



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM**  
**GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM**

**JULIANA MARIA MACIEL**

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MILTEFOSINA  
E IODETO DE POTÁSSIO FRENTE À ESPÉCIES DO COMPLEXO *Sporothrix*  
*schenckii* NA FORMA LEVEDURIFORME**

**FORTALEZA**

**2019**

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MILTEFOSINA  
E IODETO DE POTÁSSIO FRENTE À ESPÉCIES DO COMPLEXO *Sporothrix  
schenckii* NA FORMA LEVEDURIFORME**

Monografia apresentada ao  
Departamento de Enfermagem da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para 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)

---

- M138a Maciel, Juliana Maria.  
AVALIAÇÃO, IN VITRO, DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MILTEFOSINA E IODETO DE POTÁSSIO FRENTE À ESPECIES DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii* NA FORMA LEVEDURIFORME / Juliana Maria Maciel. – 2019.  
41 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. I. Título.

CDD 610.73

---

JULIANA MARIA MACIEL

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MILTEFOSINA  
E IODETO DE POTÁSSIO FRENTE À ESPÉCIES DO COMPLEXO *Sporothrix  
schenckii* NA FORMA LEVEDURIFORME.**

Monografia apresentada ao  
Departamento de Enfermagem da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Enfermagem.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maira Di Ciero Miranda  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

M.<sup>a</sup>. Odaleia de Oliveira Farias  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Ana Lúcia e Jurandir.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me dar sabedoria e por me permitir concluir mais uma fase.

Aos meus pais, Ana Lúcia e Jurandir, quem sempre me deram todo o amor, carinho, zelo. Obrigada pelo apoio imprescindível em todas as fases da minha vida, e por guiar e iluminar meus passos. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha irmã Júlia, que me incentivou, e sempre me considerou sua “fonte de inspiração”.

À minha família, que me estimulou a ir mais longe, e compreendeu as minhas ausências em celebrações e momentos familiares.

Ao meu namorado, Lucas, pelo apoio, amor, companheirismo e compreensão.

À Tânia, Cleiton, Isabele e Isadora que me acolheram no seu lar, me tornando parte dele, e me acolhendo como membro da família.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica pelos recursos que possibilitaram a execução deste trabalho.

À minha orientadora, prof. Dra. Sâmia Brilhante pela oportunidade, pelo voto de confiança, paciência, atenção e ensinamentos durante esta jornada.

Aos demais professores do CEMM pela dedicação com todos os alunos, e pelo empenho de tornar CEMM um laboratório de excelência em ensino, pesquisa e extensão.

Aos colegas do CEMM pelo companheirismo e ensinamentos que nunca irei me esquecer. Em especial aos companheiros da equipe *Sporothrix*: Raissa Geovanna, Lucilene Queiroz, Vandbergue Santos e Felipe Magalhães gratidão por termos trilhado esse caminho juntos.

A Raissa Geovanna, mais do que um membro da equipe *Sporothrix*. Uma amiga que desde o início da graduação me apoiou, puxou minha orelha, e sempre esteve comigo nos momentos de apuros como universitária.

À Glauca Guedes, por ter uma visão além, pelo companheirismo, pela ajuda de sempre e por nos encorajar dia a dia.

As amigas que a enfermagem me deu: Raissa Geovanna, Thaysa Grasiely, Beatriz Queiroz, Angélica Gomes e Indyara Dias.

À turma 75 da Enfermagem, pelo companheirismo ao longo desses cinco anos de caminhada.

Aos professores e profissionais de saúde de excelência que conheci durante essa jornada, que me inspiraram como pessoa e como enfermeira. Vocês são cuidado e luz para os pacientes.

Aos funcionários do Departamento de Enfermagem e do bloco de Biomedicina pelo acolhimento e os “bom dias” calorosos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo incentivo e apoio financeiro através da bolsa PIBIC.

A Universidade Federal do Ceará, por possibilitar este sonho de me graduar em uma universidade de excelência e que tenho muito orgulho de fazer parte.

*“Muitas vezes o fator determinante da vitória  
não são as escolhas, mas sim as renúncias”*

(Anônimo)

## RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea, causada por fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, encontrado predominantemente em áreas tropicais e subtropicais da América Latina. A Miltefosina (MIL) é um quimioterápico pertencente a classe dos antineoplásicos. Posteriormente foi demonstrado sua ação antiparasitária, e mais adiante foi verificado seu potencial antifúngico *in vitro*. Este estudo objetivou analisar a sensibilidade planctônica de espécies do complexo *S. schenckii* na forma leveduriforme à miltefosina, determinando a concentração inibitória mínima (CIM). Foram utilizadas 18 cepas na forma leveduriforme de *S. schenckii*. Sendo *S. brasiliensis* (n=10), *S. mexicana* (n=4), *S. schenckii stricto sensu* (n=2), e *S. globosa* (n=2). Como drogas-teste utilizou-se a miltefosina (MIL) e iodeto de potássio (KI) testadas nas concentrações de 0,0313-16 µg/mL. Anfotericina B (AMB) e Itraconazol (ITC) foram incluídas como drogas controle, e foram testadas nas concentrações de 0,0313 a 16 µg/mL, respectivamente. As diluições foram preparadas em RPMI. Os testes de sensibilidade foram realizados através do método de microdiluição em caldo em placas com 96 poços para a forma leveduriforme. O ensaio de sensibilidade planctônica tem como objetivo obtermos os valores de concentração inibitória mínima (CIM). Os inóculos, foram feitos em solução salina, e ajustados na escala 1 de McFarland. Em seguida, foram feitas diluições em RPMI, para ajuste final do inóculo, com as concentrações 1 a  $5 \times 10^3$  UFC/mL. As amostras foram testadas em duplicata, e os resultados lidos visualmente após o período de incubação de 96 h a 37 °C. Considerou-se a CIM da AMB como a mais baixa concentração capaz de inibir 100% (CIM100) do crescimento fúngico, da MIL como a menor concentração capaz de inibir 50% (CIM50), 80% (CIM80) e 100% do crescimento fúngico, e do ITC a CIM como capaz de inibir 100% do crescimento fúngico, quando comparado com o controle de crescimento. Todas as cepas de *Sporothrix schenckii* foram inibidas pelas drogas miltefosina e iodeto de potássio. Para a forma leveduriforme, obtivemos os seguintes valores de CIM: 62,5 a 125 mg/mL para KI; 0,125 a 2 µg/mL para MIL; 0,125 a 1 µg/mL para ITC; 0,0312 a 1 µg/mL para AMB. E foram evidenciados os seguintes valores significativos de inibição do KI na CIM, com KI>AMB, ITC e MIL ( $p<0,0001$ ), para CIM80 e CIM50, com o KI>ITC e MIL ( $p<0,0001$ ). Conclui-se que todas as cepas de *S. schenckii* foram inibidas pela Miltefosina comprovando sua atividade antifúngica *in vitro* e pelo Iodeto de Potássio.

