



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

XHAULLA MARIA QUARIGUASI CUNHA FONSECA

**EFEITO INIBITÓRIO DE ESTATINAS *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Sporothrix*
*schenckii***

FORTALEZA

2020

XHAULLA MARIA QUARIGUASI CUNHA FONSECA

EFEITO INIBITÓRIO DE ESTATINAS *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Sporothrix*
schenckii

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha da Rocha

FORTALEZA

2020

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)

F748e Fonseca, Xhaulla Maria Quariguasi Cunha.
EFEITO INIBITÓRIO DE ESTATINAS IN VITRO SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES
DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii* / Xhaulla Maria Quariguasi Cunha Fonseca. – 2021.
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

1. *Sporothrix* spp.. 2. Estatinas. 3. Antifúngicos. 4. Biofilme. I. Título.

CDD 616.9

XHAULLA MARIA QUARIGUASI CUNHA FONSECA

EFEITO INIBITÓRIO DE ESTATINAS *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Sporothrix*
schenckii

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

Aprovado em:29/01/2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

À Deus acima de tudo.

A minha mãe, Mirian, e meu irmão, Arthur, pela
base e incentivo.

Aos meus amigos que colaboraram nessa
caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças durante toda essa caminhada.

À minha mãe, Mirian, por ser um grande exemplo de mulher, de dedicação, de resiliência, de perseverança, com a qual aprendi um grande ensinamento, que foi valorizar o estudo.

Ao meu pai de coração, Raimundo Silvino, por todo seu apoio e carinho dedicado a mim.

Aos meus avôs, Franco e Conceição, por ser meu exemplo de família e honestidade, de quem guardo as melhores lembranças.

Ao meu irmão, Arthur, por fazer parte da minha vida e sempre demonstrar ter orgulho da minha caminhada.

Aos amigos que foram essenciais nessa caminhada, pois sem a ajuda deles eu não teria me formado em ciências biológicas, que foi o primeiro degrau para realizar o sonho de ingressar no mestrado. Dentre eles, o Tadeu, o primeiro a acreditar nos meus sonhos e me dar forças quando decidi sair de Sobral e tentar a seleção aqui, me ajudando no que pode para que isso fosse possível. Ao Ruliglésio Rocha e ao Doutor César Barroso por terem me repassado seus ensinamentos e me preparado para esse mundo da microbiologia.

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

À professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante pelo voto de confiança e pelo acompanhamento durante esse árduo e gratificante período de aprendizagem. Por me orientar e dividir seu conhecimento com paciência e dedicação.

Ao professor Marcos Fábio Gadelha Rocha, por sua grande contribuição como co-orientador, sempre disposto a ajudar através de suas correções e idéias para o aprimoramento deste trabalho.

Aos participantes da banca, Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá e Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, pelo tempo, disponibilidade e valiosas colaborações.

Aos professores José Júlio da Costa Sidrim, Rossana de Aguiar Cordeiro e Débora Castelo-Branco por todo apoio durante essa jornada de pós-graduação.

Aos professores do PPGMM, por todo aprendizado, meu muito obrigada.

À Carol, secretária do PPGMM, por sua compreensão e por fazer o possível para nos ajudar. Obrigada por todo apoio dado a mim desde o primeiro dia que vim fazer minha inscrição no programa até hoje.

À Terezinha de Jesus Rodrigues e a Gláucia Morgana, por cuidarem tão bem de todos e por se dedicarem ao CEMM, mantendo a organização e funcionamento deste lugar de forma descontraída e responsável.

À Géssica Araújo, por ser minha grande companheira de bancada, que viveu do meu lado todas as angústias, surpresas, tristezas e alegrias, sempre procurando soluções e tentando me manter calma nos momentos de desespero. Você é uma fortaleza, saiba que tenho grande admiração por você e sou extremamente grata por todo carinho e apoio.

Aos grandes amigos que fiz durante esse período que passei no CEMM e que sempre farão parte da minha vida. À Gerlane por ser um grande apoio, por conversar comigo no olhar e estar presente dos momentos bons até os mais difíceis, uma levantando a moral da outra, sempre mostrando o quanto a vida nos fez forte. Ao Wilker e ao Alexandre por trazer alegria aos meus dias. Ao Renan, por ter trazido leveza com toda sua irreverência e cabelos coloridos aos nossos dias corridos e por vezes pesados. A Lívia e Fernando por serem uma grata surpresa, sempre acolhedores e dispostos a ajudar no que fosse preciso.

Ao Vandbergue e ao Jonathas Sales, por terem compartilhado suas experiências e ensinamentos. Muito obrigada por cada diálogo e por estarem abertos a tentar resolver meus questionamentos.

Aos colegas e amigos que conheci nos últimos dois anos no CEMM, meu muito obrigada, é sempre bom estar na companhia de vocês dividindo conhecimentos e experiências, vocês tornaram essa jornada mais leve, contribuindo de uma forma ou de outra para a consolidação desse momento.

Meu muito obrigado a todos.

“Faz da sua vida um sonho, e do seu sonho uma realidade”. (Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A esporotricose é uma doença subcutânea causada por fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, na qual são usadas drogas antifúngicas, como iodeto de potássio, anfotericina B, itraconazol e terbinafina. A toxicidade e o surgimento de cepas com baixa sensibilidade a essas drogas têm estimulado a expansão do arsenal terapêutico da esporotricose. Nesse contexto, as estatinas são drogas que atuam como redutoras de colesterol possuindo potencial atividade antimicrobiana. Diante do alto custo no desenvolvimento de novas drogas, o reposicionamento de fármacos tem sido uma alternativa, sendo uma estratégia aplicável à expansão do arsenal terapêutico da esporotricose. Diante disso, foi avaliada a atividade antifúngica de sinvastatina, atorvastatina e pravastatina sobre as formas planctônicas e biofilmes de espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Aliado a análise supracitada, foram avaliadas a interação da pravastatina com anfotericina B, itraconazol e terbinafina. Para tanto, foram utilizadas 18 cepas de *Sporothrix* spp. (08 *S. brasiliensis*, 04 *S. globosa*, 02 *S. mexicana* e 04 *S. schenckii stricto sensu*) neste estudo. A sensibilidade planctônica das formas filamentosas e leveduriformes de *Sporothrix* spp. foi avaliada por métodos de microdiluição em caldo segundo os documentos M38-A2 e M27-A3, respectivamente. Os biofilmes formados das formas filamentosas desses fungos foram expostos a sinvastatina, atorvastatina, pravastatina e a atividade metabólica deles mensurada por ensaio colorimétrico de redução de XTT. Assim, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das estatinas variaram de 8 a 512 µg/mL para a forma filamentosa e de 8 a 256 µg/mL para a forma leveduriforme. As CIMs capazes de inibir 50% e 90% (CIMB₅₀ e CIMB₉₀) do crescimento dos biofilmes expostos às estatinas foram de 128 < CIMB₅₀ > 2048 µg/mL e 512 < CIMB₉₀ > 2048 µg/mL de sinvastatina, respectivamente; de 128 < CIMB₅₀ > 512 µg/mL e CIMB₉₀ > 2048 µg/mL de atorvastatina, respectivamente; e CIMB₅₀ > 2048 µg/mL e CIMB₉₀ > 2048 µg/mL de pravastatina. Além disso, a pravastatina apresentou interações indiferentes com anfotericina B, itraconazol e terbinafina. Por fim, sinvastatina, atorvastatina e pravastatina apresentaram atividade antifúngica sobre células planctônicas de *Sporothrix* spp. nas formas filamentosas e leveduriformes. Ademais, sinvastatina e atorvastatina inibiram biofilmes da forma filamentosa de *Sporothrix* spp. Estes resultados destacam o potencial antifúngico das estatinas, em destaque, sinvastatina e atorvastatina.

Palavras-chave: *Sporothrix* spp. Estatinas. Antifúngicos. Biofilme.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous disease caused by dimorphic fungi belonging to the *Sporothrix schenckii* species complex, which antifungal drugs such as amphotericin B, itraconazole and terbinafine are used for treatment, however the toxicity and emergence of strains with low susceptibility to these drugs have stimulated the expansion of the sporotrichosis therapeutic arsenal. In this context, the statins are cholesterol-lowering drugs that have potential antimicrobial activity. Regarding the high cost of developing drugs, their repositioning has been an alternative and it is a strategy applicable to the expansion of the sporotrichosis therapeutic arsenal. Therefore, the antifungal activity of simvastatin, atorvastatin and pravastatin on planktonic cells and biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex was evaluated. In addition, the interaction of pravastatin with amphotericin B, itraconazole and terbinafine was also evaluated. Eighteen strains of *Sporothrix* spp. (08 *S. brasiliensis*, 04 *S. globosa*, 02 *S. mexicana* and 04 *S. schenckii stricto sensu*) were used in this study. Therefore, the planktonic susceptibility of the filamentous and leveruriform forms of *Sporothrix* spp. was evaluated by broth microdilution method. The biofilms formed from the filamentous forms of these fungi were exposed to statins and their metabolic activity measured by XTT reduction colorimetric assay. Thus, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of statins ranged from 8 to 512 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for filamentous forms and from 8 to 256 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for yeast forms, respectively. MICs capable of inhibiting 50% and 90% (BCIM₅₀ and BMIC₉₀) of statin-exposed biofilm growth were 128 < BCIM₅₀ > 2048 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and 512 < BMIC₉₀ > 2048 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively; 128 < BCIM₅₀ > 512 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and BMIC₉₀ > 2048 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for atorvastatin, respectively; and BCIM₅₀ > 2048 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and BMIC₉₀ > 2048 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for pravastatin. In addition, pravastatin showed indifferent interactions with amphotericin B, itraconazole or terbinafine. Finally, simvastatin, atorvastatin and pravastatin showed antifungal activity on planktonic cells of *Sporothrix* spp. in filamentous and yeast forms. In addition, simvastatin and atorvastatin inhibited biofilms of the filamentous form of *Sporothrix* spp.. These results highlight the antifungal and antibiofilm potential of statins, in particular simvastatin and atorvastatin.

Keywords: *Sporothrix* spp. Statin. Antifungals. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Prevalência de esporotricose no mundo.....	23
Figura 2 –	Casos de esporotricose felina e humana por transmissão zoonótica no mundo de 1952 a 2016.....	23
Figura 3 –	Relações filogenéticas entre os clados clínicos e ambientais em <i>Sporothrix</i> , com base nas sequências de calmodulina	27
Figura 4 –	Macromorfologia e micromorfologia de <i>Sporothrix</i> spp.....	29
Figura 5 –	Representação do ciclo de formação de um biofilme.....	34
Figura 6 –	Biofilmes de <i>Sporothrix</i> filamentoso (A-C) e leveduriforme (D-F).....	35
Figura 7 –	Formas clínicas da esporotricose.....	37
Figura 8 –	Forma cutânea disseminada da esporotricose.....	38
Figura 9 –	Achado histológico de corpos asteroides.....	40
Figura 10 –	Biossíntese do ergosterol e do colesterol.....	46
Figura 11 –	Fluxograma dos experimentos realizados.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Cepas de espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> utilizadas neste estudo.....	51
Tabela 2 –	Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de estatinas frente a espécies do complexo <i>S. schenckii</i> na forma filamentosa...	57
Tabela 3 –	Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima dos antifúngicos frente a espécies do complexo <i>S. schenckii</i> na forma filamentosa.....	58
Tabela 4 –	Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de estatinas frente a espécies do complexo <i>S. schenckii</i> na forma leveduriforme.....	60
Tabela 5 –	Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima dos antifúngicos frente a espécies do complexo <i>S. schenckii</i> na forma leveduriforme.....	61
Tabela 6 –	Índice de concentração inibitória fracionada de pravastatina e antifúngicos frente <i>Sporothrix</i> spp. na forma filamentosa.....	63
Tabela 7 –	Concentrações inibitórias mínimas de estatinas e antifúngicos para biofilmes de espécies complexas de <i>S. schenckii</i> em forma filamentosa.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>aids</i>	<i>Acquired immuno deficiency syndrome</i>
AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATO	Atorvastatina
<i>BHI</i>	<i>Brain heart infusion</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CFM	Concentração fungicida mínima
<i>CHS1</i>	<i>Chitinsynthase 1</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima em biofilme
<i>CLSI</i>	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>DNA</i>	<i>Deoxy ribonucleic acid</i>
DO	Densidade Óptica
<i>DRK1</i>	<i>Dimorphism-regulating kinase 1</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FF	Forma filamentosa
FL	Forma leveduriforme
HE	Hematoxilina-eosina
<i>HIV</i>	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMG-Coa	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
ITC	Itraconazol
KOH	Hidróxido de potássio
L-DOPA	3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina
M27-A3	Metodologia 27 - Atualização 3
MEC	Matriz Extracelular Polimérica
MG	Média geométrica
MOPS	Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico
NaOH	Hidróxido de sódio

