



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM - FFOE
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM
CURSO DE ENFERMAGEM

RAISSA GEOVANNA PEREIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PENTAMIDINA FRENTE A
CEPAS DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii* NA FORMA LEVEDURIFORME**

FORTALEZA

2019

RAISSA GEOVANNA PEREIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PENTAMIDINA FRENTE A
CEPAS DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii* NA FORMA LEVEDURIFORME**

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Enfermagem da Universidade Federal do Ceará em 26 de junho de 2019, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Orientador(a): Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

FORTALEZA

2019

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)

- P495a Pereira Lopes, Raissa Geovanna.
Avaliação da atividade antifúngica de pentamidina frente a cepas do complexo *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme / Raissa Geovanna Pereira Lopes. – 2019.
37 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Enfermagem, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.
1. Esporotricose. 2. Pentamidina. 3. Sensibilidade. I. Título.

CDD 610.73

RAISSA GEOVANNA PEREIRA LOPES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PENTAMIDINA FRENTE A CEPAS
DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii* NA FORMA LEVEDURIFORME

Monografia apresentada à Coordenação do curso de
Enfermagem da Universidade Federal do Ceará em
26 de junho de 2019, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Aprovada em: 26/06/2019

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Maira Di Ciero Miranda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ms^ª. Odaleia de Oliveira Farias
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus. Aos meus pais, Zilda e Lopes. A minha
irmã, Elisa Rafaella.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por conduzir-me nessa jornada árdua e, ao mesmo tempo, gratificante. Foram muitos obstáculos durante esse percurso, mas Ele sempre me ajudou a superá-los, apesar de, às vezes, parecer não ter solução. Depois das tribulações, vinha a calma que renova minhas forças, ajudando a persistir nessa caminhada.

Ao meus pais, Zildanir e Lopes, pelos seus esforços no labor, com intuito de proporcionar uma educação de qualidade, também sou grata pelos princípios ensinados, por seus gestos de amor e carinho, pelo apoio nas minhas decisões. Eles suportaram várias noites em claro esperando-me terminar os trabalhos ou estudar para as provas, na finalidade de fazer companhia.

A minha irmã e amiga, Elisa Rafaella, à qual tenho profunda admiração e respeito, pois ela vai atrás do que almeja, é decidida, esforçada, amável e paciente. Além disso, vivenciou as bonanças e os momentos difíceis, aconselhando e amparando quando era preciso.

Aos meus avós maternos, Eudócia e Zélio, pelo zelo que tiveram comigo.

A minha vó paterna, Maria do Socorro, que antes de falecer falou-me que eu iria alcançar meus sonhos.

Ao meu grupo, Beatriz Queiroz, Thaysa Grasiely, Indyara Neri por tantas noites sem dormir, revisando e arguindo umas às outras, pelos aconselhamentos, viagens aos congressos e os passeios e por tornarem esses 5 anos mais divertidos. Em especial à Juliana Maciel, que foi minha dupla no estágio, nas apresentações e na iniciação científica, que em vários momentos me ofereceu suporte à outra para continuar e não deixar se abalar diante das dificuldades que nos eram impostas. Esses desafios contribuíram no fortalecimento tanto pessoal como profissional.

À Professora, Dr^a. Sâmia Brilhante, minha orientadora, pelos ensinamentos, oportunidade e receptividade durante esse período em que estive no laboratório.

À Dr^a. Gláucia Morgana de Melo Guedes, que se mostrou disposta a ajudar, compartilhando seus conhecimentos e dando conselhos.

À Prof^a. Dr^a. Maira Di Ciero Miranda e a Ms^a Odaleia de Oliveira Farias, por ter aceitado participar da banca.

Aos professores, Dr^o. José Júlio Costa Sidrim, Dr^a. Rossana de Aguiar, Cordeiro e Dr^o. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pelos seus esforços e dedicação na construção do ensino-pesquisa que é o Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM).

Aos colegas, Terezinha, Raquel, Livia, Fernando, Lucilene, Felipe, Vand, Xhaulla, Gessica, Lara, Anderson, Jonathas, Jaiane, aos que já passaram pelo laboratório, Jaime, Edmilson, Tony, Kleybson, Jamile e aos funcionários que constituem o CEMM, pela convivência e pelos ensinamentos durante esses 3 anos.

Aos docentes e demais funcionários do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, pelo conhecimento que foi repassado durante a graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

“As palavras de amizade e conforto
podem ser curtas e sucintas, mas o
seu eco é infindável”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A esporotricose é 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 o diagnóstico errôneo pode levar pacientes com esporotricose a tratamentos equivocados com drogas leishmanicidas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica do leishmanicida pentamidina (PNT) frente células planctônicas de espécies *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme. Foram utilizadas 19 cepas de *Sporothrix* spp. (10 *S. brasiliensis*, 02 *S. globosa*, 04 *S. mexicana* e 03 *S. schenckii sensu stricto*). Os testes de sensibilidade foram realizados em microplacas de 96 poços, com base no documento *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3*, com algumas adaptações. Para os ensaios com a forma planctônica, os inóculos foram preparados em solução salina e em seguida ajustados para uma concentração final de $0,5-2,5 \times 10^3$ ufc/ml. Posteriormente, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 96 h. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de PNT foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50%, 80% e 100% de crescimento, para os antifúngicos a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% anfotericina B (AMB) e itraconazol (ITC) ou 80% terbinafina (TRB) do crescimento fúngico em comparação com o crescimento do controle sem droga. A droga PNT apresentou atividade antifúngica, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,06 a 0,25 µg/ml para as formas leveduriforme de *Sporothrix* spp. Conclui-se que a PNT apresentou atividade antifúngica frente células planctônicas de *Sporothrix* spp.

Palavras-chave: Esporotricose; Pentamidina; Sensibilidade.