**Palavras-chave:** Atividade antifúngica. Miltefosina. Esporotricose.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous, cosmopolitan mycosis caused by dimorphic fungi belonging to the *Sporothrix schenckii* complex, found predominantly in tropical and subtropical areas of Latin America. Miltefosine (MIL) is a chemotherapeutic class of antineoplastic agents. Subsequently, its antiparasitic action was demonstrated, and its antifungal potential was verified *in vitro*. This study aimed to analyze the planktonic sensitivity of *S. schenckii* complex species in the yeast form to miltefosine, determining the minimum inhibitory concentration (MIC). Eighteen strains were used in the yeast form of *S. schenckii*. *S. brasiliensis* (n = 10), *S. mexicana* (n = 4), *S. schenckii stricto sensu* (n = 2), and *S. globosa* (n = 2). Miltefosine (MIL) and potassium iodide (KI) tested at concentrations of 0.0313-16 µg / mL were used as test drugs. Amphotericin B (AMB) and Itraconazole (ITC) were included as control drugs, and were tested at concentrations of 0.0313 to 16 µg / mL, respectively. Dilutions were prepared in RPMI. Sensitivity tests were performed using the 96-well plate broth microdilution method for the yeast form. The plankton sensitivity test aims to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC) values. The inoculums were made in saline solution and adjusted on the McFarland scale 1. Subsequently, dilutions were made in RPMI, for final adjustment of the inoculum, at concentrations 1 to 5 x 10<sup>3</sup> CFU / mL. Samples were tested in duplicate, and the results read visually after the incubation period of 96 h at 37 ° C. AMI MIC was considered the lowest concentration capable of inhibiting 100% (MIC<sub>100</sub>) of fungal growth, MIL as the lowest concentration capable of inhibiting 50% (MIC<sub>50</sub>), 80% (MIC<sub>80</sub>), and 100% fungal growth, and from ITC to MIC as capable of inhibiting 100% fungal growth when compared to growth control. All strains of *Sporothrix schenckii* were inhibited by the drugs miltefosine and potassium iodide. For the yeast form, we obtained the following MIC values: 62.5 to 125 mg / mL for KI, 0.125 to 2 µg / mL for MIL; 0.125 to 1 µg / mL for ITC; 0.0312 at 1 µg / mL for AMB. The following significant KI inhibition values were shown in MIC with KI > AMB, ITC and MIL (p < 0.0001) for CIM<sub>80</sub> and CIM<sub>50</sub>, with KI > ITC and MIL (p < 0.0001). It is concluded that all strains of *S. schenckii* were inhibited by Miltefosine proving their antifungal activity *in vitro* and by Potassium Iodide.

**Keywords:** Antifungal activity. Miltefosine. Sporotrichosis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Prevalência da Esporotricose no Mundo..... 16
- Figura 2** – *Sporothrix* spp. na forma filamentosa. (a) Macromorfologia em ágar batata que exibe colônias de cor branca, com aspecto membranoso, a seta vermelha indica o centro da colônia tornando-se escurecido com o passar do tempo; (b) Micromorfologia em lactofenol azul-algodão, 400X, pode-se observar hifas e conídios nas extremidades assemelhando-se à flor de margarida (seta preta)..... 17
- Figura 3** – *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme. (a) Macromorfologia em ágar BHI (*brain heart infusion*), suplementado com 5% de sangue de carneiro, que exibe colônias de cor creme, com aspecto ceroso; (b) Micromorfologia em lactofenol azul-algodão, 400X, pode-se observar células leveduriformes com formatos arredondados e ovais. A seta preta indica blastoconídio em brotamento.....18
- Figura 4** – Lesões presentes na forma cutânea localizada da esporotricose, do tipo única, ulcerativa e com bordas hiperemiadas. (A e B),..... 19
- Figura 5** – Forma linfocutânea da esporotricose com lesões nodulares (A) e ulcerativas (B) com seguimento aos vasos linfáticos.....20

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Atividade antifúngica, <i>in vitro</i> , da anfotericina B (AMB), itraconazol (ITC), miltefosina (MIL) e iodeto de potássio (KI), frente a cepas do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> na forma leveduriforme .....	28
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB – Anfotericina B

BHI – *Brain Heart Infusion*

CEMM – Centro Especializado em Micologia Médica

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EUCAST - *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*

HE – Hematoxilina-eosina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

ITC – Itraconazol

Kg – Kilograma

KI – Iodeto de potássio

KOH – Hidróxido de potássio

MIL – Miltefosina

mg - Miligrama

mL – Mililitro

NaOH – Hidróxido de Sódio

PAS – Ácido periódico de Schiff

PLECT - Paracoccidioidomicose, Leishmaniose, Esporotricose, Cromoblastomicose e Tuberculose

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

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

UFC – Unidade formadora de colônia

µg – Micrograma

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
	1.1 Aspectos históricos .....	15
	1.2 Epidemiologia .....	15
	1.3 Patogênese.....	16
	1.4 Formas clínicas .....	18
	1.5 Diagnóstico.....	21
	1.6 Tratamento.....	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
	2.1 Objetivo geral .....	25
	2.2 Objetivo(s) específico(s) .....	25
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
	3.1 Local e tipo do estudo.....	26
	3.2 Microorganismos .....	26
	3.3 Drogas teste.....	26
	3.4 Teste de sensibilidade antifúngica.....	26
	3.5 Aspectos éticos .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>
	<b>ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO .....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos históricos

No ano de 1896 o estudante de medicina Benjamin Robinson Schenck relatou o primeiro caso humano de esporotricose de um paciente com lesão no dedo indicador. O isolado foi analisado pelo micologista Erwin Smith que concluiu que o microrganismo se tratava de um fungo pertencente ao gênero *Sporotrichum*. (SHENCK,1898). O segundo caso de esporotricose foi descrito no ano de 1900 por Hektoen e Perkins nos Estados Unidos. Uma criança de 5 anos de idade que lesionou o dedo batendo com um martelo, o ferimento regrediu espontaneamente. Em seguida isolaram o fungo da lesão e concluíram que se tratava do mesmo microrganismo relatado anteriormente por Schenck, denominando-o de *Sporothrix schenckii*. (HEKTOEN; PERKINS, 1900). No Brasil, o primeiro caso de esporotricose foi evidenciado no ano de 1907 por Lutz e Splendore em ratos, as lesões se localizavam nas extremidades e na cauda destes animais. As lesões assemelhavam-se a tuberculose articular e óssea no homem (LUTZ e SPLENDORE, 1907).