PAS	Ácido periódico Schiff
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRA	Pravastatina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s. l.	<i>Sensu lato</i>
s. str.	<i>Stricto sensu</i>
SIN	Sinvastatina
SNC	Sistema Nervoso Central
TRB	Terbinafina
UFC	Unidade formadora de colônia
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-5-[carbonilofenilamino]-2-tetrazóliohidróxido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Histórico da esporotricose.....	19
2.2	Epidemiologia da esporotricose.....	20
2.3	Taxonomia.....	25
2.4	Aspectos morfológicos e ecológicos de <i>Sporothrix schenckii sensu lato</i> ...	28
2.5	Fatores de virulência do complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	30
2.5.1	<i>Biofilme</i>	32
2.6	Patogenia.....	35
2.7	Aspectos clínicos da esporotricose.....	36
2.8	Diagnóstico da esporotricose.....	38
2.9	Abordagem terapêutica.....	42
2.10	Estatinas.....	45
3	HIPÓTESES.....	48
4	OBJETIVOS.....	49
4.1	Objetivo Geral.....	49
4.2	Objetivos Específicos.....	49
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.1	Local do estudo.....	50
5.2	Micro-organismos.....	50
5.3	Fluxograma dos experimentos.....	52
5.4	Estatinas e drogas antifúngicas.....	52
5.5	Teste de sensibilidade antifúngica	53
5.6	Interação da pravastatina com antifúngicos sobre células planctônicas de <i>Sporothrix spp.</i>	54
5.7	Formação de biofilmes.....	54
5.8	Efeito das estatinas sobre os biofilmes de <i>Sporothrix spp.</i>	54
5.9	Análises estatísticas.....	55
6	RESULTADOS.....	56
6.1	Sensibilidade planctônica de <i>Sporothrix spp.</i>	56

6.2	Interação de pravastatina e antifúngicos sobre <i>Sporothrix</i> spp. na forma filamentosa.....	62
6.3	Efeito das estatinas sobre biofilmes de <i>Sporothrix</i> spp.....	64
7	DISCUSSÃO.....	66
8	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção subcutânea causada por fungos dimórficos pertencentes ao complexo de espécies *Sporothrix schenckii* (LOPES-BEZERRA; MORA-MONTES; BONIFAZ, 2017). Considerada uma doença cosmopolita, ela ocorre geralmente em regiões de clima tropical e subtropical, sendo endêmica nas Américas, com alta ocorrência no Brasil (CHAKRABARTI et al., 2015).

Esta doença é causada pela inoculação traumática no tecido subcutâneo de conídios oriundos do solo, das plantas ou de materiais orgânicos contaminados por fungos do complexo de espécies *Sporothrix schenckii* (SASAKI et al., 2014; BONIFAZ et al., 2016).

Sporothrix schenckii é um fungo que possui dimorfismo térmico, assumindo a forma filamentosa em temperaturas de 25 a 28 °C no seu estágio saprofítico, responsável pela infecção; e em cultivos com temperaturas em torno de 35 a 39 °C assumindo a forma de levedura (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Esta transição ocorre pela indução da temperatura e tem grande importância para a adaptação morfológica do fungo, a qual contribui para a infecção em mamíferos (OROFINO-COSTA et al., 2017).

Para se estabelecer no organismo hospedeiro os fungos apresentam diversos fatores de virulência, dentre eles a capacidade de formação de biofilme, a qual proporciona defesa contra à ação de agentes antifúngicos e à resposta imune (BRILHANTE et al., 2018a, 2018b). A formação de biofilmes *in vitro* em estudo recente foi descrita para forma filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp., tendo sido obtida uma conformação bem estruturada, a qual apresentou tolerância à ação das drogas antifúngicas (BRILHANTE et al., 2018a).

Dentre os fármacos descritos para o tratamento da esporotricose, iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina e anfotericina B são os mais utilizados na rotina clínica (MAHAJAN, 2014). Entretanto, devido à toxicidade e ao surgimento de cepas com baixa sensibilidade a essas drogas (PAIXÃO et al., 2015; GOMPertz et al., 2016; ALMEIDA-PAES et al., 2017a; VETTORATO et al., 2017), tem-se investigado o reposicionamento de fármacos com potencial antifúngico (BORBA-SANTOS et al., 2017), tais como as estatinas.

As estatinas são drogas que atuam como redutoras de colesterol, através de inibição competitiva da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), responsável pela conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico, importante precursor na síntese de esteróis (BRAULT et al., 2014). Essas drogas apresentam potencial antiparasitário (DINESH et al., 2015) e antibacteriano (KO et al., 2018), além de atividade antifúngica *in vitro* frente a fungos filamentosos (NYILASI et al., 2013) e leveduras (ZHOU et al., 2018),

associados ou não a antifúngicos clássicos (BRILHANTE et al., 2015). Entretanto, ainda não se conhece a ação dessas drogas sobre fungos dimórficos, como os pertencentes ao complexo de espécies *S. schenckii*.

Diante do exposto, devido ao potencial antifúngico das estatinas e à necessidade de reposicionamento de drogas que integrem no arsenal terapêutico da esporotricose, foi investigada a sensibilidade de células planctônicas e de biofilmes do complexo de espécies *S. schenckii* frente às estatinas, bem como avaliamos a interação dessas drogas com os antifúngicos de uso clínico no tratamento da esporotricose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da esporotricose

Os primeiros possíveis casos de esporotricose foram relatados por Linck em 1809 e por Lutz em 1889, contudo esses pesquisadores não obtiveram sucesso no isolamento do fungo (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011), somente no ano de 1898, que o então estudante de medicina, Benjamin Robinson Schenck no Johns Hopkins Hospital em Baltimore – EUA isolou pela primeira vez o fungo *Sporothrix schenckii*, de um paciente de 36 anos de idade, que após sofrer um ferimento no dedo indicador apresentou ulceração no local do ferimento e no braço. O isolado foi encaminhado para ser estudado pelo patologista e micologista Erwin Smith, que identificou o fungo como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (ARAM, 1986).

O segundo caso, relatado em 1900, se tratava de um menino que sofreu uma lesão no dedo com um martelo, sendo as lesões semelhantes às descritas por Benjamin Schenck. Nesse caso a lesão regrediu espontaneamente, e pela primeira vez foi utilizada a classificação atual do agente etiológico, *Sporothrix schenckii*, então denominado o agente da esporotricose (HEKTOEN; PERKINS, 1900).

O fungo foi incluído no gênero *Sporotrichum* equivocadamente e permaneceu até 1962, quando a partir da observação de diferenças morfológicas, Carmichael verificou que não existia semelhança entre as conidiações de membros do gênero *Sporotrichum* em relação aos isolados de casos de esporotricose (BARROS et al., 2011; TÉLLEZ et al., 2014).

Em 1988 surtos foram registrados em vários estados norte-americanos, onde casos começaram a aparecer em agentes de reflorestamento em Nova Iorque e Illinois, e posteriormente em 15 diferentes estados, acometendo trabalhadores que estiveram em contato com esfagno, um musgo bastante utilizado no cultivo de orquídeas e bonsais (DIXON et al., 1991; DOOLEY et al., 1997). Na Europa, o maior surto relatado ocorreu no início do século XX, no qual muitas pessoas tiveram esporotricose na França. Porém, houve um decréscimo no número de casos nas décadas seguintes, tornando a Europa um continente não comumente afetado (CHAKRABARTI et al., 2015).

No Brasil, Lutz e Splendore (1907) relataram o primeiro caso de esporotricose em 1907, ao observar um caso de infecção natural em um animal e descrever a fase parasitária do patógeno. Já em 1908, no Brasil, Splendore também descreveu a detecção de uma estrutura denominada corpos asteróides, a qual possuía forma estrelada, com um esporo central cercado

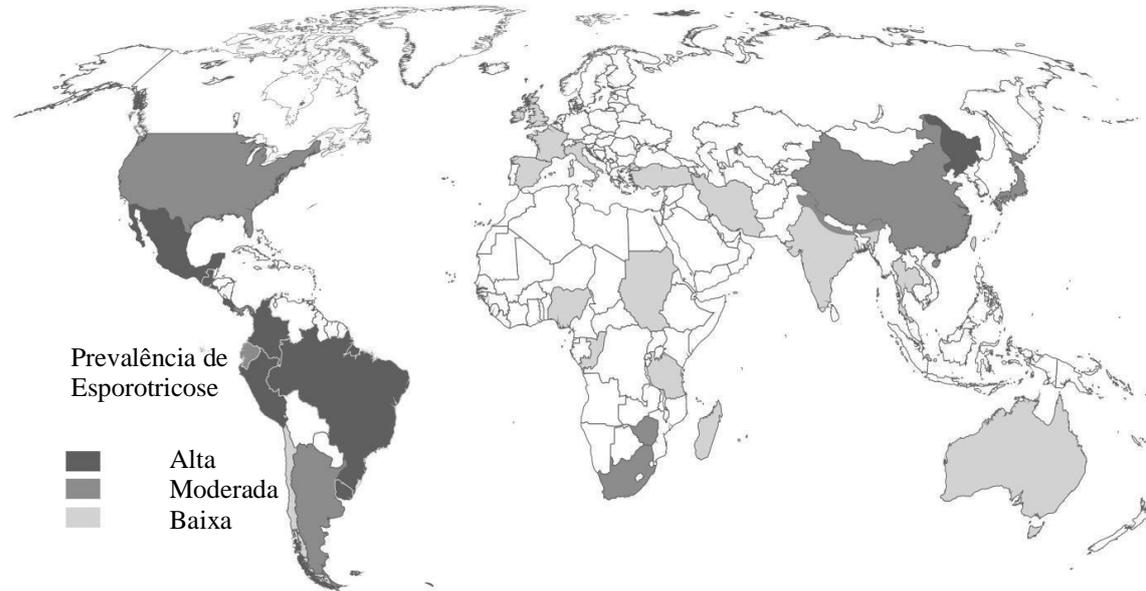
por uma massa de material eosinófilico em torno de levedura de *Sporothrix* spp., se tornando este um achado característico em exames histopatológicos de pacientes com esporotricose (ARAM, 1986; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). A sensibilidade de gatos para a infecção por *Sporothrix* spp. já havia sido demonstrada, porém a esporotricose felina adquirida naturalmente só foi relatada na década de 1950 (FREITAS; MIGLIANO; ZANI NETO, 1956).

Alguns anos após o relato de Lutz e Splendore, Terra e Rabelo descreveram, em 1992, o primeiro caso de esporotricose no Rio de Janeiro no Brasil, desde então, ao longo dos anos, têm sido descritos diversos casos no país (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). No Brasil o cuidado em relação a esporotricose tem aumentado devido ao crescente número de casos que são relatados principalmente em São Paulo, no Rio Grande do Sul, com 646 casos humanos acumulados entre os anos 1957 e 2002, no qual ocorre a predominância da transmissão clássica da doença pelo solo ou matéria orgânica (LOPES et al., 1999; DA ROSA et al., 2005; SILVA et al., 2012), mas com atenção em relação aos casos no Rio de Janeiro, devido a epidemia por transmissão zoonótica, na qual foi registrada aproximadamente 2.000 casos em humanos e 3.200 em felinos até dezembro de 2009 (BARROS et al., 2010; PEREIRA et al., 2014).

2.2 Epidemiologia da esporotricose

A esporotricose é uma doença de distribuição mundial, sendo predominante em áreas que possuem o clima quente e temperado, no qual acomete homens e animais (Figura 1) (CHAKRABARTI et al., 2015). O perfil epidemiológico da esporotricose é caracterizado principalmente por homens que trabalham com o manejo da terra. Outro grupo de risco é composto por crianças, idosos e mulheres que geralmente têm contato com gatos (OROFINO-COSTA et al., 2017; ALMEIDA-PAES et al., 2014). Essa doença é endêmica no Sul da África, na Índia, no Japão, nos Estados Unidos da América (EUA) e em vários países latino-americanos, como: Peru, Brasil, México, Colômbia, Uruguai, Costa Rica e Guatemala (Figura 1) (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011).

Figura 1 – Prevalência de esporotricose no mundo



Fonte: Adaptado de Chakrabarti et al., 2015.

Existe relato de diversos surtos de esporotricose pelo mundo ocasionados pela transmissão ambiental de *Sporothrix* spp., sendo esta associada a forma clássica de adquirir a doença, através da manipulação do solo e atividades relacionadas a jardinagem, agricultura ou mesmo a outras atividades que envolvam contato com ambientes contaminados, como os surtos que ocorreram nos anos 80, localizado no Vale do Mississippi, EUA, quando funcionários que trabalhavam no reflorestamento foram infectados através do contato com pinheiros (HELM; BERMAN, 1947; OROFINO-COSTA et al., 2017).