ABSTRACT

Sporotrichosis is caused by dimorphic fungi belonging to the *Sporothrix schenckii* complex. This disease can mimic several other diseases of dermatological involvement, among them leishmaniasis. The differential diagnosis between these diseases can be a challenge and misdiagnosis can lead patients with sporotrichosis to misuse of leishmanicidal drugs. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of leishmanicide pentamidine (PNT) against planktonic cells of *Sporothrix schenckii* species in yeast form. We used 19 strains of *Sporothrix* spp. (10 *S. brasiliensis*, 02 *S. globosa*, 04 *S. mexicana* and 03 *S. Schenckii sensu stricto*). The sensitivity tests were performed on microplates of 96 wells, according to the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), M27-A3, with some adaptations. For the trials with the planktonic form, the glasses were prepared in saline solution and then adjusted for a last concentration of $0.5-2.5 \times 10^3$ ufc/ml. Subsequently, the microplates were incubated at 37 °C for 96h. The minimum inhibitory concentration (MIC) of PNT was defined as the lowest concentration capable of inhibiting 50%, 80% and 100% of growth, for antifungal agents, the mic was defined as the lowest concentration able to inhibit 100% anfotericina B (AMB) and itraconazol (ITC) or 80% terbinafina (TRB) of fungal growth compared to the growth of the drug-free control. The PNT drug presented antifungal activity, with minimal inhibitory concentration (MIC) varying from 0.06 to 0.25 µg/ml for the yeast forms of *Sporothrix* spp. It was concluded that the PNT showed antifungal activity in front of planetotonic cells *Sporothrix* spp.

Keywords: Sporotrichosis; Pentamidine; Sensitivity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - A: Macroscopia de *Sporothrix* spp., na forma filamentosa, em ágar batata, apresentando colônias de cor branca, com aspecto membranoso. B: Microscopia de *Sporothrix* spp. corado com lactofenol azul de algodão, demonstrando conídios e hifas nas extremidades que lembra a flor margarida.....17
- Figura 2** - A: Macroscopia de *Sporothrix* spp., na forma leveduriforme, em ágar BHI (brain heart infusion), com colônias de cor creme. B: Microscopia de *Sporothrix* spp corado com lactofenol com azul de algodão, apresentando blastoconídios em brotamento (seta vermelha).....17
- Figura 3** - Casos registrados de esporotricose mundial pela transmissão felina.....18
- Figura 4** - Evolução do espaço-temporal de casos de esporotricose em felinos no Brasil.....19
- Figura 5** - Lesões presentes na forma cutânea localizada da esporotricose (A), podendo assemelhar-se as lesões observadas em outras doenças dermatológicas, dentre elas a leishmaniose tegumentar (B e C).....21
- Figura 6** - Forma linfocutânea da esporotricose com lesões nodulares (A) e leishmaniose esporotricóide com lesões ulcerativas (B) com seguimento aos vasos linfáticos.....21
- Figura 7** - Lesões presentes na forma disseminada da esporotricose em um paciente com AIDS.....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepa, espécie e origem do complexo *Sporothrix schenckii* utilizadas neste estudo.....27

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos e leishmanicidas frente a espécies do complexo *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome

AMB – Anfotericina B

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CEMM – Centro Especializado em Micologia Médica

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EIA – Imunoensaio da Enzima

EV – Endovenoso

IIF – Imunofluorescência Indireta

IK- Iodeto de Potássio

IM – Intramuscular

ITC – Itraconazol

KOH – Hidróxido de Potássio

MOPS – Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico

PDA – Potato Dextrose Agar

ph – Potencial hidrogeniônico

PNT – Pentamidina

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

TRB – Terbinafina

ufc – Unidade formadora de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
h	Hora
%	Porcentagem
g	Gramas
mL	Mililitro
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Aspectos ecológicos	16
1.2 Morfologia	16
1.3 Epidemiologia.....	18
1.4 Patogenia	19
1.5 Apresentações clínicas.....	20
1.5.1 Forma cutânea.....	20
1.5.2 Forma extracutânea.....	22
1.6 Fatores de virulência.....	22
1.7 Diagnóstico micológico.....	23
1.8 Tratamento farmacológico.....	23
1.9 Métodos de estudo da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 Tipo de estudo.....	27
3.2 Local do estudo.....	27
3.3 Microrganismos	27
3.4 Drogas testes.....	28
3.5 Teste de sensibilidade antifúngica planctônica.....	28
3.6 Concentração fungicida mínima.....	29
3.7 Aspectos éticos	29
3.8 Análises estatísticas	29
4 RESULTADOS.....	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO A-ARTIGO PUBLICADO.....	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS

O crescimento de *Sporothrix* spp. ocorre principalmente em lugares que possuem elevada umidade relativa de 65% (HADAR et al., 2017). Esses fungos são classificados como dimórficos, apresentando-se na forma filamentosa em ambientes com temperaturas em torno de 28 °C e na forma leveduriforme quando estão em temperaturas em torno de 37 °C (LOPES-BEZERRA; MORA-MONTES; BONIFAZ, 2017). Este fungo existe, normalmente, como sapróbio na natureza e já foi isolado de palha, folha, espinhos de arbusto, madeira, casca de árvore, solo e algas (CRUZ, 2013).

A esporotricose é causada por membros do complexo *Sporothrix schenckii*, dos quais *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix schenckii* são as espécies que estão frequentemente associadas à doença humana (ALMEIDA-PAES et al., 2016).

Sua transmissão pode ocorrer por inoculação traumática do fungo presente nesses materiais contaminados, na região subcutânea do hospedeiro ou ainda pode ocorrer por transmissões zoonótica através de mordidas ou arranhões de animais, principalmente o gato (ZHANG et al., 2015).

Surtos de esporotricose por meio de infecção zoonótica foram descritos desde a década de 1990 e estão emergindo como uma doença infecciosa no Brasil, principalmente, nas regiões sul e sudeste. Os casos relatados associados aos animais domésticos desempenham papéis significativo na epidemiologia da doença, uma vez que estes animais apresentam elevadas cargas fúngicas (TERRA et al., 2017).