### 1.2 Epidemiologia

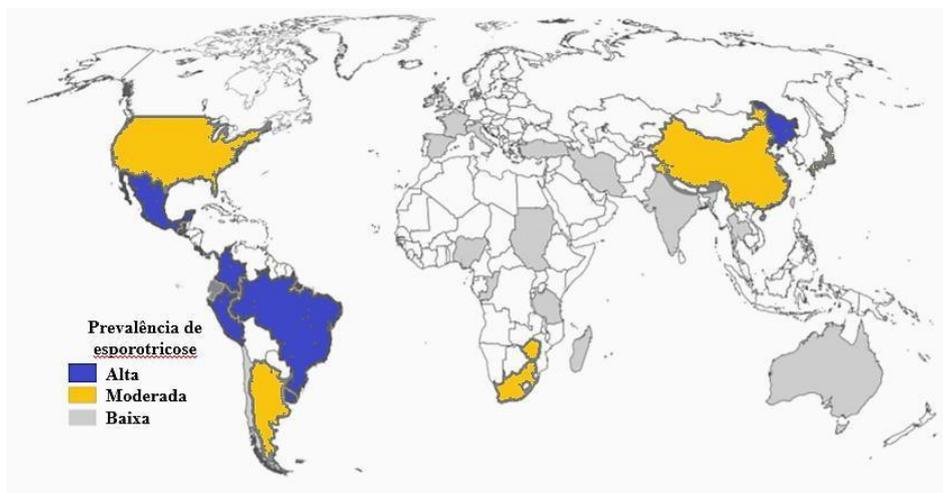
A esporotricose é uma doença que pode acometer ambos os sexos e em qualquer faixa etária, todavia os mais acometidos são indivíduos do sexo masculino, sendo relacionada principalmente a atividade laboral, pois a infecção ocorre, majoritariamente através de inoculação traumática. Os mais atingidos são trabalhadores do campo como agricultores, jardineiros, floristas, madeireiros, fazendeiros e caçadores (MAHAJAN, 2014).

A patologia é endêmica na África, na Índia, no Japão, nos Estados Unidos da América e em vários países latino-americanos como Perú, Brasil, México, Colômbia, Uruguai, Costa Rica e Guatemala (Figura 1) (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; OYARCE et al., 2016).

No Brasil, a doença está diretamente relacionada ao contato com os felinos. A transmissão zoonótica ocorre através de mordeduras ou arranhões contribuindo

essencialmente na transmissibilidade (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; OYARCE et al., 2016). As espécies de *Sporothrix* spp. variam quanto a sua distribuição geográfica. *Sporothrix brasiliensis* é uma espécie emergente restrita ao Brasil (CHAKRABARTI et al., 2015). Os indivíduos acometidos pela patologia, por muitas vezes vivem em situação de vulnerabilidade socioeconômica. A maioria dos pacientes relatam manter os felinos na residência como controle de ratos (ALMEIDA-PAES et al., 2014).

**Figura 1** - Prevalência da Esporotricose no Mundo



Fonte: Adaptado de Chakrabarti et al., 2015.

O diagnóstico dos gatos por muitas vezes é tardio, o que leva a uma rápida transmissão da micose. O destino dos animais mortos e infectados geralmente é inadequado e está ligado ao comprometimento das condições socioeconômicas dos seus tutores, que por vezes optam por enterrá-los no quintal de casa, fazendo com que a disseminação do fungo no solo alcance proporções preocupantes (RODRIGUES et al., 2014b, 2013).

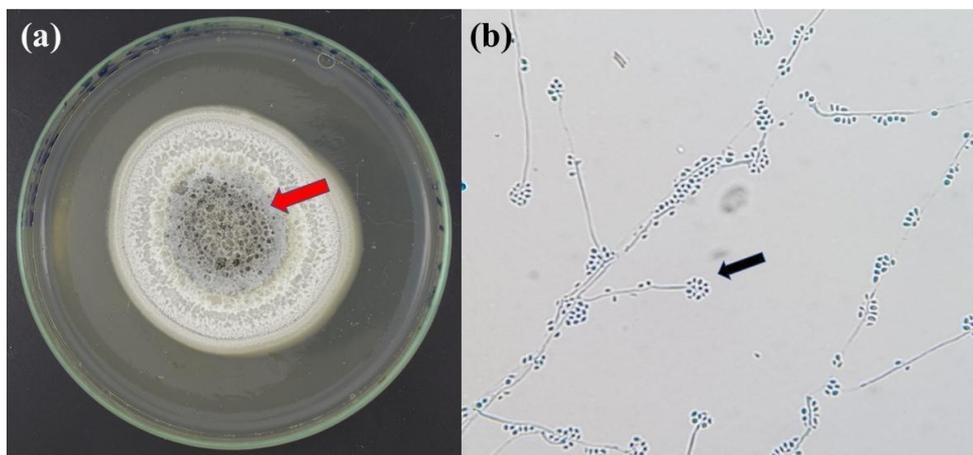
### 1.3 Patogênese

A esporotricose é caracterizada por ser uma micose crônica, que se inicia com a inoculação traumática do microrganismo gerando lesões nodulares cutâneas ou subcutâneas. Pode acometer seres humanos e várias espécies de animais, sendo muito associada a infecção zoonótica por gatos infectados (BAZZI et al., 2016). As lesões na pele podem ser ocasionadas por plantas, objetos, materiais orgânicos contaminados, por transmissão zoonótica principalmente por mordedura ou arranhões de gatos e cães, e

mais raramente inalação de conídios, sendo a última menos frequente (LOPEZ-ROMERO et al., 2011; GONÇALVES, et al., 2017).

O complexo *Sporothrix schenckii* reúne 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, em parasitismo ou *in vitro* em temperaturas próximas a 37°C, na forma leveduriforme. A forma filamentosa é composta de hifas hialinas, septadas e ramificadas. Microscopicamente são evidenciadas células conidiogênicas a partir de hifas, formando conídios piriformes, conhecidos como flor de margarida (Figura 2b) (BARROS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016).

**Figura 2** - *Sporothrix* spp. na forma filamentosa. (a) Macromorfologia em ágar batata que exhibe colônias de cor branca, com aspecto membranoso, a seta vermelha indica o centro da colônia tornando-se escurecido com o passar do tempo; (b) Micromorfologia em lactofenol azul-algodão, 400X, pode-se observar hifas e conídios nas extremidades assemelhando-se à flor de margarida (seta preta).