Nos anos 40, ocorreram grandes epidemias de esporotricose, como a da África do Sul, quando três mil mineiros foram infectados pelo contato com as estacas de madeira contaminadas que faziam a sustentação das minas. No início dos anos 90, também ocorreram epidemias, nas quais pessoas foram infectadas pelo contato com o feno armazenado em uma casa abandonada (HELM; BERMAN, 1947; OROFINO et al., 2017).

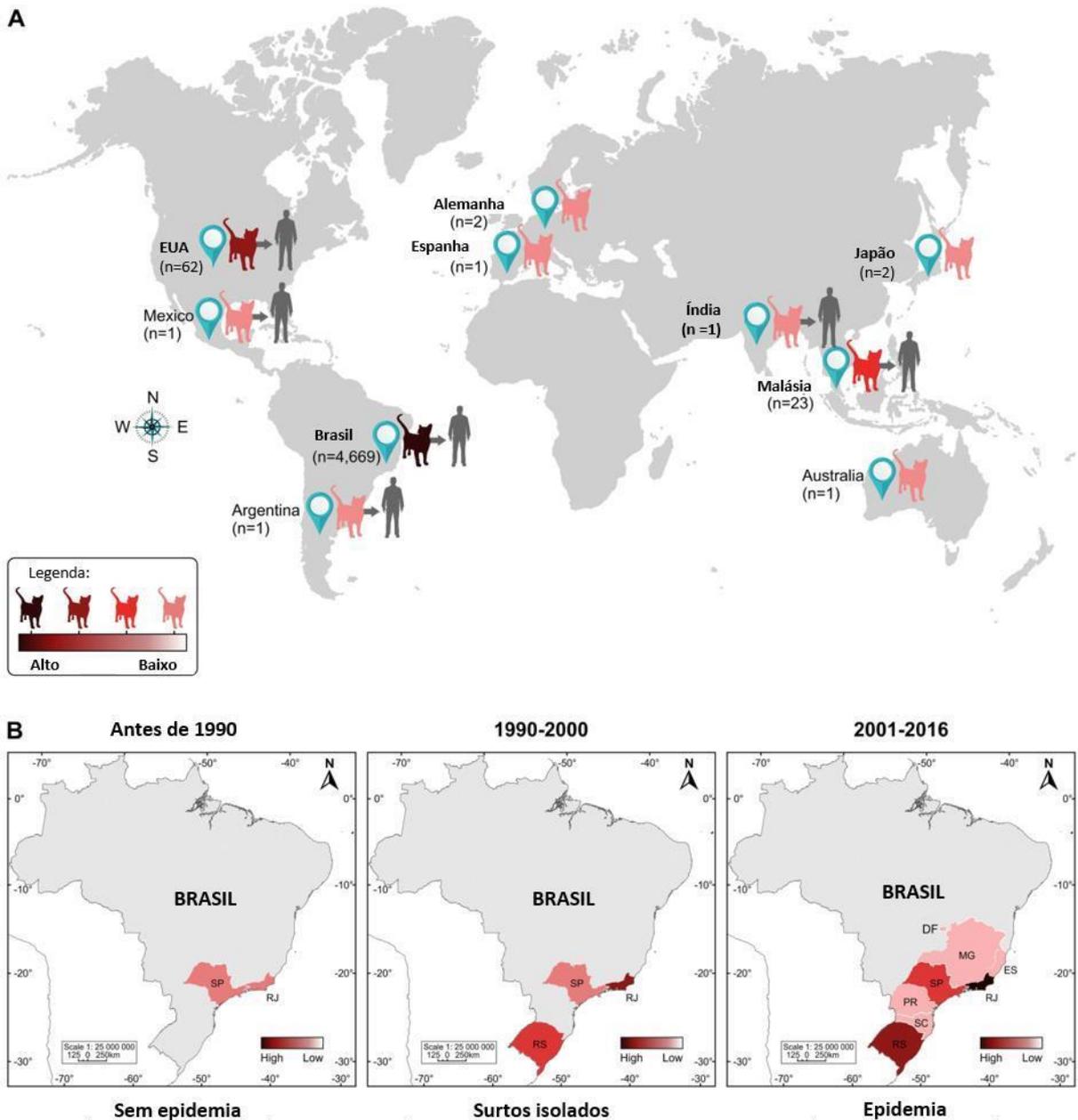
Na Europa os casos de esporotricose são atualmente escassos, tendo sido descritos 2 casos na Espanha, 58 casos na Itália e 55 casos autóctones em outros países do continente, no período de 1963 a 1993 (VENTIN et al., 1987; BARILE et al., 1993). Na China, entre os anos de 2007 a 2016 houve um aumento no número de casos de esporotricose, sendo relatados 467 casos humanos (SONG et al., 2013; FAN et al., 2016).

Na América do Sul, 30 casos de esporotricose foram registrados na Venezuela entre os anos 1973 e 2013; no Peru, a doença é hiperendêmica com uma incidência anual média de

98 casos por 100.000 habitantes; e ainda há relatos de casos no Chile, na Colômbia, no México, e principalmente, no Brasil (ZHANG et al., 2015; OYARCE et al., 2016).

No Brasil, as ocorrências de esporotricose envolvendo a transmissão clássica pelo solo ou por matéria orgânica são relatados nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, porém, o perfil epidemiológico da doença tem se modificado ao longo dos anos, com o aumento das ocorrências de casos que envolvem a transmissão zoonótica, envolvendo principalmente o gato. A região Sul e Sudeste do Brasil possui o maior número absoluto de casos. Nas últimas duas décadas, entre os anos de 1998 a 2016, o Brasil sofreu um surto de esporotricose transmitida por gatos no Rio de Janeiro, com foco na região metropolitana, no qual 4.669 casos foram relatados (Figura 2) (GREMIÃO et al., 2017). Estudos demonstraram que no Brasil todas as espécies pertencentes ao complexo *S. schenckii* consideradas patogênicas já foram isoladas, contudo é predominante casos de esporotricose pela espécie *S. brasiliensis* (RODRIGUES et al., 2013; CASTRO et al., 2016; OROFINO-COSTA et al., 2017).

Figura 2 – Casos de esporotricose felina e humana por transmissão zoonótica no mundo de 1952 a 2016.



(A) Desde meados do século XX, a esporotricose felina ocorre tipicamente em casos isolados e pequenos surtos, e apenas alguns relatos de transmissão zoonótica foram descritos na literatura. A região Sudeste do Brasil possui o maior número absoluto de casos. (B) Evolução espaço-temporal de casos de esporotricose felina no Brasil. Nas últimas duas décadas, o Brasil sofreu um surto duradouro de esporotricose transmitida por gatos no Rio de Janeiro, com 4.669 casos relatados. Fonte: GREMIÃO et al., 2017

No nordeste brasileiro, são raros os casos de esporotricose reportados, com isso a descrição da doença é rara, com o relato de um caso de esporotricose cutânea em um felino na cidade de Itaporanga, no estado da Paraíba (NUNES et al., 2013), e dois casos de esporotricose

cutânea humana transmitidas por cães no estado do Rio Grande do Norte (RAMOS et al., 2017). Em Pernambuco houve um caso de esporotricose felina, na cidade de Bezerros (ARAÚJO; DE SANTANA LEAL, 2016); na cidade de Rio Largo no estado de Alagoas houve um caso de esporotricose felina com transmissão para um humano (MARQUES-MELO et al., 2014); e um caso de esporotricose felina, na cidade de Bezerros, além de um surto de esporotricose felina na região metropolitana de Recife (MARQUES-MELO et al., 2014). Recentemente, a Paraíba tem registrado um número crescente de casos da doença, na cidade de João Pessoa, onde a principal forma de transmissão foi a zoonótica (JORNAL DA PARAÍBA, 2017).

Estabelecer um percentual de casos de esporotricose no Brasil é difícil, pois até meados de 2013 ela não era uma doença de notificação compulsória pelos órgãos de saúde pública nacionais, se tornando apenas no estado do Rio de Janeiro. Porém, com os avanços do campo microbiológico e a utilização de novas ferramentas moleculares foi possível um aprimoramento dos estudos epidemiológicos, possibilitando a identificação de espécies de *Sporothrix* difundidas em 14 estados, demonstrando que essa é uma doença que está se disseminando pelo território brasileiro (OROFINO-COSTA et al., 2017).

A transmissão zoonótica de *Sporothrix* spp. é causada por mordidas ou arranhões de animais, sendo mais comumente relatada a gatos, cães e tatus. Os gatos desenvolvem úlceras cutâneas disseminadas, com infecção muitas vezes fatal. As condições fisiológicas na saliva dos animais, associadas à temperatura corporal felina (intervalo normal 37-39 °C) podem ser um fator de estímulo para a transição micélio-levedura em *Sporothrix* spp. A saliva do gato tem um pH que varia entre 7,5 e 8,0, intervalo ideal para a conversão micélio-levedura segundo estudos *in vitro* (CRUZ, 2013; ZHANG et al., 2015).

A transmissão zoonótica da esporotricose foi descrita esporadicamente, envolvendo acidentes com serpentes e aves, mas também relacionadas às moscas, mosquitos, ratos, equinos e esquilos. Epidemias foram relatadas no Uruguai e, mais recentemente, no Brasil e na Argentina, relacionada à caça de tatu, dada a estreita relação do tatu com o solo (OROFINO-COSTA et al., 2017).

Os gatos possuem uma particularidade que os tornam mais susceptíveis a infecção fúngica adotando posição fundamental na epidemiologia dessa doença. Este fato se deve ao comportamento dos felinos em afiar suas unhas em cascas de árvores e manipular o solo enterrando suas fezes, possibilitando assim o fungo ficar abrigado na região ungueal. Como fator agravante, os gatos infectados ainda apresentam uma carga exuberante desses microorganismos na lesão e nas secreções de feridas ulceradas, potencializando dessa forma a transmissão tanto entre gatos, como destes para outras espécies, como o homem (MARQUES-

MELO et al., 2014). Diversos outros fatores vêm a contribuir para a transmissão através desses animais, como por exemplo, a combinação entre diagnóstico e tratamento tardio dos gatos infectados, fatores socioeconômicos como o abandono de animais doentes, o manejo inadequado da carcaça de animais mortos, à ineficácia de políticas públicas para a contenção da epidemia. Todos esses fatores fizeram com que a transmissão zoonótica alcançasse proporções epidêmicas, virando um problema de saúde pública já que, o aumento no número de casos em felinos é geralmente seguido pelo aumento no número de casos em humanos (RODRIGUES et al., 2013, 2014b).

Em humanos, a maioria dos casos clínicos acometem homens jovens e saudáveis, cuja ocupação e atividades de lazer envolvem locais onde o fungo esteja presente. Em sua maioria são agricultores, jardineiros, paisagistas e laboratoristas, pois estão em contato com materiais contaminados e que em suas principais atividades diárias frequentemente correm o risco de se ferir nas mãos, braços, pernas, pés e rosto, que são os lugares de fácil exposição. Já em crianças, o contato com o fungo geralmente se dá através da picada de insetos, mordidas, quedas e abrasões (CARRARA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013; BONIFAZ et al., 2016).

Entretanto, na última década o perfil dessa doença tem sofrido mudanças, havendo um grande aumento no número de transmissões por via alternativa, como no caso de transmissões zoonóticas causadas por felinos, acometendo principalmente mulheres e crianças, por possuírem contato direto com animais domésticos (CARRADA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013; CRUZ, 2013; RODRIGUES et al., 2014a).

Vários casos de esporotricose foram descritos entre profissionais da área laboratorial que manipularam animais infectados ou trabalham com culturas de *Sporothrix* spp. De um modo geral, ocorre inoculação cutânea, mas já foi descrito o envolvimento de infecção ocular. Outros profissionais que estão mais expostos são os médicos veterinários por estarem em contato direto com animais infectados, podendo sofrer mordeduras ou arranhaduras (CARRARA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013).