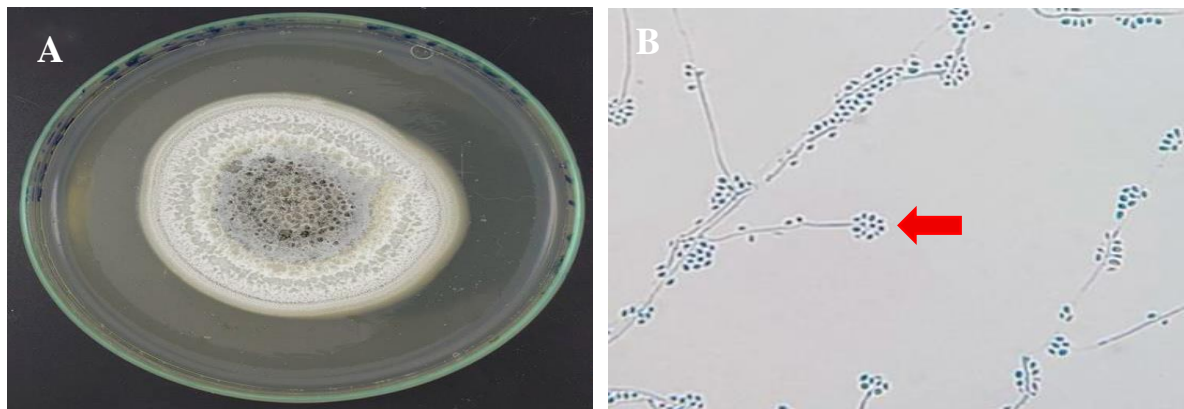
Como fator agravante, os gatos infectados ainda apresentam na lesão e nas secreções de feridas ulceradas uma carga exuberante desse microrganismo, potencializando dessa forma a transmissão tanto entre gatos como para o homem (MARQUES-MELO et al., 2014). Assim, diversas peculiaridades dos felinos podem facilitar a dispersão do fungo no ambiente dentro de áreas endêmicas.

1.2 MORFOLOGIA

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 36-37 °C, na forma leveduriforme (LOPES-BEZERRA et al., 2018).

Na forma filamentosa, as colônias de *Sporothrix* spp. podem apresentar-se planas e de coloração branca, Figura 1A, podendo adquirir cor marrom ou negra e aspecto rugoso. Microscopicamente, estes fungos possuem hifas delgadas, hialinas, septadas e ramificadas, com pequenos conídios, piriformes de paredes finas, hialinos, dispostos em cachos que lembram “flores de margarida” (BONIFAZ et al., 2016), Figura 1B.

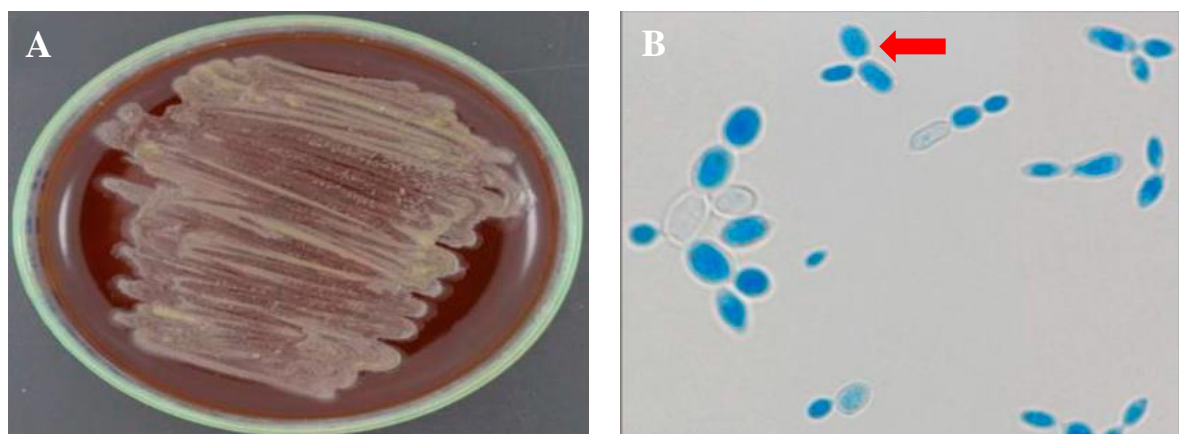
Figura 1. A: Macroscopia de *Sporothrix* spp., na forma filamentosa, em ágar batata, apresentando colônias de cor branca, com aspecto membranoso. B: Microscopia de *Sporothrix* spp. corado com lactofenol azul de algodão, demonstrando conídios e hifas nas extremidades que lembra a flor margarida (seta vermelha).



Fonte: CEMM, 2017.

As colônias leveduriformes cultivadas em laboratório possuem, macroscopicamente, coloração entre branca e creme, aspecto ceroso e superfície irregular, Figura 2A. Ao observá-las ao microscópio, as células leveduriformes podem ser ovais ou esféricas, ou em formato de charuto, geralmente com brotamentos ligados a uma célula central (RODRIGUES et al., 2015), Figura 2B.

Figura 2. A: Macroscopia de *Sporothrix* spp., na forma leveduriforme, em ágar BHI (brain heart infusion), com colônias de cor creme. B: Microscopia de *Sporothrix* spp corado com lactofenol com azul de algodão, apresentando blastoconídios em brotamento (seta vermelha).



Fonte: CEMM, 2017.

