO VALE, A. C.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C.; DE LIMA BARROS, M. B.; CUZZI, T.; DOS SANTOS REIS, R.; FIGUEIREDO DE CARVALHO, M. H. G.; ZAPPA, M. B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **J. Cutan. Pathol.**, v. 38, n. 1, p. 25–32, 2011.

RAJENDRAN, R.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; RAMAGE, G. Prior in vitro exposure to voriconazole confers resistance to amphotericin B in *Aspergillus fumigatus* biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 46, n. 3, p. 342–345, 2015.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, n. 7, p. 979–86, 2006.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RAMOS, A. C. M. O.; DE MEDEIROS OLIVEIRA, I. V. P.; REIS-LIMA, R. K.; DE PAULA, V. V.; FILGUEIRA, K. D. Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. **Acta Vet. Bras.**, v. 11, n. 1, p. 79–84, 2017.

REIS-GOMES, A.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B.; TELLES, A. J.; WALLER, S. B.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta Vet. Bras.**, v. 6, n. 4, p. 272–284, 2012.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, n. 8, p. 982–989, 2002.

RIPPON, J. W. **Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3^a ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1988.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 5, p. 1076–1082, 1998.

ROCHA, M. F. G.; ALENCAR, L. P.; PAIVA, M. A. N.; MELO, L. M.; BANDEIRA, S. P.; PONTE, Y. B.; SALES, J. A.; GUEDES, G. M. M.; CASTELO-BRANCO, D.; BANDEIRA, T. J. Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school? **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 281–290, 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z. P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerg. Microbes Infect.**, v. 3, n. 5, p. e32, 2014a.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CÁSSIA PIRES, D.; BRIHANTE, R. S. N.; DA COSTA SIDRIM, J. J.; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L.; DE CAMARGO, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, n. 1, p. 219, 2014b.

RODRIGUES, A. M.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H.; FERNANDES, G. F.; DE ALMEIDA, S. R.; LOPES-BEZERRA, L. M.; DE CAMARGO, Z. P. Two-dimensional gel

electrophoresis data for proteomic profiling of *Sporothrix* yeast cells. **Data Br.**, v. 2, p. 32–38, 2015a.

RODRIGUES, A. M.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H.; FERNANDES, G. F.; DE ALMEIDA, S. R.; LOPES-BEZERRA, L. M.; DE CAMARGO, Z. P. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **J. Proteomics**, v. 115, p. 8–22, 2015b.

RODRIGUES, A. M.; CHOAPPA, R. C.; FERNANDES, G. F.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biol.**, v. 120, n. 2, p. 246–264, 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 7, p. e1005638, 2016.

RUDRAMURTHY, S. M.; CHAKRABARTI, A. Sporotrichosis: Update on Diagnostic Techniques. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 11, p. 134–140, 2017.

RUIZ-BACA, E.; TORIELLO, C.; PÉREZ-TORRES, A.; SABANERO-LÓPEZ, M.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; LÓPEZ-ROMERO, E. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Med. Mycol.**, v. 47, n. 2, p. 185–196, 2009.

SÁNCHEZ-HERRERA, R.; FLORES-VILLAVICENCIO, L. L.; PADILLA-GUERRERO, I.; BARBOSA-SABANERO, G.; SABANERO-LÓPEZ, M. Formación de biopelículas en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii*: desarrollo, arquitectura y características bioquímicas. **Acta Univ.**, v. 24, n. 2, p. 11–15, 2014.

SANCHOTENE, K. O.; BRANDOLT, T. M.; KLAFKE, G. B.; POESTER, V. R.; XAVIER, M. O. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: Comparison of yeast and mycelial phases. **Med. Mycol.**, p. 1–8, 2017.

SANDAI, D.; TABANA, Y. M.; EL OUWEINI, A.; AYODEJI, I. O. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system. **Jundishapur J. Microbiol.**, v. 9, n. 11, p. e37385, 2016.

SANDOVAL-BERNAL, G.; BARBOSA-SABANERO, G.; SHIBAYAMA, M.; PEREZ-TORRES, A.; TSUTSUMI, V.; SABANERO, M. Cell wall glycoproteins participate in the adhesion of *Sporothrix schenckii* to epithelial cells. **Mycopathologia**, v. 171, n. 4, p. 251–259, 2011.

SCHENK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. **John Hopkins Hosp.**, v. 9, p. 286–290, 1898.

SCORDINO, F.; PERNICE, I.; PASSO, C. LO; GALBO, R.; MEDICI, M. A.; CRISEO, G.; ROMEO, O. Antifungal susceptibilities of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Italy. **J. Biol. Res.**, v. 88, n. 1, p. 139–140, 2015.

SEKAR, V. J.; LEFEBVRE, E.; DE PAUW, M.; VANGENEUGDEN, T.; HOETELMANS, R. M. Pharmacokinetics of darunavir/ritonavir and ketoconazole following co-administration in HIV–healthy volunteers. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 66, n. 2, p. 215–221, 2008.

SHINOGI, T.; MISAGO, N.; NARISAWA, Y. Cutaneous sporotrichosis with refractory and reinfectious lesions in a healthy female. **J. Dermatol.**, v. 31, n. 6, p. 492–496, 2004.

SIL, A.; ANDRIANOPOULOS, A. Thermally dimorphic human fungal pathogens — Polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 5, n. 8, p. a019794, 2015.

SILVA, M. L. Q. **Efeito inibitório, in vitro, do iodeto de potássio e da miltefosina frente a cepas do complexo *Sporothrix schenckii* em biofilme nas formas filamentosa e leveduriforme.** Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2017.