2.3 Taxonomia

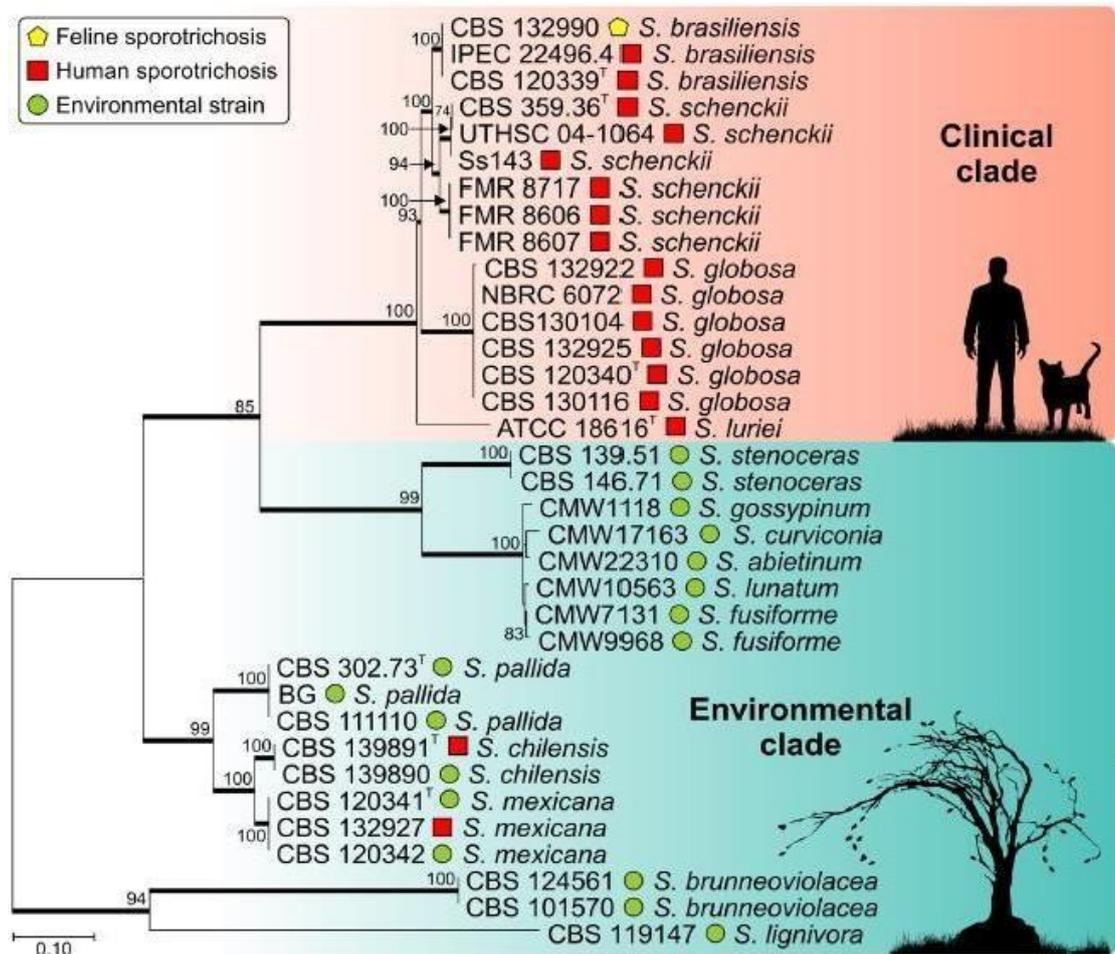
Por décadas, classificaram taxonomicamente os agentes etiológicos da esporotricose como sendo uma única espécie, denominada *Sporothrix schenckii* (OROFINO-COSTA et al., 2017). Após revisão taxonômica realizada por Guarro et al. (1999), *Sporothrix schenckii* foi classificado como pertencente à divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Ophiostomatales, família Ophiostomataceae e gênero *Sporothrix* (LACAZ et al., 1998;

GUARRO et al., 1999). Entretanto, com a utilização de novas técnicas moleculares, pode-se demonstrar que *Sporothrix schenckii* consiste de um conjunto de espécies filogeneticamente relacionadas, sendo possível evidenciar a heterogeneidade morfológica e genética desse fungo a partir de amostras clínicas ao longo dos anos de estudos (Figura 2) (ISHIZAKI et al., 2004; CARRADA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013; OROFINO-COSTA et al., 2017).

O primeiro estudo que indicou que *S. schenckii* se tratava de um complexo de espécies distintas foi baseado na análise filogenética, no qual se empregava uma combinação de sequências de DNA de três *loci* (calmodulina, quitina sintase e β -tubulina), dado esse obtido através do estudo de sessenta cepas de *S. schenckii*. Com base nesse estudo, foi demonstrado que a partir da análise sequencial do *locus* calmodulina seria possível identificar as espécies que fazem parte do complexo *Sporothrix schenckii* (MARIMON et al, 2007; CRUZ, 2013). Através de estudos baseados em análises do gene da calmodulina e região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do cromossomo fúngico, foi possível estabelecer diferenças entre as espécies do complexo *S. schenckii* (Figura 3). Foi demonstrado através da análise do perfil eletroforético do cariótipo de cepas de *S. brasiliensis* que existe uma menor variabilidade genética quando comparada com as cepas de outras espécies do complexo. A partir destes estudos pode-se observar que o polimorfismo cromossômico pode estar intimamente ligado às diferenças encontradas entre as espécies do complexo *S. schenckii* (SASAKI et al, 2014; OROFINO-COSTA et al.; 2017).

Atualmente, o gênero *Sporothrix* compreende 51 táxons, divididos em um clado clínico (principalmente patógenos humanos), incluindo *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*; um clado ambiental, composto por alguns outros complexos de espécies, como *S. pallida* e *S. candida* com cinco espécies cada, *S. inflata* com três espécies, *S. gossypina* com 12 espécies e *S. stenoceras* com seis espécies (OROFINO-COSTA et al.; 2017).

Figura 3 – Relações filogenéticas entre os clados clínicos e ambientais em *Sporothrix* spp. com base nas sequências de calmodulina.



Método: Probabilidade Maximum. Os números próximos aos ramos referem-se a novas percentagens (1000 bootstrap). Fonte: OROFINO-COSTA et al.; 2017.

O avanço das técnicas de identificação e a classificação de micro-organismos proporcionou mudanças na taxonomia das espécies, proporcionando a inclusão de novas espécies, como a espécie *Sporothrix chilensis* sp. nov., identificada em casos de onicomicose no Chile através de análises multigênicas (RODRIGUES et al., 2016a).

Atualmente os principais agentes etiológicos considerados da esporotricose são *S. globosa* sendo considerada com pouca virulência e de distribuição mundial (OLIVEIRA et al., 2010; CRUZ et al., 2012), *S. mexicana* que é encontrada em certas amostras ambientais do México e em casos de esporotricose na Europa e no Brasil (MARIMON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013; ALMEIDA-PAES et al., 2014), *S. schenckii stricto sensu* e *S. brasiliensis* que são consideradas as mais virulentas e prevalentes no Brasil, *S. luriei* e raros casos de infecção pela espécie *S. pallida*, anteriormente denominada *S. albicans* (ZHAO et al.,

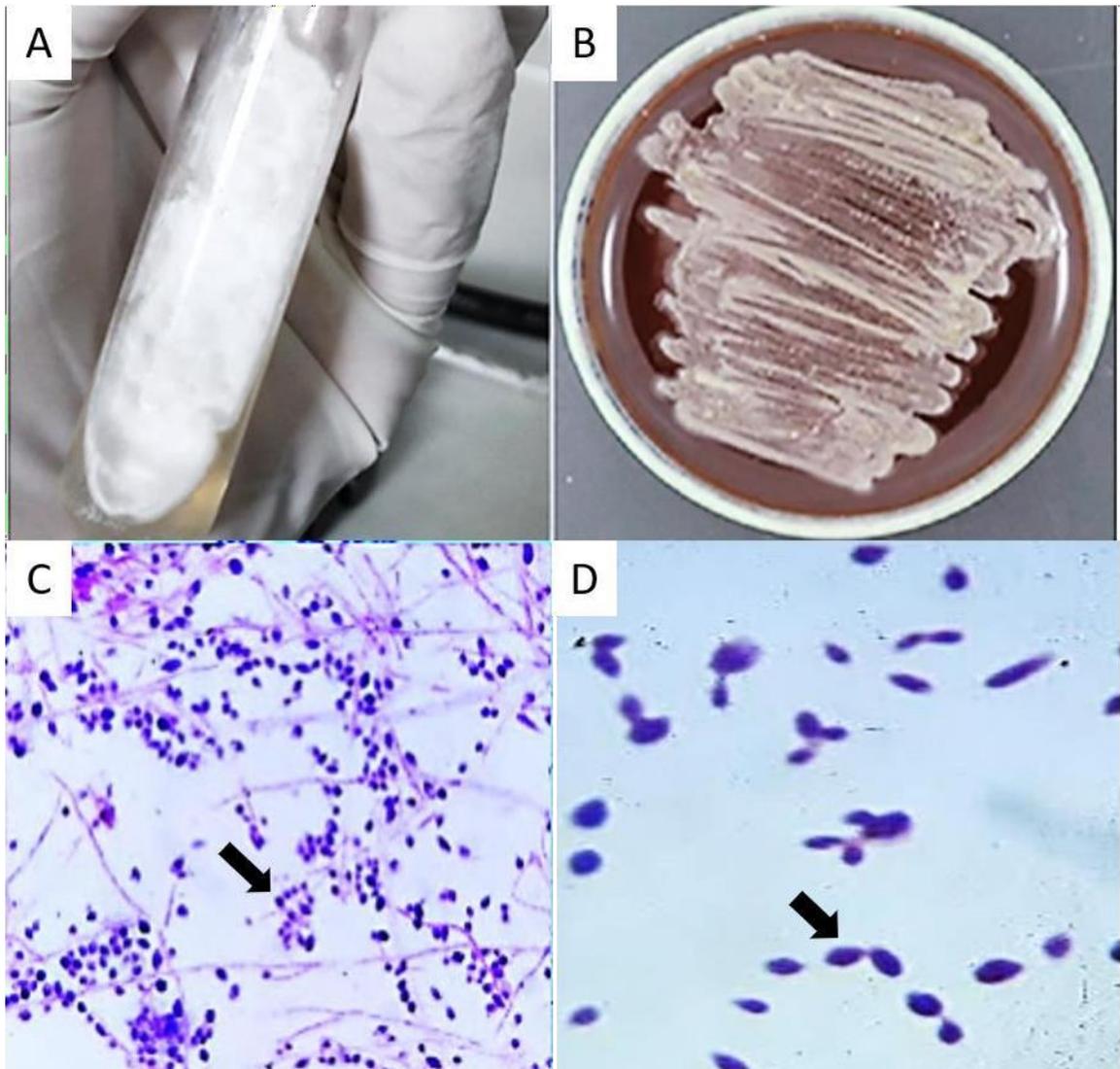
2015; CARRASCO-ZUBER et al., 2016; ALMEIDA-PAES et al., 2016b; GONÇALVES et al., 2017).

2.4 Aspectos morfológicos e ecológicos de *Sporothrix schenckii sensu lato*

O complexo de espécies *Sporothrix schenckii* tem característica termodimórfica e engloba espécies na forma filamentosa em seu estágio saprófito ou em cultivo a temperatura de 25 a 28 °C; e na forma leveduriforme em temperaturas próximas a 37 °C (BARROS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013; SASAKI et al., 2014). Em laboratório, quando esses fungos são cultivados em ágar Sabouraud Dextrose ou em meios enriquecidos à temperatura ambiente, como *Brain Heart Infusion* (BHI), apresentam macromorfologia de colônias úmidas, planas, com coloração branca ou marfim na forma filamentosa, podendo adquirir uma coloração escura dependendo do isolado (Figura 4A). Na micromorfologia, observa-se presença de hifas hialinas, septadas e ramificadas, medindo de 1 a 2 µm de espessura com presença de conídios piriformes, medindo de 1,5 a 3 µm em grupos, com arranjo remetendo à forma de cachos, conhecido como “flor de margarida” (Figura 4C). Com o tempo esses conídios podem apresentar paredes espessas e coloração castanha (DE MEYER et al., 2008; BARROS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016a).

A forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. é obtida através da incubação das colônias a 37 °C em meios ricos, como BHI suplementado com sangue de carneiro a 5%, apresentando macromorfologia de colônias de aspecto cremoso, de coloração branca ou creme e superfície irregular (Figura 4B). Algumas cepas não crescem bem na temperatura de 37 °C, necessitando serem incubadas em menores temperaturas, como exemplo citam-se as cepas da espécie *S. globosa* (MARIMON et al., 2007; BARROS et al., 2011). A micromorfologia dessas colônias exibe estruturas ovais, esféricas ou em forma de charuto com diâmetros de 1-3 × 3-10 µm (Figura 4D) (RODRIGUES et al., 2015a).

Figura 4 – Macromorfologia e micromorfologia de *Sporothrix* spp.



(A) Macromorfologia de *Sporothrix* spp. na forma filamentososa a 28 °C, em ágar batata após 5 dias de crescimento; (B) Macromorfologia de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme a 37 °C, em meio BHI suplementado com 5 % de sangue de carneiro. (C) Micromorfologia de *Sporothrix* spp. na forma filamentososa em coloração de Gram, mostrando a presença de hifas hialinas e conídios hialinos terminais dispostos simpodialmente, em arranjo de “flor de margarida” (seta preta); (D) Micromorfologia de estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. em coloração de Gram, evidenciando blastoconídios em brotamento (seta preta). Fonte: CEMM, 2017; 2019.