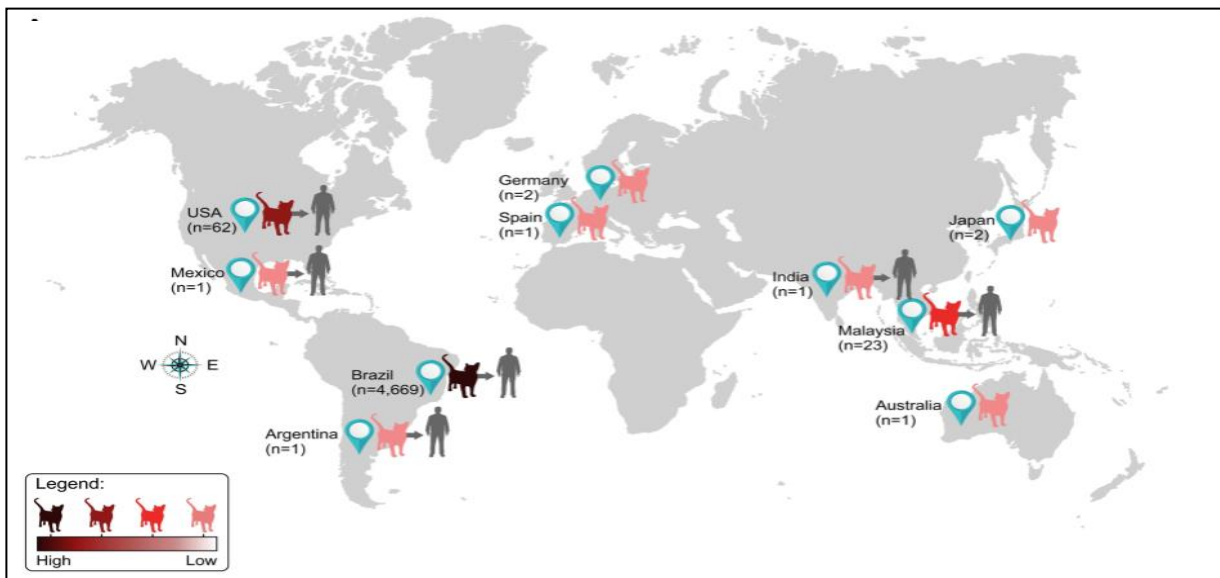
1.3 EPIDEMIOLOGIA

A esporotricose é considerada uma doença cosmopolita, ocorrendo predominantemente em áreas de clima quente e temperado (CHAKRABARTI et al., 2015). É endêmica no Sul da África, na Índia, no Japão, no Estados Unidos da América (EUA) e em vários países latino-americanos como Peru, Brasil, México, Colômbia, Uruguai, Costa Rica e Guatemala. A ampla distribuição geográfica dos casos diagnosticados destaca a dinâmica da transmissão de *Sporothrix* spp.

Há relatos de surtos como os que ocorreram no Estados Unidos da América (EUA), especialmente no vale do Mississippi, nos anos 80, envolvendo trabalhadores de reflorestamento infectados por pinheiros e mudas de musgo, assim como informes de grandes epidemias, como a que ocorreu nos anos 40, quando 3000 mineiros na África do Sul foram infectados pelo contato com vigas de madeira contaminadas, sendo considerada a maior epidemia no século XX (ORONOFIO-COSTA et al., 2017).

Nas últimas duas décadas (1998-2016), o Brasil experimentou um surto de esporotricose transmitida por gatos no Rio de Janeiro, com 4.669 casos relatados, conforme demonstrado pela Figura 3.

Figura 3. Casos registrados de esporotricose mundial pela transmissão felina.

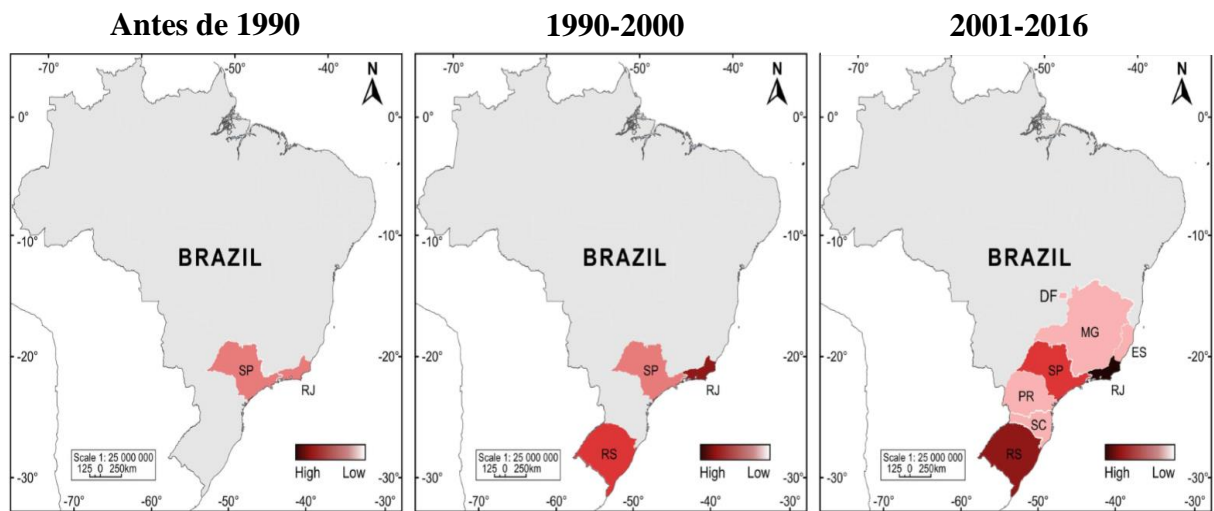


Fonte: Gremião et al., 2017.

A esporotricose transmitida por gatos aparece, em alguns casos, na forma de surtos ou epidemias dentro de um curto período. Notavelmente, antes da década de 1990, o Rio de Janeiro apresentou um baixo número de casos, quase sempre alheios aos tipos de transmissão felina

(GREMIÃO et al., 2017), Figura 4.

Figura 4. Evolução do espaço-temporal de casos de esporotricose em felinos no Brasil.



Fonte: Gremião *et al.*, 2017.

Assim, no Brasil, as ocorrências de esporotricose envolvendo a transmissão clássica pelo solo ou matéria orgânica são provenientes dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Já as ocorrências envolvendo a transmissão zoonótica, envolvendo principalmente o gato, tem ocorrido principalmente no Rio de Janeiro, na região metropolitana, onde é registrado o maior número de casos de esporotricose felina e humana (BRASIL, 2016).

Nos anos de 2013 a 2016, foram notificados 3.377 casos suspeitos de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. Neste período, o percentual de confirmação dos casos foi maior que 60% (BRASIL, 2016).

1.4 PATOGENIA

Alguns mecanismos de defesa do hospedeiro que variam conforme a apresentação clínica contra a espécie de *Sporothrix* spp. ainda não foram esclarecidos. A ação dos componentes da parede celular do fungo, especialmente a glicoproteína 70kDa (gp70), apresentam um efeito protetor no hospedeiro, mediado pelas células T-helper (Th1 em humanos), todavia, paradoxalmente, também faz a aderência de conídios ao epitélio, aumentando o potencial de invasão fúngica. A resposta imune celular mediada parece ser responsável pela eliminação ou pelo controle a infecção. Entretanto, a resposta imune humoral provoca anticorpos específicos contra a parede celular do fungo (OROFINO-COSTA, 2017).