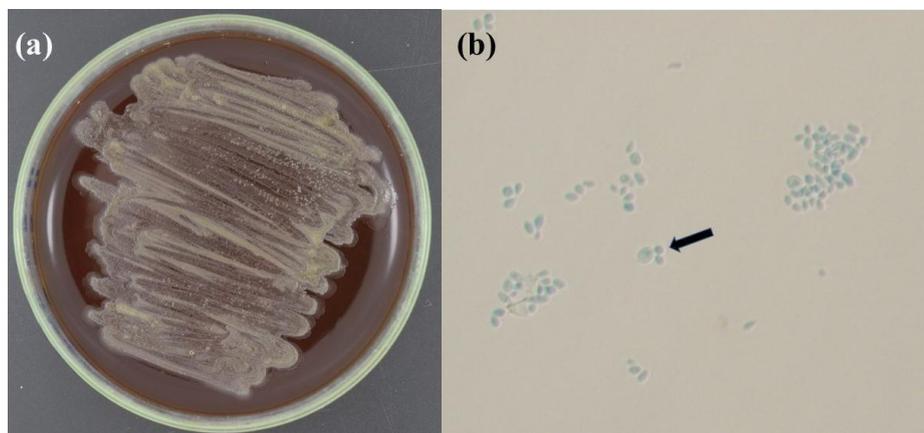


Fonte: CEMM, 2017

Após inoculação traumática do fungo na forma filamentosa, ele atinge a derme e tecido adiposo, e passa para a sua forma parasitária, leveduriforme, esse processo se inicia após 24 ou 48 h e pode levar até 13 dias (CRUZ, 2013; MAHMOUD et al., 2016). Quando a infecção é adquirida por transmissão zoonótica, o desenvolvimento da doença geralmente é mais rápido, já que o microrganismo se encontra na forma parasitária, portanto, não necessitando passar pelo processo de reversão (LOPEZ-ROMERO et al., 2011; CRUZ, 2013).

As células leveduriformes possuem vários tamanhos e formas, podendo ser redondas ou ovais, alongadas, em forma de charuto com uma base estreita (Figura 3b). Macroscopicamente, as colônias leveduriformes são de aspecto ceroso, de formato irregular e cor creme (Figura 3a) (BARROS et al., 2011; CARRADA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013).

**Figura 3** - *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme. (a) Macromorfologia em ágar BHI (*brain heart infusion*), suplementado com 5% de sangue de carneiro, que exhibe colônias de cor creme, com aspecto ceroso; (b) Micromorfologia em lactofenol azul-algodão, 400X, pode-se observar células leveduriformes com formatos arredondados e ovais. A seta preta indica blastoconídio em brotamento.



Fonte: CEMM, 2017.

Após instalada, a doença pode evoluir de forma localizada levando ao aparecimento de nódulos e úlceras, com ou sem disseminação linfática em pacientes imunocompetentes (LOPEZ-ROMERO et al., 2011; OYARCE et al., 2016; ALMEIDA-PAES et al., 2016). *S. schenckii* possui vários fatores de virulência, dentre eles se destacam: capacidade de formar biofilme *in vitro*, proteases que são enzimas extracelulares, termotolerância, as adesinas que são moléculas constituintes da parede celular e a melanina (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; MADRID et al., 2010).

#### 1.4 Formas clínicas

A doença é caracterizada pela ampla variedade de formas clínicas que vão se desenvolver de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro, sendo classificadas da seguinte forma: cutânea, entre as formas cutâneas temos a cutânea localizada,

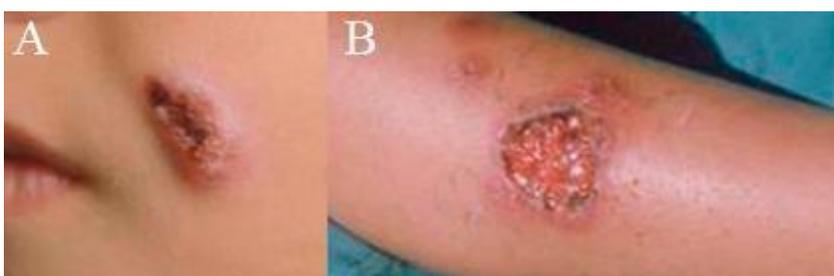
cutâneo-linfática, e cutâneo-disseminada e a forma extra cutânea. A sintomatologia varia de acordo com o estado imunológico do paciente, a carga fúngica, a profundidade da lesão, a localização do inóculo, patogenicidade e termotolerância da cepa (RODRIGUES et al., 2016; OYARCE et al., 2016).

#### 1.4.1 Formas cutâneas

##### 1.4.1.1 Cutânea localizada

A forma cutânea caracteriza-se por apresentar lesões únicas no local da inoculação, com bordas hiperemiadas e frequentemente ulcerativas e não possuem nódulos acompanhando os vasos linfáticos. As lesões podem se apresentar como pápulas que fistulizam, úlceras, placas achatadas e lesões eritemato-escamosas. É a forma clínica que predomina nas crianças que são frequentemente acometidas na face (Figura 4) (SONG et al., 2011). Esse tipo de lesão, inicialmente pode ser confundido com outras patologias do grupamento PLECT (Paracoccidioidomicose, Leishmaniose, Esporotricose, Cromoblastomicose e Tuberculose), sendo essencial o diagnóstico diferencial (BAZZI et al., 2016).

**Figura 4** - Lesões presentes na forma cutânea localizada da esporotricose, do tipo única, ulcerativa e com bordas hiperemiadas. (A e B).



Fonte: Carvalho et al. (2017) e Freitas et al. (2014).

##### 1.4.1.2 Cutâneo-linfática

É a manifestação clínica predominante da doença estando presente em 75% dos casos de esporotricose (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). Caracterizada por lesões que aparecem inicialmente no local da inoculação traumática, chamado cancro de

inoculação. Posteriormente se desenvolvem nódulos indolores ao longo dos vasos linfáticos. As lesões podem ser úlceras de base infiltrada e eritematosa, podendo também ser nódulo, pápula, placa vegetante e lesão úlcero-gomosa (Figura 5) (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

**Figura 5** - Forma linfocutânea da esporotricose com lesões nodulares (A) e ulcerativas (B) com seguimento aos vasos linfáticos.



Fonte: Carvalho et al. (2017); Freitas et al. (2014) e Mahajan (2014).

#### *1.4.1.3 Cutâneo disseminada*

Esta forma está correlacionada com algum tipo de imunocomprometimento, ou doenças associadas e geralmente é decorrente de um agravamento do quadro da forma extracutânea. Se dá pela disseminação hematogênica do fungo. Observa-se lesões que podem ulcerar após semanas ou meses, as lesões se assemelham a tuberculose cutânea. Etilismo, diabetes mellitus, corticoesteroides e pacientes HIV positivos são fatores de risco para o desenvolvimento dessa forma clínica. (SIDRIM; ROCHA, 2004; ALMEIDA-PAES et al., 2015; FREITAS et al., 2014).