Sporothrix schenckii sensu lato cresce no ambiente a uma temperatura em torno de 22 °C a 27 °C e 90% de umidade. O material orgânico presente no solo possivelmente contribui no seu crescimento, sendo assim, este fungo habita regiões de solo rico, com temperatura em torno de 30 °C, pH entre 3,5 e 9,4 e alta umidade (CHAKRABARTI et al., 2015).

Estes fungos existem como sapróbio da natureza, já tendo sido isolados de palhas, folhas, frutas, grãos de trigo, espinhos de arbusto, madeiras, cascas de árvore, aranhas, insetos mortos e larvas, roseiras, poeira, moscas vivas, excretas de animais, algas, animais marinhos, feno de pradaria, gramíneas, dentre outros (BARROS et al., 2011; CRUZ, 2013). No entanto, alguns estudos têm demonstrado que *S. schenckii sensu lato* não possui potencial para ser um patógeno vegetal, atribuindo-se essa ideia ao fato de diversas plantas possuírem extratos com potencial antifúngico o que viria a contribuir para sua não patogenicidade vegetal (BARROS et al., 2011).

2.5 Fatores de virulência do complexo *Sporothrix schenckii*

Os fatores de virulência possibilitam e amplificam a capacidade de crescimento fúngico no hospedeiro. As interações entre fungos e outros organismos presentes no ambiente contribuem para que esses micro-organismos possam desenvolver diversas estratégias de sobrevivência, sendo essas identificadas como os fatores de virulência, os quais interferem na patogênia de determinada infecção (CASADEVALL, 2012). A partir dessa informação, presume-se que a origem da virulência do *Sporothrix* spp. surgiu através das interações intermicrobiana em seu habitat natural (STEENBERGEN et al., 2004).

O perfil de virulência do complexo *S. schenckii*, varia de acordo com a característica do patógeno e da imunidade do hospedeiro. Na qual sabe-se que existem espécies mais virulentas pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, como é o caso de *S. brasiliensis* e *S. schenckii s. str.* enquanto *S. globosa* e *S. mexicana* demonstraram pouca virulência ou mesmo nenhuma em testes realizados em modelo murino (FERNÁNDEZ-SILVA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2016b).

Apesar das informações relacionadas aos fatores de virulência de *Sporothrix* spp. serem escassas, podemos encontrar descritos na literatura alguns fatores, tais como as glicoproteínas, as proteínas secretadas, as vesículas extracelulares, a termotolerância, a capacidade de produção de melanina, o peróxido de ergosterol, o dimorfismo, (CARNERO et al., 2018) e mais recentemente a capacidade de formação de biofilme tanto na forma filamentosa quanto na leveduriforme (BRILHANTE et al., 2018a, 2018b).

O dimorfismo é uma característica importante de fungos patogênicos como o *Sporothrix* spp. Embora ainda sejam escassos os estudos sobre quais fatores são os responsáveis pela transição do micélio a levedura, existem evidências que sugerem um gene que codifica a

cálcio/calmodulina-quinase em *Sporothrix* spp. e que possivelmente exerce um papel como efetor de dimorfismo nesse fungo (CARNERO et al., 2018).

Além disso, uma histidina cinase híbrida, DRK1, um regulador universal do dimorfismo e da virulência de fungos dimórficos, foi relatada presente em *Sporothrix* spp. (HOU et al., 2014). Outra histidina identificada foi a SsDrk1, que pode também estar relacionada com o dimorfismo deste fungo estando presente em maior quantidade em células leveduriformes (TEIXEIRA et al., 2014). Esse pode ser um dos motivos pelo qual a forma leveduriforme possui uma maior virulência quando comparada à forma micelial (RODRIGUES et al., 2013).

A melanização é outro importante fator de virulência, concedendo ao micro-organismo proteção ambiental contra radiação ultravioleta. Espécies patogênicas de *Sporothrix* têm a capacidade de produzir colônias pigmentadas através da produção de melanina (MADRID et al., 2010). Além disso, a melanização já foi indicada como uma proteção para o micro-organismo, *in vitro*, contra drogas antifúngicas, tais como anfotericina B e terbinafina (MARIO et al., 2016; ALMEIDA-PAES et al., 2016a). Geralmente os conídios são as partículas fúngicas infectantes de *Sporothrix* spp. e a melanização desses conídios possibilita uma maior resistência à fagocitose pelos macrófagos, processo que gera o desenvolvimento do processo infeccioso de forma mais eficaz. Do mesmo modo o processo de melanização possui importante papel na patogênese da esporotricose cutânea, uma vez que os isolados melanizados possuem maior capacidade invasiva quando comparados com os não melanizados em experimento *in vivo* (MADRID et al., 2010).

Existem três tipos de melanina que podem ser produzidos por estes fungos, sendo a DHN-melanina o principal pigmento produzido pelos conídios de *Sporothrix* spp. sob várias condições ambientais, laboratoriais e parasitárias. Já a eumelanina e a piomelanina são produzidas adicionalmente se precursores como a 3, 4-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA) ou L-tirosina, respectivamente, estiverem disponíveis durante o crescimento fúngico (ALMEIDA-PAES et al., 2016a). Estudos *in vitro* indicam que a melanização em espécies de *S. schenckii* é controlada por vários fatores, tais como a temperatura, o pH e os nutrientes fornecidos para o desenvolvimento do micro-organismo (ALMEIDA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2010).

A parede celular é o constituinte que separa a superfície do fungo do meio extracelular e possui um papel importante na interação patógeno-hospedeiro. Essa estrutura contém macromoléculas envolvidas na virulência de fungos patogênicos (LOPES-BEZERRA et al., 2018). Várias proteínas associadas às vesículas foram relatadas em *Sporothrix* spp. como a glucanase da parede celular extracelular, uma proteína transportada por vesículas que

contribui para a virulência fúngica pela indução de lise de macrófagos e outras células hospedeiras devido ao remodelamento de sua superfície. Outra proteína é a superóxido dismutase (SOD), que contribui para o crescimento e sobrevivência do patógeno sob condições de estresse oxidativo, assim como no interior dos macrófagos, e sua presença foi relatada em *Sporothrix* spp. Proteases, como proteinase I, desempenham um papel essencial na interação desse fungo com as células hospedeiras, uma vez que está associado à capacidade de *Sporothrix* spp. invadirem os tecidos cutâneos (CARNERO et al., 2018).

As adesinas são um importante fator de virulência em todos os fungos patogênicos. No caso do *Sporothrix* spp. elas são responsáveis pela mediação da ligação da levedura à matriz dérmica e à fibronectina. As adesinas de fibronectina estão localizadas na superfície das células leveduriformes e sua expressão está relacionada à virulência fúngica. A principal adesina relatada durante a esporotricose é uma glicoproteína de 70 kDa, conhecida como Gp70. Além disso, essa proteína desempenha um papel crucial na modulação da resposta imune do hospedeiro, é altamente imunogênica e é detectada em todos os soros de camundongos infectados (BARROS et al., 2011; CARNERO et al., 2018).

2.5.1 Biofilme

Os biofilmes são estruturas complexas, consideradas como um mecanismo integrante do ciclo de vida, possuindo atributos de organismos multicelulares primordiais e ecossistemas multifacetados, proporcionando aos micro-organismos a capacidade de sobreviver em diversos ambientes, podendo ocorrer em superfícies sólidas ou líquidas, assim como em tecidos moles de organismos vivos (BOLTZ et al., 2017). Os micro-organismos, de forma geral, possuem a habilidade de formar biofilmes o que ocasiona maior virulência (BARROS et al., 2011).

Os biofilmes fúngicos são comunidades complexas, compostas de células e hifas ligadas a um substrato, envoltos por uma camada de proteção chamada de matrix polimérica extracelular. Os biofilmes fúngicos conferem aspectos preocupantes às infecções fúngicas por ser considerado um importante fator de virulência, pois possuem acentuada tolerância às células imunológicas do hospedeiro, bem como aos medicamentos utilizados no tratamento de doenças fúngicas (BORGHI et al., 2016).

A adesão a superfícies abióticas, o processo de interação célula a célula, assim como o desenvolvimento da hifa são etapas cruciais para formação de um biofilme. Em vista disso, a parede celular, as proteínas envolvidas no processo de adesão, assim como a filamentação e o

processo de regulação da sua expressão são mecanismos de virulência que têm sido bastante estudados para compreender a formação dos biofilmes fúngicos e sua tolerância (BORGHI et al., 2016). A formação do biofilme pode ocorrer em superfícies sólidas, em meios líquidos e em tecidos de organismos vivos, como exemplos podemos citar, dentes, células da epiderme (MITCHELL et al., 2016; BOLTZ et al., 2017).

A presença da matrix extracelular é considerada uma característica que define os biofilmes, sendo sua composição variável de acordo com diferentes espécies de micro-organismos. Apesar das diferenças, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos são os principais constituintes dos biofilmes fúngicos (FLEMMING; WINGENDER, 2010; VAN ACKER et al., 2014; REICHHARDT et al., 2015; BORGHI et al., 2016). A matriz extracelular consiste em um aglomerado de diferentes tipos de biopolímeros conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que formam a arquitetura tridimensional do biofilme e é responsável pela adesão às superfícies e pela coesão do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

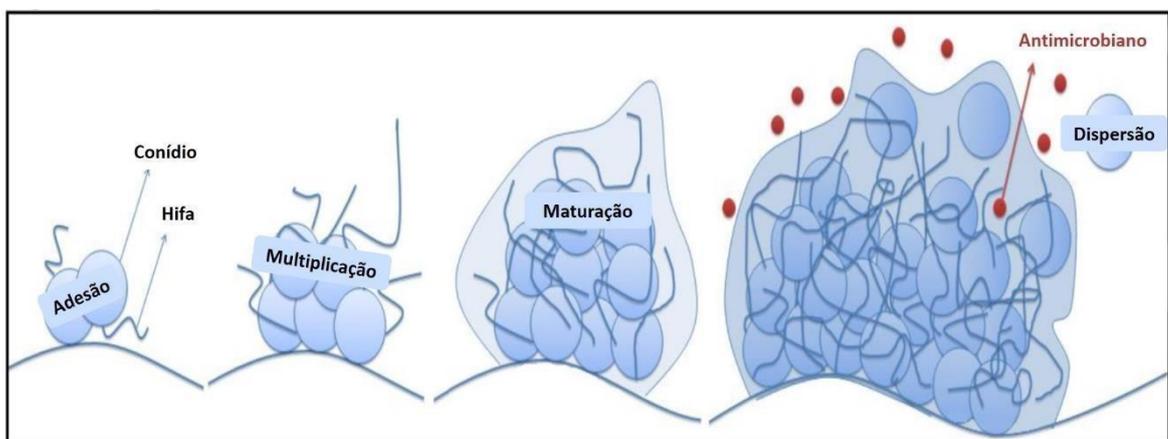
Em geral, muitos fungos clinicamente relevantes formam biofilmes, sendo grande parte destes biofilmes formados em processos de infecções em hospedeiros imunocomprometidos, associados à dispositivos médicos permanentes, como cateteres. A formação dos biofilmes pode contribuir para adesão dos micro-organismos aos aparatos médicos, contribuindo para a permanência da infecção e para o aumento de tolerância aos medicamentos (MARTINEZ et al., 2010).

Diversos patógenos fúngicos já foram descritos pela capacidade de formação de biofilmes e pela associação às infecções causadas por biofilmes, como *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Malassezia pachydermatis*, *Pneumocystis* spp., *Trichosporon asahii*, *Rhizopus* spp. e *Rhizomucor* spp. (NETT; ANDES, 2015). Além disso, a capacidade de formar biofilmes também foi demonstrada em vários fungos filamentosos, incluindo *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium* spp.; e em fungos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Coccidioides immitis* (VILA; ROZENTAL, 2016).

A formação dos biofilmes envolve quatro estágios: O primeiro é a aderência das células a um substrato. Nesta fase, a adesão é mediada por interação hidrofóbica e por forças de Van der Waals. O segundo estágio ocorre com iniciação da formação do biofilme e proliferação celular, sendo uma transição irreversível, a qual se dá por meio de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas, covalentes e por mecanismos moleculares específicos, acontecendo nesta etapa a proliferação das células através da superfície produzindo projeções alongadas que crescem em formas filamentosas contendo

hifas. O terceiro estágio é caracterizado pelo desenvolvimento da estrutura do biofilme, na qual a matriz extracelular exopolimérica (MEC) caracteriza a sua arquitetura; O quarto estágio envolve a maturação e dispersão. Nesse momento o biofilme já é composto de uma estrutura complexa, no qual as células envolvidas na matriz extracelular exibem maior tolerância e, finalmente, ocorre a dispersão das células do biofilme para colonizar o ambiente circundante (Figura 5) (MARTINEZ; FRIES, 2010; ROILIDES et al., 2015; LI et al., 2015; MITCHELL et al., 2016; VILA; ROZENTAL, 2016).