Uma vez que *Sporothrix* spp. é inoculado no hospedeiro humano, através da lesão, com a invasão da derme e do tecido subcutâneo, esse fungo que se encontrava no ambiente, na sua

forma filamentosa, passa para leveduriforme, sua forma parasitária. Esse processo se inicia após 24 ou 48 h e pode levar até 13 dias (MAHAJAN, 2014). Em linhas gerais, a esporotricose humana pode desenvolver-se com diferentes formas clínicas que dependem do resultado da interação parasita-hospedeiro (ALSPAUGH, 2015).

As lesões linfocutâneas quando comparadas às lesões fixas, mostram-se com um quadro de maior extensão e severidade do que lesões fixas, conduzindo à destruição mais intensa do tecido. Por outro lado, as lesões fixas mostraram uma resposta imune mais equilibrada e eficiente, levando ao controle da infecção sem a destruição do tecido adjacente e disseminação fúngica. Alguns pacientes podem demonstrar lesões cutâneas antes do acometimento do sistema nervoso central, o que sugere a disseminação hematogênica do fungo (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2018).

1.5 APRESENTAÇÕES CLÍNICAS

As formas clínicas da esporotricose estão classificadas como formas cutânea (localizada, linfocutânea ou disseminada) e extracutânea. Apesar de ser considerada uma doença subcutânea e suas lesões serem visualizadas na pele ou nas adjacências de vasos linfáticos (sua forma mais comum), a esporotricose pode atingir os pulmões (forma extracutânea) quando os conídios são inalados ou, mais raramente, ter disseminação sistêmica em pacientes imunocomprometidos (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017).

1.5.1 FORMA CUTÂNEA

Classicamente, a esporotricose é caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas nodulares ou ulceradas que podem ter distribuição localizada, linfocutânea ou ainda cutânea disseminada (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). Esse tipo de lesão também pode estar presente em outras doenças dermatológicas, como a leishmaniose (BAZZI et al., 2016), sendo, portanto, essencial um diagnóstico diferencial com confirmação laboratorial. A forma localizada consiste em uma única lesão, geralmente é o local onde houve a inoculação, sem disseminação linfática regional, Figura 5A (OROFINO-COSTA; RODRIGUES; MACEDO; ENGEMANN, 2017).

Figura 5. Lesões presentes na forma cutânea localizada da esporotricose (A), podendo assemelhar-se às lesões observadas em outras doenças dermatológicas, dentre elas a leishmaniose tegumentar (B e C).



Fontes: Orofino- Costa et al. (2017) e Carvalho et al. (2017).

A forma linfática é a manifestação clínica mais comum, cerca de 80% dos pacientes afetados. As lesões pápulo-nodulares, eritematosas surgem de locais de trauma cutâneo e se espalham de modo proximal ao longo dos vasos linfáticos, Figura 6A. Esse tipo de lesão da esporotricose assemelha-se com outras doenças de pele, como a leishmaniose, Figura 6B, a tuberculose, a sarcoidose, a paracoccidioidomicose e a cromoblastomicose (GOMPERTZ et al., 2016).

Figura 6. Forma linfocutânea da esporotricose com lesões nodulares (A) e leishmaniose esporotricóide com lesões ulcerativas (B) com seguimento aos vasos linfáticos.



Fontes: Orofino- Costa et al. (2017) e Carvalho et al. (2017).

Na forma disseminada, a doença pode aparecer como úlceras maiores com bordas bem definidas e endurecidas, ou lesões eritematosas, pápula com pústulas e infiltradas, Figura 7. Alguns pacientes exibem lesões múltiplas na pele, sem invasão sistêmica. Em geral, esses pacientes podem ser indivíduos imunocompetentes, transplantados ou que faz uso de medicamentos imunossupressores (OROFINO-COSTA; RODRIGUES; MACEDO; ENGEMANN, 2017).

Figura 7. Lesões presentes na forma disseminada da esporotricose em um paciente com AIDS.



Fonte: Orofino- Costa et al. (2017).

1.5.2 FORMA EXTRACUTÂNEA

Raramente, a esporotricose desenvolve-se com apresentações extracutânea pulmonar ou disseminada, sendo estas relacionadas a pacientes com imunossupressão (FREITAS et al., 2014). A propagação da forma extracutânea pode ocorrer através da via hematogênica ou aérea. A doença osteomuscular, incluindo a osteomielite e a artrite séptica, são os casos mais relatados dessa infecção. Além disso, outros órgãos podem ser acometidos, como o pulmão que pode ser infectado após a inalação direta do fungo ou a propagação hematogênica de uma outra fonte e pode apresentar-se com lesões cavitárias ou não cavitárias (HESSLER; KAUFFMAN; CHOW, 2017).

1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os microrganismos patógenos desenvolvem vários mecanismos que podem auxiliar na sobrevivência no meio ambiente ou no hospedeiro (STEENBERGEN et al., 2004).

A parede celular fúngica apresenta uma viabilidade estrutural e interação com o meio ambiente, sendo um dos fatores contributivos na interação do sistema imune do hospedeiro, além disso, contém macromoléculas envolvidas na instalação do patógeno (LOPES et al., 2018).

Ainda pouco se sabe sobre os fatores de virulência de *Sporothrix* spp. 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).

1.7 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

O isolamento e a identificação dos fungos de uma amostra são padrão para o diagnóstico desta doença. Assim, umas das técnicas é o exame direto por meio da amostra biológica com hidróxido de potássio (KOH). Outra técnica utilizada é o diagnóstico micológico por meio da cultura cujo o método consiste na identificação do agente etiológico da esporotricose por meio da semeadura. Os meios de cultura comumente utilizados são Ágar Sabouraud simples, Ágar Sabouraud acrescido de Cloranfenicol ou ainda o Ágar Sabouraud acrescido de Cloranfenicol e Cicloheximida. A amostra pode ser coletada de aspirado nodulares ou biopsias da lesão que quando semeados, resultam no aparecimento de colônias filamentosas (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

1.8 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

As micoses humanas são consideradas um problema de saúde pública no Brasil. O tratamento das micoses, em geral, é prolongado e pode apresentar, em alguns casos, efeitos adversos. Desse modo, a escolha do antifúngico deve ser baseada na clínica e epidemiologia (CASTRO et al., 2018).