#### *1.4.1.4 Formas extracutâneas*

As formas extracutâneas são consideradas raras, e de diagnóstico e tratamento difícil. Essa forma, assim como a cutâneo disseminada, estão sempre associadas a pacientes imunossuprimidos (FREITAS et al., 2014). As lesões são decorrentes da disseminação hematogênica. As manifestações clínicas variam de acordo com o órgão acometido, acompanhado de febre e comprometimento geral em alguns casos

(ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; LOPEZ-ROMERO et al., 2011). A pele e o tecido ósseo são os mais acometidos. As lesões variam de pequenos granulomas isolados ou grandes lesões com extensa destruição óssea, podendo resultar em fratura espontânea. Assemelham-se a osteomielite e a periostite (KAUFFMAN et al., 2007; ALMEIDA-PAES et al., 2014).

## 1.5 Diagnóstico

Na suspeita de esporotricose, as amostras clínicas mais utilizadas provêm de secreções, crostas e biópsias das lesões (NOBRE et al., 2001). Embora seja recomendada sempre a obtenção de amostras para cultivo microbiológico, a ausência de isolamento, não exclui a presença do fungo. E assim o histopatológico pode tornar-se uma opção viável para a confirmação da patologia (NUNES et al., 2011).

No diagnóstico micológico, é realizado o exame direto, que é feito através de preparações a fresco de espécimes clínicos tratados com hidróxido de potássio (KOH) a 10% ou hidróxido de sódio (NaOH) a 4% com o objetivo de observar as células leveduriformes do fungo. (CRUZ, 2013). Outro método utilizado é a cultura considerado padrão ouro que é simples, rápido e seguro. É obtido após semear o material clínico em Ágar Sabouraud simples, em Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e em Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. O tubo com ágar sabouraud simples é um meio que permite o crescimento de forma livre, sem a interferência de outra substância com potencial microbicida, o agar sabouraud acrescido de cloranfenicol, tem a adição do antibiótico que irá inibir o crescimento de bactérias, já a adição de cicloheximida tem a finalidade de combater os fungos anemófilos. A incubação do material é feita a temperatura de 28-30°C pelo período de 5 a 7 dias (BARROS et al., 2011; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; OYARCE et al., 2016).

Para o diagnóstico histopatológico as técnicas de escolha são a hematoxilina-eosina (HE), impregnação pela prata de Grocott, a coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS). A visualização de estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. só é possível se a amostra estiver muito rica em estruturas fúngicas (MIRANDA et al., 2009; CRUZ, 2013; OYARCE et al., 2016). Em torno de 40% dos casos onde o fungo é

encontrado, observa-se a presença de corpo asteroide, que se trata de uma estrutura eosinofílica de forma radiada constituída de complexo antígeno-anticorpo, que se deposita na superfície de alguns fungos em organismo sensibilizado (SIDRIM; ROCHA, 2004; ZHANG et al., 2011; CARRADA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013).

Outros métodos diagnósticos são o diagnóstico sorológico e diagnóstico molecular. Para o diagnóstico sorológico da esporotricose várias técnicas têm sido descritas, tais como reações de imunodifusão dupla, o teste de imunoeletroforese e o testes de aglutinação em tubo e em partículas de látex (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2005). As técnicas demonstraram valores de especificidade e sensibilidade satisfatórios. Porém, o custo elevado de equipamentos e reagentes, se tornam fatores limitantes para utilização desse tipo de diagnóstico (CRUZ, 2013). Os métodos moleculares de diagnóstico foram desenvolvidos para aprimorar o diagnóstico fúngico, mantendo ou melhorando sua especificidade, sensibilidade e precisão quanto a cultura fúngica. (OLIVEIRA et al., 2014). Sabe-se que os métodos moleculares para a detecção de *Sporothrix* spp. em DNA de espécimes clínicos, são escassos (BARROS et al., 2011) e que o fator que limita a sua utilização é o elevado custo, equipamentos e profissionais qualificados (OLIVEIRA et al., 2014).

## **1.6 Tratamento**

Devido a semelhança entre a célula hospedeira e a célula fúngica o tratamento é limitado e dificultoso, o que resulta em fármacos com estreita faixa terapêutica (MAYER; KRONSTAD, 2017). O diagnóstico tardio, o tratamento longo e a desistência dos pacientes são fatores que também dificultam o sucesso terapêutico (REIS-GOMES et al., 2012).

Para o tratamento da esporotricose são indicados vários tipos de terapêuticas, que vão desde a implementação de calor local, para a forma localizada da doença, até a utilização de fármacos, dentre eles estão, o iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina e a anfotericina B (MAHAJAN et al., 2014).

O iodeto de potássio, administrado por via oral, ainda é uma opção viável para o tratamento esporotricose nas formas cutânea localizada e cutânea linfática, usado principalmente em países em desenvolvimento devido a sua relação custo-benefício. O mecanismo de ação ainda não é bem elucidado, alguns estudos sugerem que o iodeto de potássio aumenta a proteólise, agindo nos granulomas. Outros autores afirmam ainda que este sal poderia promover aumento da fagocitose. Algumas reações adversas são frequentemente relatadas: gosto metálico, náuseas, episódios eméticos, anorexia, epigastralgia e diarreia (COSTA et. al., 2013).

O itraconazol é um antifúngico administrado por via oral, classificado como droga de primeira escolha para o tratamento das formas cutânea e linfocutânea da esporotricose (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). Pertence à classe dos azólicos, grupo de compostos sintéticos, com estruturas químicas semelhantes, que agem inibindo a enzima  $14\alpha$ -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo assim a demetilação do precursor lanosterol, que converte lanosterol em ergosterol, o principal esterol da célula fúngica. Essa propriedade dos azóis altera a função da membrana celular, aumentando a sua permeabilidade, gerando desequilíbrio osmótico e morte celular (GLUJOY et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2016).

A terbinafina é também utilizada com sucesso na forma cutânea da doença, como terapêutica alternativa nos casos em que o itraconazol não pode ser utilizado como droga de primeira escolha (MAHAJAN, 2014). 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 P-450. Sua excreção é renal (80%). Administrado por via oral. (MAHAJAN, 2014).

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico, disponível principalmente para ser administrado por via endovenosa. Seu mecanismo de ação consiste na sua ligação ao ergosterol, presente na membrana da célula fúngica, produzindo poros que levam ao aumento da permeabilidade da membrana, e conseqüentemente uma grande perda de pequenas moléculas e eletrólitos do meio intracelular, principalmente o potássio, que altera a homeostase do micro-organismo, levando a morte celular (SIDRIM; ROCHA, 2004; MAHAJAN, 2014).

A miltefosina é um análogo fosfolipídico, pertencente a classe dos antineoplásicos. Foi inicialmente desenvolvida como uma droga antitumoral, e no início da década de 1980, foi demonstrado que esta possui atividade antiparasitária (DORLO et al., 2012). Recentes estudos, têm demonstrado que a miltefosina também possui atividade antifúngica, *in vitro*, frente a espécies de fungos dimórficos, tais como *Paraccoccidioidis* spp., *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix* spp., nas formas filamentosas e leveduriforme (BRILHANTE et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2015; BORBA-SANTOS et al., 2016a; ROSSI et al., 2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade planctônica de espécies do complexo *S. schenckii* na forma leveduriforme à miltefosina e iodeto de potássio.