Figura 5 – Representação do ciclo de formação de um biofilme



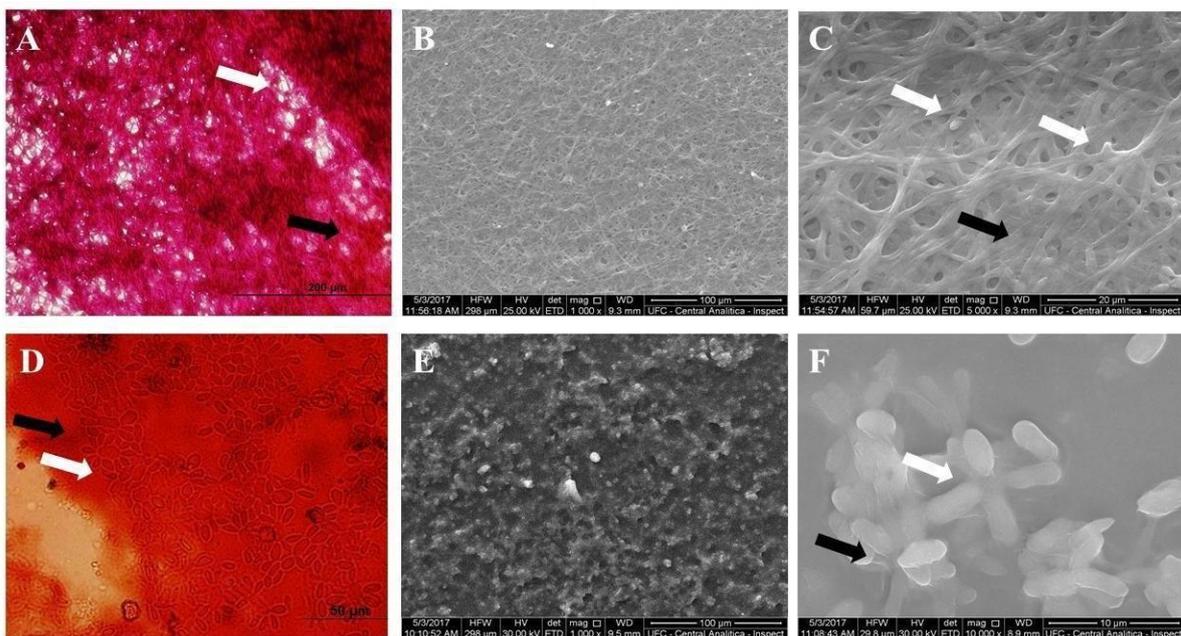
Fonte: Aguiar, 2017.

Sánchez-Herrera et al. (2014) demonstraram pela primeira vez a capacidade de formação de biofilmes *in vitro* pelo gênero *Sporothrix*. Em estudo recente, Brilhante et al. (2018a) demonstraram que as espécies *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, e *S. schenckii stricto sensu* na forma filamentosa são capazes de formar biofilme *in vitro*, sendo estes capazes de formar densas hifas e conídios, sendo classificado como forte formador de biofilmes pela elevada produção de biomassa; e que esses biofilmes levam em média 120 horas para atingir a maturação. O mesmo estudo também indicou o aumento da tolerância dos micro-organismos em biofilmes a antifúngicos clássicos, como itraconazol e anfotericina B, quando comparado às formas planctônicas.

Brilhante et al. (2018b) também relataram pela primeira vez a formação de biofilmes, *in vitro*, na forma leveduriforme das espécies do complexo *S. schenckii* (Figura 6). Esse estudo encontrou perfis distintos quanto a formação de biofilme de *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa* e *S. schenckii s. str.*, com variações de fraca a forte produção de biofilme.

Diante do exposto, ainda são necessários mais estudos voltados para ampliação do conhecimento dos aspectos biológicos do biofilme de *Sporothrix* spp., pois pouco se sabe a respeito dos fatores de virulência expressos e se a forma parasitária destes patógenos se apresenta em biofilme durante o processo de infecção, assim como sua correlação clínica.

Figura 6 – Biofilmes de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa (A – C) e leveduriforme (D – F).



A e D: Biofilmes corados com vermelho Congo para observação de matriz extracelular. B, C, E e F: Biofilmes em microscopia eletrônica de varredura. Setas pretas indicam matriz extracelular e setas brancas estruturas fúngicas. Fonte: Silva (2017).

2.6 Patogenia

A esporotricose é uma micose subcutânea cuja apresentação clínica pode variar de acordo com o estado imunológico do paciente, a patogenicidade, a tolerância térmica da cepa, dentre outros fatores. É uma micose que apresenta lesões do tipo nodulares cutâneas ou subcutâneas, sendo considerada uma doença crônica que acomete seres humanos e animais (BARROS et al., 2011; BAZZI et al., 2016).

A esporotricose se inicia por uma inoculação traumática do fungo, que pode acontecer através de lesões ocasionada por espinhos, objetos, dentre outros, que estejam contaminados (RODRIGUES et al., 2013a); por transmissão zoonótica, especialmente por mordeduras e arranhões de gatos e cães; por picada de insetos (mais raramente) ou ainda por inalação de conídios, esta última sendo menos frequente (LOPEZ-ROMERO et al., 2011; GONÇALVES, et al., 2017).

O fungo que se encontra presente no ambiente, na sua forma micelial, passa para forma leveduriforme, sua forma parasitária após a inoculação no hospedeiro. Esse processo se inicia após 24 ou 48 horas e pode levar até 13 dias. Já em relação a transmissão zoonótica o desenvolvimento da doença é mais rápida, já que o micro-organismo já se encontra na forma parasitária (LOPEZ-ROMERO et al., 2011; CRUZ, 2013).

De acordo com a localização das lesões, a esporotricose pode ser classificada em formas cutâneas, mucosas e extracutâneas, podendo ocorrer disseminação linfática ou visceral e osteoarticular em pacientes imunocomprometidos (BARROS et al., 2011; LOPEZ-ROMERO et al., 2011; ALMEIDA-PAES et al., 2016b).

2.7 Aspectos clínicos da esporotricose

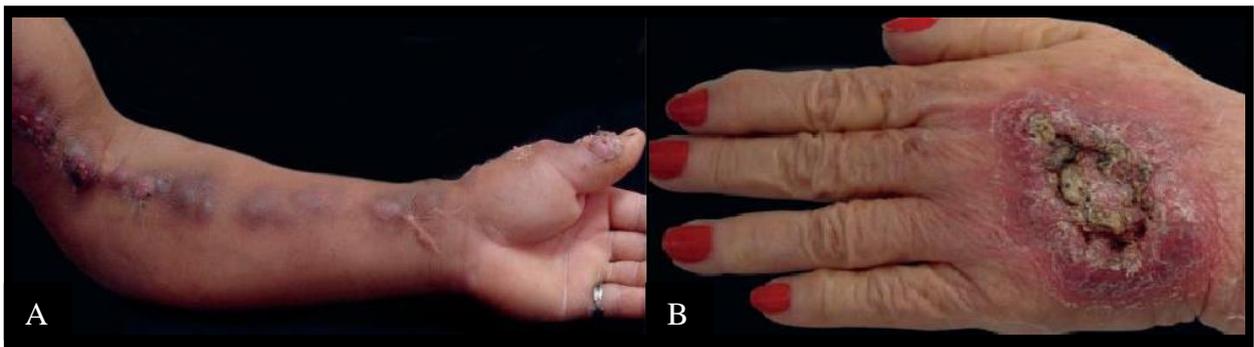
A esporotricose é uma micose subcutânea, sendo caracterizada como uma doença crônica que pode apresentar-se de diversas formas, desde a forma cutânea localizada, com lesão restrita ao local da inoculação, até a forma disseminada. Em casos raros, a esporotricose pode desenvolver-se como uma doença extracutânea grave. O espectro da doença tem sido atribuído a fatores como o modo de inoculação, o tamanho e a profundidade do inóculo traumático, a imunidade do hospedeiro, a virulência e a termotolerância do fungo (MAHAJAN, 2014; OYARCE et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016b).

A forma linfocutânea é a manifestação clínica mais comum da doença e é responsável por 70% a 80% dos casos de esporotricose (MAHAJAN, 2014; BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). Geralmente pode ser lesão ulcerada de base infiltrada e eritematosa, podendo ser também pápula, nódulo, placa vegetante e uma lesão úlcero-gomosa. Desenvolve-se com formações de nódulos indolores ao longo dos vasos linfáticos, que podem amolecer e ulcerar. Esse desenvolvimento pode ocorrer estendendo-se do local da lesão em sentido aos vasos linfáticos ou permanecer próximo a essa cadeia de nódulos (Figura 7A) (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Em sua maioria são assintomáticos, podem coçar ou

tornar-se dolorosos e ter curso clínico indolente semelhante ao das lesões primárias (MAHAJAN, 2014).

A esporotricose localizada é a segunda forma mais comum de esporotricose, porém possui menor ocorrência em áreas endêmicas, devido ao fato de se atribuir a esta forma clínica uma sensibilização prévia do indivíduo ao fungo, o que proporciona um melhor controle imunológico do hospedeiro, o qual responde ao micro-organismo de forma mais eficaz. Caracteriza-se pela presença de uma única lesão no local de inoculação do fungo e o acometimento facial ocorre mais frequentemente nesta forma de esporotricose (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; MAHAJAN, 2014). As lesões são assintomáticas, eritematosas, pápulas, papulopústulas, nódulos ou placas verrucosas e ocasionalmente úlceras não curadas ou pequenos abscessos (Figura 7B) (MAHAJAN, 2014).

Figura 7 – Formas clínicas da esporotricose



(A) Esporotricose cutâneo-linfática: Lesões nódulo-ulcerativas surgem ao longo dos vasos linfáticos, a partir da lesão inicial. (B) Esporotricose cutâneo-localizada: lesão desenvolvida no local de inoculação. Fonte: Adaptado de OROFINO-COSTA et. al, 2017.

As lesões podem assemelhar-se a ceratoacantoma, celulite facial, pioderma gangrenoso, prurigo nodular, sarcoma de partes moles, carcinoma basocelular, erisipelóide ou rosácea. Esse tipo de lesão também pode estar presente em outras doenças dermatológicas, especialmente as pertencentes ao grupamento PLECT (Paracoccidioidomicose, Leishmaniose, Esporotricose, Cromoblastomicose e Tuberculose) (MAHAJAN, 2014; BAZZI et al., 2016) que só através do isolamento do micro-organismo é possível estabelecer um diagnóstico.

Já a forma cutânea disseminada está interligada a algum tipo de imunocomprometimento ou doenças associadas e geralmente ocorre juntamente com a forma extracutânea (Figura 8). Essa forma raramente descrita atinge menos de 5% dos pacientes (FREITAS et al., 2014; MAHAJAN, 2014; ALMEIDA-PAES et al., 2015). A disseminação

hematogênica do fungo ocorre logo após inoculação através da pele ou por inalação fúngica. Inicialmente observa-se lesões cutâneas que após semanas ou meses podem ulcerar-se. Diversos fatores como o alcoolismo, diabetes, corticoterapia prolongada, pacientes HIV-positivos ou com síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) são considerados de risco, contribuindo para a manifestação dessa forma clínica (FREITAS et al., 2014; ALMEIDA-PAES et al., 2015).

Figura 8 – Forma cutânea disseminada da esporotricose



Fonte: Adaptado de OROFINO-COSTA et. al, 2017.

Considerada a mais rara e de difícil tratamento, a forma extracutânea da doença ocorre em uma pequena parcela dos pacientes, geralmente estando relacionada com indivíduos imunodeprimidos (FREITAS et al., 2014). Apartir da disseminação hematogênica, começa a ocorrer o aparecimento das lesões, também se acredita que esse tipo de manifestação por não apresentar lesão cutânea primária pode ocorrer devido a inalação de *Sporothrix* spp. no qual são mais acometidos neste tipo de manifestação da doença o tecido ósseo, as mucosas e os pulmões (MAHAJAN, 2014; FREITAS et al., 2015; ALMEIDA-PAES et al., 2014).