SIMITSOPOULOU, M.; CHATZIMOSCHOU, A.; ROILIDES, E. Biofilms and Antifungal Susceptibility Testing. In: ***Candida Species: Methods and Protocols***. New York: Springer, 2016. p. 183–197.

SMITH, M. T.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W. H. Ultrastructure of septa in *Blastobotrys* and *Sporothrix*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 51, n. 1, p. 121–128, 1985.

SONG, Y.; LI, S.; ZHONG, S.; LIU, Y.; YAO, L.; HUO, S. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.**, v. 27, n. 3, p. 313–318, 2013.

SOTO, J.; PAZ, D.; RIVERO, D.; SOTO, P.; QUISPE, J.; TOLEDO, J.; BERMAN, J. Intralesional pentamidine: A novel therapy for single lesions of Bolivian cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 4, p. 852–856, 2016.

SOTO, S. M. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. **Adv. Biol.**, v. 2014, n. 543974, p. 1–13, 2014.

ST-GERMAIN, G. Effects of pentamidine alone and in combination with ketoconazole or itraconazole on the growth of *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, n. 12, p. 2304–2306, 1990.

STYLIANOU, M.; KULESSKIY, E.; LOPES, J. P.; GRANLUND, M.; WENNERBERG, K.; URBAN, C. F. Antifungal application of nonantifungal drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 2, p. 1055–1062, 2014.

TAKENAKA, M.; YOSHIZAKI, A.; UTANI, A.; NISHIMOTO, K. A survey of 165 sporotrichosis cases examined in Nagasaki prefecture from 1951 to 2012. **Mycoses**, v. 57, n. 5, p. 294–298, 2014.

TANG, M. M.; TANG, J. J.; GILL, P.; CHANG, C. C.; BABA, R. Cutaneous sporotrichosis: a six-year review of 19 cases in a tertiary referral center in Malaysia. **Int. J. Dermatol.**, v. 51, n. 6, p. 702–708, 2012.

TEIXEIRA, M. M.; DE ALMEIDA, L. G. P.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P.; ALVES, F. L.; KIOSHIMA, É. S.; ABADIO, A. K. R.; FERNANDES, L.; DERENGOWSKI, L. S.; FERREIRA, K. S.; SOUZA, R. C. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 943, 2014.

TÉLLEZ, M. D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS, I. Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: Environment and fungal pathogenicity. **Microbiol. (United Kingdom)**, v. 160, n. 2014, p. 2352–2365, 2014.

TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. Candida biofilms and the host: models and new concepts for eradication. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 845352, 2012.

TRAVASSOS, L. R.; LLOYD, K. O. *Sporothrix schenckii* and related species of Ceratocystis. **Microbiol. Rev.**, v. 44, n. 4, p. 683, 1980.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; DOS SANTOS LAZÉRA, M.; WANKE, B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA PAES, R.; INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 9, p. 3952–3954, 2005.

VALENTÍN, A.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; FERNANDEZ-RIVERO, M. E.; TORMOMAS, M. A.; MARTÍNEZ, J. P. In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, n. 17, p. 3449–3452, 2016.

VALLE-AVILES, L.; VALENTIN-BERRIOS, S.; GONZALEZ-MENDEZ, R. R.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Functional, genetic and bioinformatic characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*. **BMC Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 107, 2007.

VENTIN, M.; RAMÍREZ, C.; RIBERA, M.; FERRANDIZ, C.; SAVALL, R.; PEYRI, J. A significant geographical area for the study of the epidemiological and ecological aspect of Mediterranean sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 99, n. 1, p. 41–43, 1987.

VENTURINI, T. P.; ROSSATO, L.; CHASSOT, F.; KELLER, J. T.; PIASENTIN, F. B.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. In vitro synergistic combinations of pentamidine, polymyxin B, tigecycline and tobramycin with antifungal agents against *Fusarium* spp. **J. Med. Microbiol.**, v. 65, n. 8, p. 770–774, 2016.

VETTORATO, R.; HEIDRICH, D.; FRAGA, F.; RIBEIRO, A. C.; PAGANI, D. M.; TIMOTHEO, C.; AMARO, T. G.; VETTORATO, G.; SCROFERNEKER, M. L. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* *sensu stricto* with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed in vitro and in vivo: Case report. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 19, p. 18–20, 2018.

VEXENAT, A. DE C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177–

185, 1996.

VILA, T.; ISHIDA, K.; SEABRA, S. H.; ROZENTAL, S. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-*albicans Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 48, n. 5, p. 512–520, 2016.

VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. In: **Fungal Pathogenicity**. London: InTech, 2016.

VISMER, H. F.; HULL, P. R. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 137–143, 1997.

WATERS, V.; RATJEN, F. Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis. **Cochrane Libr.**, 2017.

WERBOVETZ, K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. **Curr. Opin. Investig. drugs (London, Engl. 2000)**, v. 7, n. 2, p. 147–157, 2006.

YIN, N.; MA, W.; PEI, J.; OUYANG, Q.; TANG, C.; LAI, L. Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93960, 2014.

ZHANG, Y.-Q.; XU, X.-G.; ZHANG, M.; JIANG, P.; ZHOU, X.-Y.; LI, Z.-Z.; ZHANG, M.-F. Sporotrichosis: clinical and histopathological manifestations. **Am. J. Dermatopathol.**, v. 33, n. 3, p. 296–302, 2011.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A. M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L.; CHEN, M.; DENG, S. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi**, v. 35, p. 1–20, 2015.

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

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **J. Bacteriol.**, v. 46, n. 1, p. 39, 1943.

ZOBELL, C. E.; ALLEN, E. C. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. **J. Bacteriol.**, v. 29, n. 3, p. 239, 1935.