A dificuldade no tratamento pode ser atribuída a fatores como diagnóstico tardio, longa duração do tratamento e desistência da terapia pelos pacientes (REIS-GOMES et al., 2012). Alguns antifúngicos podem ser utilizados no tratamento da esporotricose, dentre eles estão, o iodeto de potássio (IK), itraconazol (ITC), terbinafina (TRB) e anfotericina B (AMB). A solução saturada de iodeto de potássio e o itraconazol, tem elevada eficácia nas formas mais comuns da doença (cutâneo localizada e linfocutânea), porém devido os seus efeitos adversos o iodeto de potássio não é utilizado no tratamento das formas extracutânea ou disseminadas da esporotricose. Com isso o itraconazol via oral tem sido o fármaco de escolha, para o tratamento da esporotricose, e os casos mais graves da infecção o tratamento mais indicado é a anfotericina B (MAHAJAN, 2014). Já a terbinafina uma alternativa terapêutica para pacientes que não podem usar itraconazol ou quando há

efeitos colaterais mediante interação com fármacos (VETORATTO et al., 2018; ALMEIDA-PAES, 2016).

Com relação ao tratamento da leishmaniose, o fármaco utilizado de 2º escolha é

pentamidina, que pertence ao grupo das diamidinas aromáticas, e 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. A pentamidina também pode ligar-se preferencialmente ao DNA do cinetoplasto de *Leishmania* spp. e interferir na replicação e transcrição em nível mitocondrial (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).

A pentamidina já demonstrou possuir ação antimicrobiana contra outros microrganismos, dentre eles: *Candida* spp. (MACIEJEWSKA et al 2014) e *Fusarium* spp. (VENTURINI et al., 2016). Além disso essa droga também é utilizada clinicamente para o tratamento de infecções causadas por *Pneumocystis jirovecii* (CREEMERS-SCHILD et al., 2016).

1.9 MÉTODOS DE ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

O teste de sensibilidade antifúngica, considerado padrão ouro, auxiliam na definição da resistência fúngica e na escolha do tratamento adequado conforme as particularidades de cada fungo. A microbiologia clínica depende desses métodos para selecionar o fármaco que demonstre uma melhor resposta terapêutica, além disso, viabiliza a avaliação da epidemiologia local e global frente a resistência antifúngica. Contudo, a similitude dos testes *in vitro* com o *in vivo* ainda é limitado, devido aos fatores que não podem ser controlados, como imunidade do hospedeiro, virulência do patógeno, dentre outros (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

Os protocolos produzidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) têm a finalidade de padronizar para facilitar as interpretações dos dados, independentemente das diferenças epidemiológica entre as localidades (HADRICH; AYADI, 2018) .

O CLSI publicou o documento para a avaliação da sensibilidade antifúngica, o M27-A, utilizado como referência para teste de diluição em caldo com o objetivo de determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. (CLSI, 2008a).

Essas normas estabelecem alguns critérios para a realização dos testes de sensibilidade, 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. Além disso, também incluem as condições de ensaio para as drogas antifúngicas anfotericina B, azólicos (itraconazol, cetoconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol), terbinafina, griseofulvina, ciclopirox e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) (CLSI, 2008b, 2008a).

Contudo, o protocolo M27-A3 do CLSI não descreve os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* para a forma leveduriforme do fungo *Sporothrix* spp., todavia o documento é utilizado com adaptações, como o período da leitura (SANCHOTENE et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica de pentamidina, *in vitro*, em células planctônicas da forma leveduriforme de espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de pentamidina, ante células planctônicas da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.

Determinar a concentração fungicida mínima (CFM) de pentamidina, ante células planctônicas da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de estudo experimental com abordagem quantitativa desenvolvido com espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, disponibilizadas pela micoteca da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2 LOCAL DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada no laboratório do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.3 MICRORGANISMOS

Nesse estudo foram utilizadas 19 cepas pertencentes ao complexo *S. schenckii*: 10 de *S. brasiliensis*, 2 de *S. globosa*, 4 de *S. mexicana* e 3 de *S. schenckii sensu stricto*. Os isolados foram obtidos da micoteca do Centro Especializado de Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Tabela 1. Cepa, espécie e origem do complexo *Sporothrix schenckii* utilizadas neste estudo.

Cepa	Espécie	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

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

3.4 DROGAS TESTES

O leishmanicida isotionato de pentamidina (PNT, Sigma, St Louis, MO, USA) foi preparado conforme recomendação do fabricante em água destilada estéril, a uma concentração de 5.000 µg/mL, sendo estocadas a -20 °C até o momento de uso. Os antifúngicos anfotericina B (AMB), itraconazol (ITC) e terbinafina (TRB) foram preparados conforme descrito no documento M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008b).

3.5 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA PLANCTÔNICA NA FORMA LEVEDURIFORME

Os testes de sensibilidade foram realizados em microplacas de 96 poços, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme o documento M27-A3 (forma leveduriforme) do CLSI (CLSI, 2008b), com adaptações. As drogas foram testadas em concentrações finais de 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 $0,5-2,5 \times 10^3$ ufc/mL 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 37 °C por 96 h. A concentração inibitória mínima (CIM) do leishmanicida foi definida 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. Com relação aos antifúngicos, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% (AMB e ITC) e 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.

3.6 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA

A concentração fungicida mínima (CFM) da droga leishmanicida 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).

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Os aspectos éticos foram respeitados em todas as etapas da pesquisa. As amostras possuem cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nas comparações entre dados que apresentaram distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste de T de Studart 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 por meio do software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

A pentamidina apresentou atividade inibitória frente as espécies do complexo *S. schenckii* na sua forma leveduriforme (Tabela 1). Os valores de CIM da pentamidina para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., 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 encontrados variaram de 0,05 a 0,25 µg/mL (AMB e ITC), 0,03 e 0,13 µg/mL (TRB) para *Sporothrix brasiliensis*; de 0,03 a 0,25 µg/mL (AMB e ITC) e 0,03 µg/mL (TRB) para *Sporothrix globosa*; de 0,5 a 0,13 µg/mL (AMB), 0,5 a 1 µg/mL (ITC), 0,03 a 0,13 µg/mL (TRB) para *Sporothrix mexicana*; de 0,06 a 0,13 µg/mL (AMB), 0,5 a 0,25 µg/mL (ITC) e 0,03 a 0,13 µg/mL (TRB) para *Sporothrix schenckii sensu stricto*.