2.8 Diagnóstico da esporotricose

O diagnóstico da esporotricose é constituído através da correlação das manifestações clínicas apresentadas e da coleta de material para análise, podendo ser feito a partir do exsudato de lesões cutâneas ou mucosas obtidas com o auxílio de um *swab* estéril e fragmentos de lesões cutâneas ou mucosas obtidos por biópsia, por exemplo é feito no isolamento e identificação, estabelecendo assim o agente causal (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017). Os diagnósticos diferenciais devem ser

considerados de acordo com a diversidade de formas clínicas e a morfologia das lesões, se tornando de fundamental importância, já que a apresentação da doença pode ser associada a outras patologias como a tuberculose cutânea, da leishmaniose cutânea, da cromoblastomicose, da blastomicose e da paracoccidioidomicose (BARROS et al., 2011; MAHAJAN, 2014). A cultura em meios artificiais permanece sendo o padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial da esporotricose, porém métodos histopatológicos, sorológicos e moleculares podem ser utilizados no auxílio do diagnóstico (MAHAJAN, 2014; RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

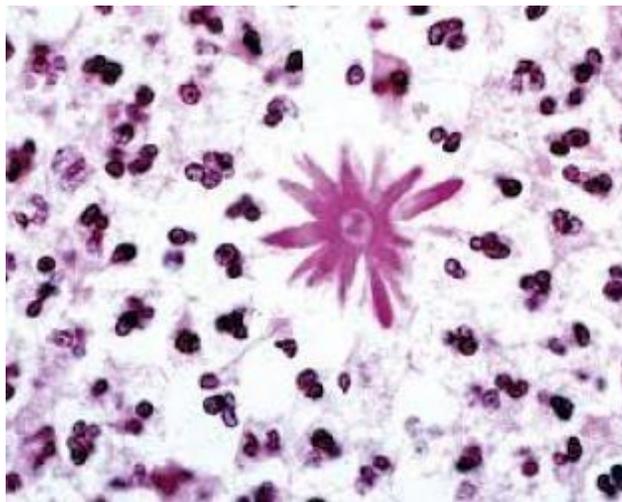
O diagnóstico micológico é um método simples e de baixo custo, embora possa não ser útil para algumas formas sistêmicas e atípicas de esporotricose, no qual a realização da técnica de exame direto é a mais utilizada. Essa técnica consiste em preparação a fresco de espécimes clínicos tratados com hidróxido de potássio (KOH) a 10% ou hidróxido de sódio (NaOH) a 40%, possibilitando observar as estruturas fúngicas (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; OROFINO-COSTA et. al, 2017). Entretanto, o exame direto no caso da esporotricose não têm grandes aplicações em materiais coletado de humanos, porém é mais sensível em animais, principalmente em felinos, devido a grande quantidade de células fúngicas no organismo, exibindo sensibilidade de quase 85% em comparação com a cultura (CASTREJÓN; ROBLES; ARROYO, 1995; MELLO; SCHUBACH; MADEIRA, 2011; OROFINO-COSTA et al., 2017).

A cultura é considerada o padrão ouro, sendo o método definitivo para a detecção do agente etiológico da esporotricose, onde a partir da amostra obtida essa deve ser cultivada em meios de cultura empregados na rotina tais como, ágar Sabouraud dextrose, ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol ou gentamicina, ágar Mycosel® contendo cicloheximida, e BHI, à 25 a 30°C, no qual entre 5 e 15 dias ocorre a formação de colônias filamentosas. Por se tratar de um fungo dimórfico é possível a ratificação desse diagnóstico *in vitro*, a partir da conversão do fungo para sua forma leveduriforme (OROFINO-COSTA et. al, 2017; RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

As colônias são identificadas fenotipicamente pela aparência membranosa da superfície, cor esbranquiçada a creme e um halo preto, ou podem ser escuras desde o início, dependendo da espécie, e das condições nutricionais e ambientais. A microscopia da colônia exhibe delicadas hifas hialinas septadas ramificadas, um conidióforo produzindo na ponta conídios piriformes, ovais a redondos, hialinos, dispostos simpodialmente como um buquê, além de conídios pigmentados sésseis. A colônia da fase de levedura tem uma superfície de cor creme (MAHAJAN, 2014; OROFINO-COSTA et. al, 2017).

O exame histopatológico é um teste auxiliar utilizado para o diagnóstico da esporotricose, onde a partir da coloração podem-se evidenciar as estruturas leveduriformes, porém é inespecífica e pode mimetizar outras doenças granulomatosas. A observação da reação de Splendore-Hoeppli é um forte indício de um caso de esporotricose ao se fazer a observação do fungo. Os corpos asteróides geralmente são vistos em 40 a 85% dos casos de esporotricose crônica, extracelulares e dentro dos abscessos, como uma estrutura eosinofílica de forma radiada constituída de complexo antígeno-anticorpo, que se deposita na superfície de alguns fungos. Contudo, a observação dessa reação não é de fácil visualização (Figura 9) (SIDRIM; ROCHA, 2004; GEZUELE; DA ROSA, 2005; ZHANG et al., 2011; MAHAJAN, 2014; OYARCE et al., 2016).

Figura 9 – Achado histológico de corpos asteroides



Fonte: WICK; SCOTT, 2015.

O fungo é melhor corado pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE), Ácido Periódico Schiff (PAS) ou métodos de impregnação pela prata de Grocott, nos quais os elementos fúngicos, quando presentes, aparecem na forma de células globosas semelhantes a leveduras, medindo 3-8 μm de diâmetro interno (em 84% dos casos), em forma de charuto com tamanho de 1-2 \times 4-5 μm (em 33% dos casos) ou ovais a arredondas ou simples formas das leveduras no citoplasma de células gigantes ou no centro dos corpos de asteróides (ZHANG et al., 2011; MAHAJAN, 2014).

Várias técnicas têm sido descritas para o diagnóstico imunológico da esporotricose, dentre eles imunoeletroforese, aglutinação e imunodifusão com fração antigênica bruta foram propostas para o sorodiagnóstico da esporotricose, mas a sensibilidade e a especificidade foram

baixas, em vista disso, foi proposto o uso de testes mais sensíveis como os ensaios imunoenzimáticos, especialmente ELISA e *Western blotting*, ambos com resultados mais rápidos (OROFINO-COSTA et. al, 2017). Outro teste utilizado e bastante simples é o teste cutâneo de intradermorreação com esporotriquina, o qual detecta hipersensibilidade tardia, sendo um teste de exclusão da doença, pois reage positivamente em infecções recentes e antigas reagindo de forma positiva em cerca de 90% dos casos de esporotricose. Mesmo não sendo empregado na rotina clínica, tem importante uso em estudos epidemiológicos (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

O uso de testes sorológicos rápidos e não invasivos para o diagnóstico de esporotricose foi possível quando antígenos específicos foram caracterizados e padronizados. Esses exames são úteis principalmente em casos com acometimento extracutâneo, em que o acesso à coleta de amostra para análise micológica se torna difícil como, por exemplo, no envolvimento do SNC e ossos (OROFINO-COSTA et. al, 2017; RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

Os métodos moleculares foram desenvolvidos com a finalidade de melhorar o diagnóstico fúngico, mantendo ou melhorando a especificidade, sensibilidade e precisão quando comparado à cultura fúngica (OLIVEIRA et al., 2014). Atualmente, através do estudo molecular de *Sporothrix* spp. é possível o desenvolvimento de inúmeros marcadores genéticos para reconhecimento e identificação de espécimes clínicos. O desenvolvimento de métodos de genotipagem rápidos e que possuam baixo custo é importante para o diagnóstico, bem como para estudos epidemiológicos, considerando que as espécies patogênicas em *Sporothrix* spp. diferem em relação a sua distribuição geográfica, virulência e sensibilidade às drogas antifúngicas (OROFINO-COSTA et. al, 2017).

Kano et al. (2001) fez a primeira identificação de *Sporothrix* spp. pelo método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), no qual iniciadores baseados no gene codificador da CHS1 (quitina sintase 1) foram desenhados e a PCR foi capaz de detectar 10 pares de bases de fragmento de DNA genômico de *Sporothrix* spp. Uma *nested PCR* para detecção de *Sporothrix* spp. foi avaliada em amostras clínicas utilizando como alvo a região do gene 18S rRNA. Essa reação detectou DNA de *Sporothrix* spp. em materiais coletados e previamente confirmados através do método de cultura e coloração histoquímica. Os dados obtidos nesse experimento demonstraram a sensibilidade e especificidade, indicando a possibilidade de um diagnóstico rápido para esporotricose (KANO et al., 2005; HU et al., 2003). Já a *PCR fingerprinting* utilizando o primer universal T3B, gerou padrões de bandas distintos, possibilitando a

identificação de isolados clínicos em nível de espécie, confirmados pelo sequenciamento parcial do gene da calmodulina (OLIVEIRA et al., 2015).

A utilização da biologia molecular para o diagnóstico da esporotricose é vista de forma promissora, pois com sua utilização existe uma otimização do tempo de trabalho e maior sensibilidade e especificidade do resultado em relação a outros testes empregados. Porém, ainda possui custo elevado em relação ao material utilizado e equipamentos específicos (OLIVEIRA et al., 2014; RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

2.9 Abordagens terapêuticas

Os fármacos que fazem parte do arsenal clássico para o tratamento da esporotricose são iodeto de potássio, itraconazol, que vem sendo utilizado principalmente para o tratamento da forma cutânea da doença, assim como a terbinafina. Outro medicamento empregado no tratamento é a anfotericina B, que é empregada nas manifestações sistêmicas e extracutâneas da doença (MAHAJAN, 2014; ALMEIDA-PAES et al., 2016b).

Para o tratamento da esporotricose é de grande importância reconhecer as características da doença, observando a extensão da lesão, identificando fatores no hospedeiro que mensuram a gravidade da doença, pois facilita a escolha do tratamento adequado, baseando-se na condição clínica do paciente, evitando-se interações medicamentosas e efeitos adversos (CORDEIRO et al., 2011).

Fatores que dificultam o tratamento podem ser atribuídos ao diagnóstico equivocado, já que as lesões podem mimetizar as de outras doenças, diagnóstico tardio, arsenal terapêutico limitado e, na grande maioria dos casos, a desistência da terapia pelos pacientes por se tratar de um tratamento longo (REIS-GOMES et al., 2012). Além dos fármacos utilizados para o tratamento de esporotricose, a termoterapia com aplicação de calor local (42 a 43 °C) usando compressas térmicas ou aquecedor portátil de bolso, aquecedor infravermelho ou infravermelho distante para a forma fixa da doença pode ser utilizada, sendo este método muito utilizado no tratamento da esporotricose em gestantes (MAHAJAN et al., 2014).

O iodeto de potássio tem sido utilizado no tratamento da esporotricose desde 1903, quando ainda não estavam disponíveis antifúngicos específicos e utilizava-se iodeto para várias doenças infecciosas e não infecciosas. O mecanismo de ação do iodeto de potássio não é completamente elucidado, porém sua ação já é reconhecida sobre a resposta imune, bem como sobre a fagocitose de células de *Sporothrix* spp., apresentando eficácia sobre as formas cutânea fixa e linfocutânea da esporotricose. No entanto sua utilização não é eficaz na forma

extracutânea e cutânea disseminada da doença (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; MAHAJAN, 2014; OROFINO-COSTA et. al, 2017).

Alguns dos efeitos adversos relatados do iodeto de potássio são: gosto metálico, náusea, vômitos, anorexia, epigastralgia e diarreia, podendo ser atenuados pela redução da dose administrada do fármaco ou através da suspensão temporária. Não é recomendado o uso prolongado desse medicamento nem sua administração em grávidas, pois sua utilização está associada ao hipotireoidismo neonatal, tireomegalia, obstrução respiratória fetal e parto demorado. Devido aos efeitos adversos relacionados ao iodeto de potássio, sua utilização tem sido evitada, sendo substituído por fármacos mais efetivos e seguros, como o itraconazol (COSTA et al., 2013; MACEDO et al., 2015).

O itraconazol é uma droga fungistática considerada de escolha para o tratamento da esporotricose devido a sua eficácia e segurança, sendo um agente antifúngico oral, pertencente à classe dos azólicos, um grupo de compostos sintéticos com estruturas químicas semelhantes, os quais atuam inibindo a enzima 14α -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 azólicos altera a função da membrana celular causando aumento da sua permeabilidade (GLUJOY et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2016b; OROFINO-COSTA et. al, 2017).

Itraconazol pode ser usado em pacientes saudáveis que possuem lesões limitadas, bem como em pacientes imunossuprimidos e na forma sistêmica, mas não em casos de disseminação da doença. As vantagens relacionadas a este fármaco levaram a sua intensa utilização nas clínicas para o tratamento humano e veterinário. Apesar de ser um fármaco com reduzida toxicidade, não é recomendado sua utilização em grávidas. Além disso, alguns efeitos adversos associados a essa droga foram descritos, como anorexia, hipocalemia, náuseas, vômitos, hipertensão e cefaléia. Sua maior desvantagem é a possibilidade de interação medicamentosa, como consequência do metabolismo dependente do CYP 3A4 comum a outros fármacos. No entanto apesar de seu alto custo, tornou-se a droga de escolha para o tratamento das variedades cutâneas (fixas e linfocutâneas) eosteoarticulares da esporotricose (MAHAJAN, 2014; OROFINO-COSTA et. al, 2017).