### 2.2 Objetivo(s) específico(s)

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM), *in vitro*, da miltefosina (MIL) frente a cepas do complexo *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme.
- Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* dos antifúngicos clássicos: itraconazol (ITC) e anfotericina B (AMB) frente a cepas do complexo *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme.
- Comparar a atividade antifúngica da miltefosina (MIL) com o iodeto de potássio (KI) e os antifúngicos clássicos: itraconazol (ITC) e anfotericina B (AMB).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Local e tipo do estudo**

Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental, com abordagem quantitativa. A pesquisa foi executada no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### **3.2 Microrganismos**

Para o estudo foram utilizadas um total de 18 cepas na forma leveduriforme pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, as cepas foram obtidas na forma filamentosa, tendo que passar pelo processo de reversão *in vitro* para obtê-las na forma leveduriforme. Sendo *S. brasiliensis* (n=10), *S. mexicana* (n=4), *S. schenckii stricto sensu* (n=2) e *S. globosa* (n=2). Todos pertencentes a Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará.

#### **3.3 Drogas teste**

Usou-se a formulação comercial de miltefosina (MIL) (Sigma Chemical Corporation, EUA), e iodeto de potássio (KI) ambos diluídos em água estéril, preparadas conforme recomendações do fabricante, estocadas a -20°C e testados nas concentrações de 0,0313-16 µg/mL. Anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Corporation, EUA) e Itraconazol (ITC) (Janssen Pharmaceutica, Bélgica) foram incluídas como drogas controle, e foram testadas nas concentrações de 0,0313 a 16 µg/mL. As diluições seriadas foram preparadas em RPMI conforme metodologia M27-A3 do *Clinical and Laboratory Science Institute* (CLSI).

#### **3.4 Teste de Sensibilidade Antifúngica**

Os ensaios de sensibilidade foram realizados com base no método de microdiluição em caldo em placas com 96 poços, baseado no documento M27-A3 para leveduriforme (CLSI, 2008b), com adaptações. O ensaio de sensibilidade planctônica foi executado com a finalidade de obtermos os valores de concentração inibitória mínima (CIM). Os inóculos, foram feitos em solução salina, e ajustado na escala 1 de McFarland. Em seguida, foram feitas diluições em RPMI (Sigma Chemical Corporation, EUA), para ajuste final do inóculo, com as concentrações 1 a  $5 \times 10^3$  UFC/mL. As amostras foram

#### 4. RESULTADOS

Os dados de sensibilidade das cepas na forma planctônica estão descritos na Tabela 1. Todas as cepas do complexo *Sporothrix schenckii* foram inibidas pelas drogas miltefosina e iodeto de potássio. Para a forma leveduriforme, obtivemos os seguintes valores de CIM: 62,5 a 125 mg/mL para KI; 0,125 a 2 µg/mL para MIL; 0,125 a 1 µg/mL para ITC; 0,0312 a 1 µg/mL para AMB. E foram evidenciados os seguintes valores significativos de inibição do KI na CIM, com KI>AMB, ITC e MIL ( $p<0,0001$ ), para CIM80 e CIM50, com o KI>ITC e MIL ( $p<0,0001$ ).

**Tabela 1** - Atividade antifúngica, *in vitro*, da anfotericina B (AMB), itraconazol (ITC), miltefosina (MIL) e iodeto de potássio (KI), frente a cepas do complexo *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme.

Espécie	Concentração Inibitória Mínima das Drogas (µg/mL)										
	AMB	ITC			MIL			KI			
	100%	100%	80%	50%	100%	80%	50%	100%	80%	50%	
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=10)		0,125(2)	0,25(3)	0,0625(2)	0,0312(2)	0,25(1)	0,0625(2)	0,0312(2)	62500(3)	31250(3)	15620(3)
		0,250(4)	0,5(7)	0,125(3)	0,0625(3)	0,5(3)	0,25(3)	0,125(4)	125000(7)	62500(7)	31250(7)
	LEV	0,5(2)		0,250(5)	0,125(5)	1(4)	0,5(3)	0,25(2)			
		1(2)	0,25(3)	0,0625(2)	0,0312(2)	2(2)	1(2)	0,5(2)			
<i>Sporothrix schenckii stricto sensu</i> (n=2)		0,0625(2)	0,25(1)	0,125(1)	0,0625(1)	0,125(1)	0,0625(1)	0,0312(1)	125000(2)	62500(2)	31250(2)
	LEV		0,5(1)	0,25(1)	0,125(1)	0,25(1)	0,125(1)	0,0625(1)			
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)		0,125(1)	0,25(2)	0,125(2)	0,0625(2)	0,5(2)	0,25(2)	0,125(2)	62500(1)	31250(1)	15620(1)
	LEV	0,25(1)	0,5(1)	0,25(1)	0,125(1)	1(2)	0,5(2)	0,25(2)	125000(3)	62500(3)	31250(3)
		0,5(2)	1(1)	0,5(1)	0,25(1)						
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)		0,0312(1)	0,125(1)	0,0625(2)	0,0312(2)	0,25(2)	0,125(2)	0,0625(2)	62500(2)	31250(2)	15620(2)
	LEV	0,25(1)	0,25(1)	0,125(1)	0,0625(1)						

Cepas controle: *Candida krusei* (ATCC 6258) (AMB: 1 µg/mL; ITC: 0,25 µg/mL; MIL: 1 µg/mL; KI: 16 µg/mL); *C. parapsilosis* (ATCC 22019) (AMB: 1 µg/mL, ITC: 0,25 µg/mL, MIL: 1 µg/mL, KI: 16 µg/mL). LEV: levedura.



## 5. DISCUSSÃO

A esporotricose é a micose subcutânea mais comum no mundo, é ocasionada por fungos dimórficos, pertencentes ao complexo *S. schenckii*. As espécies patogênicas que compõem o complexo *Sporothrix schenckii*, são: *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, *S. schenckii stricto sensu*, *S. luriei* e *S. pallida* (CARRASCO-ZUBER et al., 2016; GONÇALVES et al., 2017). Quatro espécies estão mais relacionadas com os casos de esporotricose humana e animal. *S. brasiliensis* e *S. schenckii stricto sensu* são as mais relacionadas a infecção humana e a transmissão zoonótica, classificadas como mais virulentas e são as espécies mais prevalentes em casos de esporotricose no Brasil (RODRIGUES et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2016b).