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. A CIM para 80 % de inibição é semelhante a CIM de terbinafina. Com relação aos valores de CFM da pentamidina foram observados resultados variando de 0,06 a 0,25 µg/mL para *Sporothrix brasiliensis*; 0,25 µg/mL para *Sporothrix globosa*; 0,13 a 0,25 µg/mL para *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix schenckii sensu stricto*, sem diferenças estatísticas entre a CFM e a CIM para 100% de inibição fúngica.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos e leishmanicidas frente a espécies do complexo *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme.

Espécies (n)	Antifúngicos			Leishmanicida			CFM
	Anfotericina B	Itraconazol	Terbinafina	Pentamidina			
	CIM	CIM	CIM	CIM			
			50%	80%	100%		
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=10)	0,13 (3)*	0,25 (3)	0,03 (5)	< 0,03 (2)	0,03 (2)	0,06 (2)	0,06 (1)
	0,25 (3)			0,03 (5)	0,06 (5)	0,13 (5)	0,13 (4)
	0,5 (4)	0,5 (7)	0,13 (5)	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)	0,03(1)	0,6 (1)	0,13 (1)	0,25(1)
	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)	<0,03 (1)	0,03 (1)	0,06 (1)	0,13 (2)
	0,25 (1)	0,5 (1)		0,03 (2)	0,06 (2)	0,13 (2)	0,25 (2)
	0,5 (2)	1 (1)	0,13 (3)	0,06 (1)	0,13 (1)	0,25 (1)	
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i> (n=3)	0,06 (2)	0,25 (1)	0,03 (1)	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)

*: Representam o quantitativo de cepas que foram inibidas de acordo com a concentração de droga. CIM: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$). CFM: Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/mL}$).

5 DISCUSSÃO

A esporotricose é uma infecção subcutânea causada por inoculação traumática de materiais contaminados que transportam inóculos de espécies de *Sporothrix schenckii*, seja pela rota sapronótica (saprofítica), a qual envolve contato direto com o solo e matéria orgânica em decomposição, ou pela rota zoonótica, a qual envolve contato com animais infectados (Zhang et al., 2015; OROFINO-COSTA et al., 2017).

As principais espécies patogênicas relacionadas com os casos de infecção em humanos e animais são *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu*, *S. globosa* e *S. luriei*, divergindo de acordo com sua distribuição geográfica, nicho ecológico e rotas de transmissão. Essas interações hospedeiro-ambiente são determinantes clássicos dos fatores de risco para a aquisição de doenças (RODRIGUES et al., 2014; ALMEIDA-PAES, 2015).

Diversos estudos demonstram uma alta variabilidade genética entre isolados identificados morfologicamente (RODRIGUES et al., 2013). A patogenicidade varia conforme os fatores de virulência do patógeno e, bem como, os mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, entre as espécies citadas, destaca-se *Sporothrix brasiliensis* como a mais virulenta, devido à sua alta capacidade de invasão (OROFINO-COSTA et al., 2017).

Diante da semelhança clínica com outras doenças, como a leishmaniose cutânea, o diagnóstico da esporotricose ainda é desafiador (CARVALHO et al., 2017). O diagnóstico da leishmaniose é baseado em dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, incluindo técnicas parasitológicas, como identificação de formas amastigotas em esfregaços da lesão, e imunológicas, com o teste de Montenegro, a imunofluorescência indireta (IIF) e o Imunoensaio da Enzima (EIA) que busca por anticorpos (SKRABA, et al., 2015). Sendo uma associação entre duas ou mais técnicas forneceria um diagnóstico fidedigno, já que os testes de pesquisa de anticorpos são sensíveis e específicos, mas estão associados à reatividade cruzada com outras doenças, principalmente a doença de Chagas e a leishmaniose visceral.

A esporotricose não é uma condição reconhecida e por esta razão, muitas lesões nodulares, ulcerativas e supurativas são diagnosticadas erroneamente e, assim, são tratadas como leishmaniose ou outras infecções bacterianas. Em alguns casos, isto pode conduzir ao risco para o paciente quando submetido ao tratamento inadequado (MAHAMOUDI, 2015).

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., 2016; BRILHANTE et al., 2017).

A terbinafina, antifúngico do grupo das alilaminas, demonstrou em vários estudos *in vitro* ação primária fungicida frente a fungos dimórficos, incluindo *S. schenckii*, não há relatos de resistência frente ao agente, além dos efeitos tóxicos reduzidos quando comparado ao itraconazol (MEINERZ et al., 2007). Além disso, a TRB é o antifúngico mais eficaz diante dos isolados de *Sporothrix* spp., apresentando baixos valores e pouca variação de MIC, também demonstrado no presente estudo.

Com relação ao ITC, tratamento de 1ª escolha para esporotricose linfocutânea e cutânea, estudos mostram boa atividade em relação aos isolados de *Sporothrix* spp. (MAHMOUDI et al., 2016).

A anfotericina B, usada para o tratamento de formas invasivas e disseminadas, em alguns estudos apresentaram variações maiores, contudo, esses estudos demonstram as formas de resistências das espécies, diante da presença de melanina na parede celular que atua na proteção do fungo frente as drogas (ALMEIDA-PAES et al., 2016).

Quanto ao efeito antifúngico da droga leishmanicida no crescimento planctônico de *Sporothrix* spp., foi observado que a PNT apresentou CIMs para 50%, 80% e 100% de inibição do crescimento 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.

6 CONCLUSÃO

A Pentamidina possui atividade antifúngica frente as células planctônicas do complexo *S. schenckii* na sua forma leveduriforme, estado em que se encontra de modo parasitário no hospedeiro. Além disso, apresentou variações do efeito inibitório semelhantes aos da Anfotericina B e Itraconazol frente as cepas de *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix mexicana* das células planctônicas na forma leveduriforme.

REFERÊNCIAS

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, mar, 2016.

ALMEIDA-PAES. Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the Sporothrix Complex, **Biomed Res Int**. v. 2015, p. 1-10, 2015.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genet. Biol.**, v. 78, p. 55–58, set, 2015.

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, abril, 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. 2018.

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, abr, 2018.

CARVALHO L. M. V. et al. Sporotrichoid leishmaniasis: a cross-sectional clinical, epidemiological and laboratory study in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 59, e33, jun, 2017.

CASTRO, V. B.; PORTELA, C.; OLIVEIRA, M. C.; OBADIA, D. L.; GRIPP, A. C. Esporotricose e seu Polimorfismo Clínico: Um Caso com Lesões Ulceradas na Região Centro Facial em Paciente Adulto. **Revista SPDV**, v. 76, n. 1, p. 87-90, dez, 2018.

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, jan, 2015.

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.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N. Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know. **J. Fungi**, v. 4, n. 89, p. 1-16, jul, 2018.

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

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.

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.; ZANCOPE-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, ago, 2014.

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

GOMPERTZ, O. F. et al. Atypical Clinical Presentation of Sporotrichosis Caused by *Sporothrix globosa* Resistant to Itraconazole, **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1218-1222, abr, 2016.

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, jan, 2017.

HALDAR, NIBEDITA; HALDAR, NILADRI; CHAKRABARTI, INDRANIL, M.K.; SHARMA, M.K. Sporotrichosis Centering Siliguri and its Sub-Himalayan Neighbours. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.**,v. 6, n. 2, p. 817-822, fev, 2017.

HADRICH, I.; AYADI, A. Epidemiology of antifungal susceptibility: Review of literature. **J. Mycol. Med.**, v. 28, n. 3, p. 574-584, set, 2018.

HESSLER C.; KAUFFMAN, C. A.; CHOW, F. C. The Upside of Bias: A Case of Chronic Meningitis Due to *Sporothrix Schenckii* in an Immunocompetent Host. **The Neurohospitalist**, v. 7, n. 1, p. 30-34, jan, 2017.

IYALLA, C. A review of the virulence factors of pathogenic fungi. **African J. Clin. Exp. Microbiol.**, v. 18, n. 1, p. 53–58, jan, 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, p. 2255–2281, mar, 2015.

LOPES-BEZERRA, L. M. et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agentes. **Medical Mycology**, v. 56, n. S1 p. 126–143, abr, 2018.

LOPES-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M.; BONIFAZ, A. *Sporothrix and Sporotrichosis*. In: **Current Progress in Medical Mycology**. New York: Springer, p. 309-331, 2017.

MACIEJEWSKA, D.; ZABIŃSKI, J.; KAZMIERCZAK, P.; WOJCIUK, K.; KRUSZEWSKI, M.; KRUSZEWSKA, H. *In vitro* screening of pentamidine analogs against bacterial and fungal strains. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 13, p. 2918–2923, abr, 2014.

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

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. 39-45, ago, 2015.

MAHMOUDI, S.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P.; SAFARA, M.; HEIDARI, M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. **Medical Mycology**, v. 54, n. 6, p. 593–599, mar, 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, jun, 2014.

MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; BRUM, C. S.; BRUM, M. O.; MEIRELES, M. A. C.; MELLO, J. R. B. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n.1, Jan/Feb, 2007.

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, ago, 2015.

OROFINO-COSTA, R. ; MACEDO, P. M.; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics, **An Bras Dermatol.**, v. 92, n. 5, p. 606-620, set-out, 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, jan, 2012.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, S.; CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, 405–412, mar, 2013.

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, mar, 2015.

RUDRAMURTHY, S. M.; CHAKRABARTI, A. Sporotrichosis: Update on Diagnostic

Techniques. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 11, p. 134–140, jun, 2017.

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.**, v. 55, n.8, p. 869–876, nov, 2017.

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, fev, 2016.

STEENBERGEN, J. N., NOSANCHUK, J. D., MALLIARIS, S. D.; CASADEVALL, A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 6, p. 3478-3488, jun, 2004.

TERRA P. P. D. et al. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.11, n.8, e0005903, ago, 2017.

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, jun, 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. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, p. 18-20, mar, 2018.

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, dez, 2015.

ANEXO A- ARTIGO PUBLICADO

Future
MICROBIOLOGY

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents

Raimunda SN Brilhante^{*1}, Vandbergue S Pereira¹, Jonathas S Oliveira¹, Raissa GP Lopes¹, Anderson M Rodrigues², Zoilo P Camargo², Waldemiro A Pereira-Neto¹, Débora SCM Castelo-Branco¹, Rossana A Cordeiro¹, José JC Sidrim¹ & Marcos FG Rocha^{1,3}

¹Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology & Legal Medicine, Federal University of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo – CEP: 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Cellular Biology Division, Department of Microbiology, Immunology & Parasitology, Federal University of São Paulo, Rua Botucatu, 862, 6th floor, Medical Sciences Building, CEP: 04023-062, São Paulo, São Paulo, Brazil

³Postgraduate Program in Veterinary Sciences, College of Veterinary, State University of Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil

*Author for correspondence: Fax: +55 853 295 1736; brilhante@ufc.br

Aim: The purpose of this study was to evaluate the effects of the antileishmanials meglumine antimoniate and pentamidine against *Sporothrix schenckii* complex. **Materials & methods:** The antifungal activity of the two antileishmanials was assessed by broth microdilution. The interaction between the antileishmanials and antifungal drugs (amphotericin B, itraconazole and terbinafine) was evaluated by the checkerboard assay. The effect of prior exposure of *Sporothrix* spp. yeast cells to antileishmanials was evaluated by broth microdilution. **Results:** Only pentamidine showed antifungal activity against *Sporothrix* spp. Synergistic interactions were observed between pentamidine and the antifungals. Also, the pre-exposure to meglumine antimoniate reduced the susceptibility of *Sardinella brasiliensis* and *S. schenckii sensu stricto* to amphotericin B and itraconazole. **Conclusion:** Pentamidine showed antifungal activity against *Sporothrix* spp., indicating it is a possible therapeutic alternative for the treatment of sporotrichosis.