Neste estudo, avaliamos a sensibilidade planctônica de *Sporothrix* spp., ou seja, a sua forma de vida livre. Embora saibamos que já foi demonstrado em estudos anteriores que este microrganismo possui a capacidade de formar biofilme *in vitro*. Obtivemos as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das cepas planctônicas através da execução dos testes de sensibilidade antifúngica, conforme o documento M38-A2 do CLSI. O objetivo final do teste de sensibilidade antifúngica *in vitro*, é entender como seria possivelmente a resposta do paciente ao tratamento, levando em consideração que a resposta clínica depende de vários fatores. (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

A *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) e o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) são organizações internacionais que normatizam os testes de sensibilidade aos antifúngicos, objetivando a concordância dos laboratórios na padronização destes testes. As divergências entre as normas das duas organizações, têm gerado discussões em vários momentos, ainda assim seus resultados são seguros e amplamente difundidos em todo o mundo. (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

Com relação a miltefosina, verificou-se que esta possui efeito inibitório frente a todas as cepas testadas na forma leveduriforme, corroborando com os estudos de Brilhante et al. (2014) e Borba-Santos et al. (2015). Quando comparada com a drogas controles AMB e ITC os testes em cepas planctônicas apresentam valores de inibição semelhantes entre essas drogas. Apesar da MIL não ter o mecanismo de ação bem definido, já foi descrita como indutora de alterações na constituição lipídica da

membrana celular, fluidez e permeabilidade, o que poderia induzir a distúrbios nas vias de sinalização dependentes de lipídios como observado em *Leishmania* e nas células cancerígenas humanas tratadas com miltefosina (BRILHANTE, 2018).

O mecanismo de ação do iodeto de potássio ainda não é bem esclarecido, mas em outros estudos verificou-se que nos blastoconídios de *Sporothrix* spp. expostos ao KI, *in vitro*, houve redução na taxa de brotamento da levedura, assim como a lise celular, seguida da liberação de enzimas lisossomais (BRILHANTE, 2018).

Embora o KI ainda seja uma boa opção terapêutica no tratamento da esporotricose, é perceptível que a sua ação inibitória frente as cepas do complexo *Sporothrix* spp. Sua utilização depende de doses superiores a drogas clássicas como a AMB e o ITC, contribuindo para confirmação da sua boa eficácia; a MIL se apresenta como uma droga a ser considerada para o tratamento da esporotricose, necessitando de estudos *in vivo*, mas com resultados positivos quando comparamos o seu desempenho com ao da AMB e ao do ITC *in vitro*.

## 6. CONCLUSÃO

- Todas as cepas de *Sporothrix schenckii* foram inibidas pela Miltefosina e Iodeto de Potássio comprovando sua atividade antifúngica *in vitro*.
- O Iodeto de potássio apresentou efeito inibitório significativo com doses superiores as demais drogas estudadas na forma planctônica de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme.
- A MIL apresentou efeito inibitório semelhante aos da AMB e aos do ITC para a forma planctônica de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme

## 7. REFERÊNCIAS

AIDÉ, M.A. Histoplasmosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, p. 1145-1151, 2009.

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, 2014.

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.

BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p.633-654, 2011.

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

BERGER, B. A.; COSSIO, A.; SARAVIA, N. G.; DEL MAR CASTRO, M.; PRADA, S.; BARTLETT, A. H.;PHO, M. T. Cost-effectiveness of meglumine antimoniate versus miltefosine caregiver dot for the treatment of pediatric cutaneous leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005459, 2017.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; OROFINO COSTA, R. C.; MIGUENS, B. P.; PENHA, C. L.; NEVES, E.; PEREIRA, B. S.; DIAS, C. M. P.; MATTOS, M.; GUTIERREZ, M. C.; SCHUBACH, A.; OLIVEIRA NETO, M. P.; LOPES-BEZERRA, L. M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 43, n. 6, p. 487-493, 2005.

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.; GAGINI, T.; ISHIDA, K.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 415-422, 2015.

BORBA-SANTOS, L. P.; ISHIDA, K.; CALOGEROPOULOU, T.; SOUZA, W. D. ROZENTAL, S. Adamantylidene-substituted alkylphosphocholine TCAN26 is more active against *Sporothrix schenckii* than miltefosine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 523-527, 2016a.

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

BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, M. L. Q.; PEREIRA, V. S.; OLIVEIRA, J. S.; MACIEL, J. M.; SILVA, I. N. G.; GARCIA, L. G. S.; GUEDES, G. M. M.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO, D. D. S. C.; ROCHA, M. F. G.; Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Medical Mycology**, 2018.

CAPPELLI, G.; RICARDI, M.; RAVERA, F.; LIGABUE, G.; BALLESTRI, M.; BONUCCHI, D.; BONDI, M. Biofilm on artificial surfaces. *Contrib Nephrol*, v. 154, p. 61-71, 2007.

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.

CARRASCO-ZUBER, J. E.; NAVARRETE-DECHENT, C.; BONIFAZ, A.; FICH, F.; VIAL-LETÉLIER, V.; BERROETA-MAURIZIANO, D. Cutaneous Involvement in the Deep Mycoses: A Literature Review. Part I—Subcutaneous Mycoses. **Actas Dermosifiliográficas (English Edition)**, v. 107, n. 10, p. 806-815, 2016.

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.

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

COSTA FILHO, A. V.; LUCAS, Í. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 424-7, 2008.

CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Revista veterinária Zootecnia**, 20ª (Edição Comemorativa), p. 08-28, 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. 3110, 2014.

GLUJOY, M.; SALERNO, C.; BREGNI, C.; CARLUCCI, A. M. Percutaneous drug delivery systems for improving antifungal therapy effectiveness: A review.

**International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 8-16, 2014.

GONÇALVES, A. C.; FERREIRA, L. S.; MANENTE, F. A.; FARIA, C. M. Q. G.; POLESI, M. C.; ANDRADE, C. R.; ZAMBONI, D. S.; CARLOS, I. Z. The NLRP3 inflammasome contributes to host protection during *Sporothrix schenckii* infection. **Immunology**, v. 151, n. 2, p. 154-166, 2017.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 1, p. 77, 1900.

HIRUMA, M.; KAGAWA, S. Ultrastructure of *Sporothrix schenckii* treated with iodine-potassium iodide solution. **Mycopathologia**, v. 97, n. 2, p. 121-127, 1987.

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.

KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P. G. Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 10, p. 1255–1265, 2007a.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc*, v.78, n.2, p.293-308, 2006.

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

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: Contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica**

**de São Paulo**, v. 21, p. 443-450, 1907.

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 therapeutical options. *Dermat Res Pract*, v. 2014, 13p, 2014.

MAHMOUDI, S.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P.; SAFARA, M.; HEIDARI, M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. **Medical Mycology**, p. 06, 2016.

MAYER, F. L.; KRONSTAD, J. W. Discovery of a Novel Antifungal Agent in the Pathogen Box. **mSphere**, v. 2, n. 2, p.120-17, 2017.

MIRANDA, L. H. M.; QUINTELLA, L. P.; DOS SANTOS, I. B.; MENEZES, R. C.; FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001–2007). **Mycopathologia**, v. 168, n. 2, p. 79-87, 2009.

MUNIZ, A.S; PASSOS, J.P; Esporotricose humana: conhecendo e cuidando em enfermagem. *Rev. enferm. UERJ*, v. 17, n. 2, p. 268-72, 2009.

NOBRE, M. O.; POTTER-DE-CASTRO, A.; CAETANO, D.; LEONARDO-DE-SOUZA, L.; ARAUJO-MEIRELES, M. C. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, n. 3, p. 137-140, 2001.

NUNES, G. D. L.; CARNEIRO, R. S.; FILGUEIRA, K. D.; FILGUEIRA, F. G. F.; FERNANDES, T. H. T. Esporotricose felina no município de Itaporanga. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia**, v. 14, n. 2, p. 157-161, 2011.

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.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1, 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. **Revista Chilena de Infectología**, v. 33, n. 3, p. 315-321, 2016.

PIERCE, C.G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A.R.; WORMLEY, F.L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.

REED, K.D.; MOORE, F.M.; GEIGER, G.E.; STEMPER, M.E. Zoonotic Transmission of Sporotrichosis: Case Report and Review. *Clin Infect Dis*, v.16, p.384-387, 1993.

REIS, R. S., ALMEIDA-PAES, R., MUNIZ, M. M., TAVARES, P. M., MONTEIRO, P. C., SCHUBACH, T. M., GUTIERREZ-GALHARDO, M. C., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in 55 the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 769-774, 2009.

REIS-GOMES, A. R.; 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 Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 272-284, 2012.

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.; 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 Biology**, v. 120, n. 2, p. 246-264, 2016.

ROSSI, D. C. P.; DE CASTRO SPADARI, C.; NOSANCHUK, J. D.; TABORDA, C. P.; ISHIDA, K. Miltefosine is fungicidal to *Paracoccidioides* spp. yeast cells but subinhibitory concentrations induce melanisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 4, p. 465-471, 2017.

SCHENCK, B. R.; WANTZ, G. E. **On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the Sporotricha**. Johns Hopkins Press, 1898.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, p. 177-188, 2004.

SONG, Y.; YAO, L.; ZHONG, S. X.; TIAN, Y. P.; LIU, Y. Y.; LI, S. S. Infant sporotrichosis in northeast China: a report of 15 cases. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 5, p. 522-529, 2011.

TORRES-MENDOZA, B. M., VÁZQUEZ-VALLS, E., & GONZÁLEZ-MENDOZA, A. Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 14, p. 98-100, 1997.

YEGNESWARAN, P.P.; SRIPATHI, H.; BAIRY, I.; LONIKAR, V.; RAO, R.; PRABHU, S. Zoonotic Sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. *Int J Dermatol*, v.48, n.11, p.1198-1200, 2009.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; FREITAS, D. F. S.; DE OLIVEIRA, M. M. E.; GALHARDO, M. C. G.; DE ALMEIDA-PAES, R. **New diagnostic applications in**

**sporotrichosis**. INTECH Open Access Publisher, 2011.

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.

## ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO



*Medical Mycology*, 2018, 0, 1–9  
doi: 10.1093/mmy/myy119  
Advance Access Publication Date: 0 2018  
Original Article



## Original Article

## Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante<sup>1</sup>, Maria Lucilene Queiroz da Silva<sup>1</sup>, Vandbergue Santos Pereira<sup>1</sup>, Jonathas Sales de Oliveira<sup>1</sup>, Juliana Maria Maciel<sup>1</sup>, Isaac Neto Goes da Silva<sup>2</sup>, Lana Glerieide Silva Garcia<sup>1</sup>, Glaucia Morgana de Melo Guedes<sup>1</sup>, Rossana de Aguiar Cordeiro<sup>1</sup>, Waldemiro de Aquino Pereira-Neto<sup>1</sup>, Zoilo Pires de Camargo<sup>3</sup>, Anderson Messias Rodrigues<sup>3</sup>, José Júlio Costa Sidrim<sup>1,\*</sup>, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco<sup>1</sup> and Marcos Fábio Gadelha Rocha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, <sup>2</sup>School of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil and <sup>3</sup>Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, SP, Brazil

\*To whom correspondence should be addressed. Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, Rua Coronel Nunes de Melo, 1315 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE, 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil. Tel: +55 85 3366-8303; E-mail: [jcsidrim@gmail.com](mailto:jcsidrim@gmail.com).

Received 10 August 2018; Revised 10 October 2018; Accepted 22 October 2018; Editorial Decision 14 October 2018

### Abstract

This study aimed to evaluate the yeast biofilm growth kinetics and ultrastructure of *Sporothrix schenckii* complex and assess their mature biofilm susceptibility in filamentous and yeast forms to potassium iodide (KI) and miltefosine (MIL). Yeast biofilms were evaluated by crystal violet staining, XTT reduction assay and microscopic techniques. Susceptibility of planktonic and sessile cells was analyzed by broth microdilution. *S. schenckii* complex in yeast form produced biofilms, with an optimum maturation at 96 h, showing multilayered blastoconidia embedded in extracellular matrix. KI and MIL minimum inhibitory concentration (MIC) ranges against planktonic cells were 62,500–250,000 µg/ml and 0.125–4 µg/ml, respectively. KI and MIL reduced biofilm metabolic activity by 75.4% and 67.7% for filamentous form and 55.1% and 51.6% for yeast form, respectively. This study demonstrated that *S. schenckii* complex forms biofilms *in vitro*, and potassium iodide and miltefosine inhibit *Sporothrix* spp. biofilms in both filamentous and yeast forms.

**Key words:** *Sporothrix*, potassium iodide, miltefosine, susceptibility, biofilm.

### Introduction

Sporotrichosis, a cosmopolitan disease caused by species of the *Sporothrix schenckii* complex, is the most frequent subcutaneous mycosis in Latin America, with high incidence in Brazil, especially in the state of Rio de Janeiro.<sup>1,2</sup> The pathogenicity of *Sporothrix* spp. is associated with virulence factor production, such as extracellular enzymes and the presence of melanin granules.<sup>3,4</sup> In addition, the biofilm-forming ability of isolates of

this species complex in filamentous form has previously been shown.<sup>5,6</sup>

Biofilm is one of the most common forms of microbial growth, which occurs after cell adhesion to a substrate and multiplication and production of extracellular matrix, providing protection against environmental stressors.<sup>7</sup> In the host, biofilms are considered important virulence factors, since they may participate in the development of infection, conferring resistance to immune