A terbinafina é um derivado alilamina que atua bloqueando a síntese do ergosterol pela inibição da enzima esqualeno epoxidase, sendo uma excelente opção terapêutica para pacientes com contraindicações ao uso de itraconazol e ao iodeto de potássio, pois possui grande eficácia no tratamento da esporotricose nas formas cutânea e linfocutânea. É bem absorvida após administração oral e age inibindo a enzima esqualenoepoxidase, por conseguinte, bloqueiam

uma etapa da biossíntese do ergosterol, ocasionando um acúmulo tóxico de esqualeno na parede da célula fúngica, cujo resultado é a morte celular (SIDRIM; ROCHA, 2004; MAHAJAN, 2014; OROFINO-COSTA et. al, 2017). Possui baixa ligação à enzima microssômica P450 do citocromo e não afeta a biodisponibilidade de outros fármacos metabolizados por esse sistema enzimático. (MAHAJAN, 2014). Essa droga é uma alternativa no tratamento de gestantes com esporotricose, no entanto possui elevado custo, que chega a ser superior ao do itraconazol, dificultando o seu uso, principalmente em países em desenvolvimento (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeopoliênico, lipofílico, sintetizado de *Streptomyces nodosus*, que se liga ao ergosterol da membrana fúngica, modificando sua permeabilidade e ocasionando a formação de poros na célula fúngica. Esses poros permitem o escape de constituintes citoplasmáticos, ocasionando desequilíbrio eletrolítico e homeostático. No entanto, tem sido atribuída como principal atividade fungicida à sua capacidade de causar auto-oxidação da membrana citoplasmática e liberação de radicais livres letais (MAHAJAN, 2014). Essa droga é utilizada em casos mais graves da esporotricose, como a forma disseminada, a esporotricose pulmonar, e as formas associadas à pacientes imunocomprometidos. Ela também pode ser indicada em casos de esporotricose osteoarticular ou que não estão respondendo bem à terapia com o itraconazol (MAHAJAN, 2014; ALMEIDA-PAES et al., 2016b). Ao ser administrada por via intravenosa, a anfotericina B é cardiotóxica e nefrotóxica, exigindo uma constante avaliação da função renal e dos níveis séricos de potássio (GRAY et al., 2012; OROFINO-COSTA et. al, 2017). Seus efeitos adversos incluem febre, calafrios, tremores, náuseas e vômitos, dor de cabeça, hipocalcemia, hipomagnesemia, nefrotoxicidade e anemia normocítica normocrômica, porém é uma droga segura para ser utilizada durante a gravidez (MAHAJAN, 2014; RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

O tratamento da esporotricose é longo, variando de 2 a 3 meses. A cura clínica é considerada quando não há evidências clínicas da doença, como pus, exsudação ou crosta nas lesões da pele, ou até mesmo se um discreto eritema, fibrose ou milia podem aparecer durante o processo de cicatrização, caso contrário o tratamento deve ser mantido até a cura clínica da doença. Já a forma sistêmica da doença exige um tratamento longo, podendo se estender de 6 a 12 meses (OROFINO-COSTA et. al, 2017).

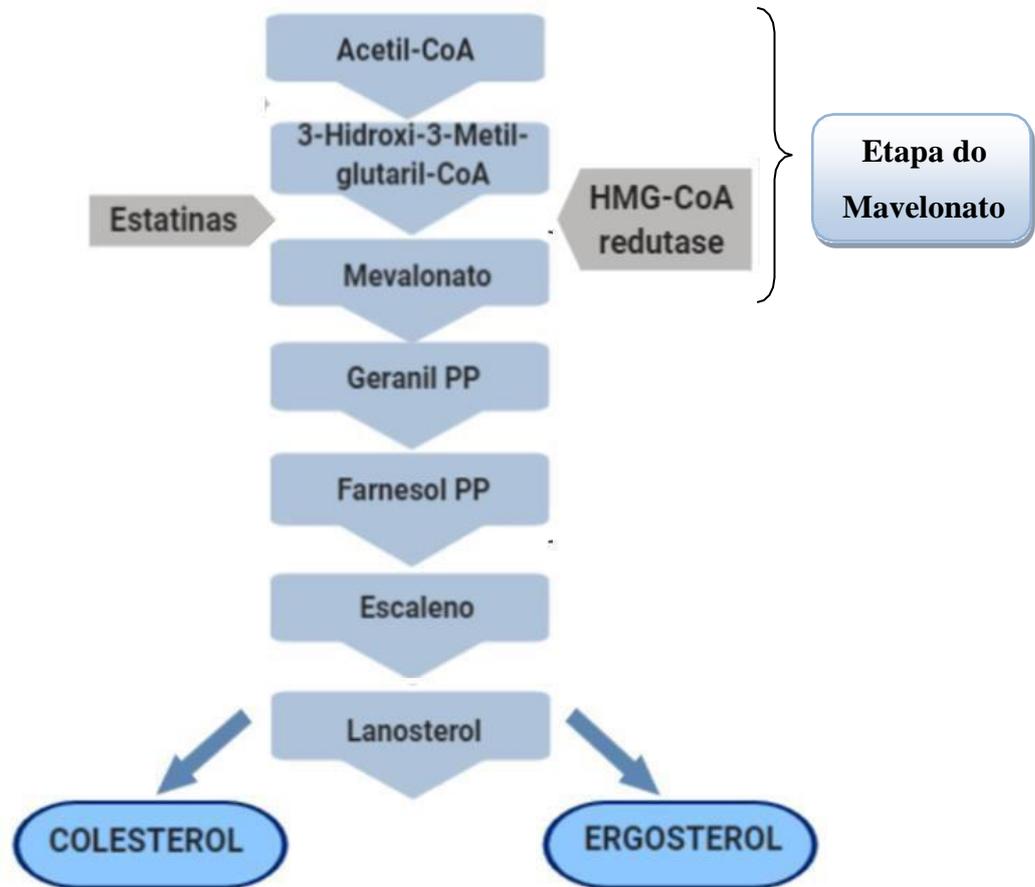
2.10 Estatinas

Em 1976, o microbiologista Akira Endo juntamente com o Dr. Masao Kuroda, produziram um potente inibidor da biossíntese de colesterol quando descobriram a primeira estatina, a mevastatina, produzidas em culturas de *Penicillium citrinum*. Akira Endo encontrou uma substância que possuía a função de defesa de certos micro-organismos contra outros que necessitassem de esteróis e/ou isoprenóides para o seu desenvolvimento. Esta substância descoberta promovia uma grande disfunção metabólica na biossíntese destes compostos, levando à morte dos micro-organismos (BERGMAN, 2013; PARIHAR, 2018). Este composto possui em sua estrutura α -lactona- β -hidroxilada que, na forma acíclica, mimetiza o intermediário envolvido na redução promovida pela HMG-CoA redutase, promovendo a antecipação desta enzima em reconhecer este produto natural, em face da analogia estrutural com seu substrato natural (VIEGAS et al., 2006).

As estatinas são drogas conhecidas por sua atuação como inibidora da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, sendo classificada como a classe de drogas hipolipemiantes mais importante, reduzindo a síntese de colesterol em pacientes com quadro de hipercolesterolemia, regulando a produção de lipoproteínas plasmáticas (LIU, 2019).

A HMGCR é a enzima limitante da velocidade da via sintética do colesterol hepático e converte a HMG-CoA em ácido mevalônico, um precursor na nova via biossintética do colesterol (Figura 10). As estatinas competem reversivelmente com o substrato endógeno, HMG-CoA, pelo sítio ativo dentro da redutase. A ligação da estatina ao sítio ativo da enzima confere uma alteração de configuração que atenua a função da enzima. Agindo como antagonistas competitivos, as estatinas com maior afinidade se ligam ao sítio ativo da enzima, impedindo assim a ligação do substrato endógeno de baixa afinidade, HMG-CoA (SWANSON et al., 2016).

Figura 10 - Biossíntese do ergosterol e do colesterol



Fonte: adaptado de SOUZA; RODRIGUES, 2009.

A inibição da HMG-CoA redutase, a enzima reguladora da via, resulta em distúrbios em praticamente todos os processos celulares vitais, como glicosilação e prenilação de proteínas, sinalização celular, funcionamento da cadeia respiratória e integridade das membranas celulares (MACIEJAK et al., 2013).

Na extremidade proximal da via do mevalonato, as estatinas inibem a HMG-CoA redutase, diminuindo assim a síntese imediata da biossíntese de mevalonato um importante precursor da síntese de esteróis, como o ergosterol nos fungos e o colesterol em humanos (PARIHAR, 2018). As isoenzimas fúngicas e a enzima humana são muito semelhantes em estrutura e função, e agem na mesma etapa da via sintética do mevanolato (LESZCZYNSKA et al., 2009). Portanto, a HMG-CoA redutase torna-se, desta forma, um importante alvo para utilização na terapia antifúngica (SOUZA; RODRIGUES, 2009).

As estatinas, por possuir efeito contra doenças cardiovasculares, estão entre as drogas mais prescritas no mundo. Outro fator que tem chamado atenção para utilização das

estatinas durante os últimos anos é o fato delas possuírem efeitos adicionais como ação antiinflamatória, efeitos anticarcinogênicos e imunomodulatórios, na qual a maioria dos efeitos exercidos pelas estatinas estão ligados à inibição da enzima alvo, HMG-CoA redutase. A inibição desta enzima leva à redução de metabólitos que participam da via sintética do colesterol. Com isso, estudos têm sugerido que as estatinas podem ter efeitos benéficos em diferentes tipos de infecções, pois a redutase da HMG-CoA é amplamente expressa e possui diferentes funções em organismos vivos como bactérias e fungos (MCFARLAND et al., 2014). Os efeitos pleiotrópicos das estatinas foram relatados pela primeira vez em 1995, quando foi observado que os benefícios da pravastatina não se restringiam somente a redução de lipídios que a terapia com estatinas promove (DAVIES et al., 2016).

Todas as estatinas, exceto a pravastatina, são metabolizadas pelas enzimas do citocromo P450 no fígado. A sinvastatina, o ácido da lovastatina e a atorvastatina são metabolizados pelo CYP3A4, enquanto as estatinas mais hidrofílicas fluvastilina e rosuvastatina são metabolizadas principalmente pelo CYP2C9, já a pravastatina é metabolizada principalmente por sulfatação (MCFARLAND et al., 2014).

Estudos relataram que os efeitos antifúngicos das estatinas são devidos à sua capacidade de inibir o braço de esterol da síntese de mevalonato, influenciar as respostas imunes do hospedeiro e aumentar as armadilhas extracelulares (PARIHAR, 2018).

Diante disso, devido ao potencial antifúngico das estatinas e da estratégia de reposicionamento de drogas que integrem o arsenal terapêutico da esporotricose, surgiu a iniciativa de investigar a sensibilidade de células planctônicas e de biofilmes do complexo de espécies *S. schenckii* frente às estatinas, bem como avaliar a interação dessas drogas com os antifúngicos de uso clínico para o tratamento da esporotricose.

3 HIPÓTESES

- a) Sinvastatina, atorvastatina e pravastatina possuem potencial antifúngico, *in vitro*, frente ao crescimento planctônico de espécies do complexo *Sporothrix schenckii*;
- b) Sinvastatina, atorvastatina e pravastatina possuem potencial antifúngico, *in vitro*, frente aos biofilmes das espécies do complexo *Sporothrix schenckii*;
- c) A pravastatina interage sinergicamente com itraconazol, anfotericina B e terbinafina, *in vitro*, em espécies do complexo *S. schenckii*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica da sinvastatina, atorvastatina pravastatina, *in vitro*, frente células planctônicas e biofilmes de espécies do complexo *S. schenckii* por tratamentos isolados ou concomitantes de pravastatina associada com itraconazol, anfotericina B ou terbinafina em células planctônicas das espécies do complexo *S. schenckii*.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar o perfil de sensibilidade de células planctônicas de espécies do complexo *S. schenckii* frente à sinvastatina, atorvastatina ou pravastatina.
- b) Investigar a sensibilidade dos biofilmes de espécies do complexo *S. schenckii* frente à sinvastatina, atorvastatina ou pravastatina.
- c) Avaliar as interações farmacológicas entre a pravastatina e as drogas antifúngicas itraconazol, anfotericina B ou terbinafina frente espécies do complexo *S. schenckii*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local do estudo

As pesquisas foram realizadas nos laboratórios do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil.

5.2 Micro-organismos

Foram utilizadas 18 cepas pertencentes ao complexo de espécies *S. schenckii*, sendo 08 cepas de *S. brasiliensis*, 04 de *S. schenckii stricto sensu*, 02 de *S. globosa* e 04 de *S. mexicana* (Tabela 1). As cepas foram obtidas da micoteca do CEMM/UFC.

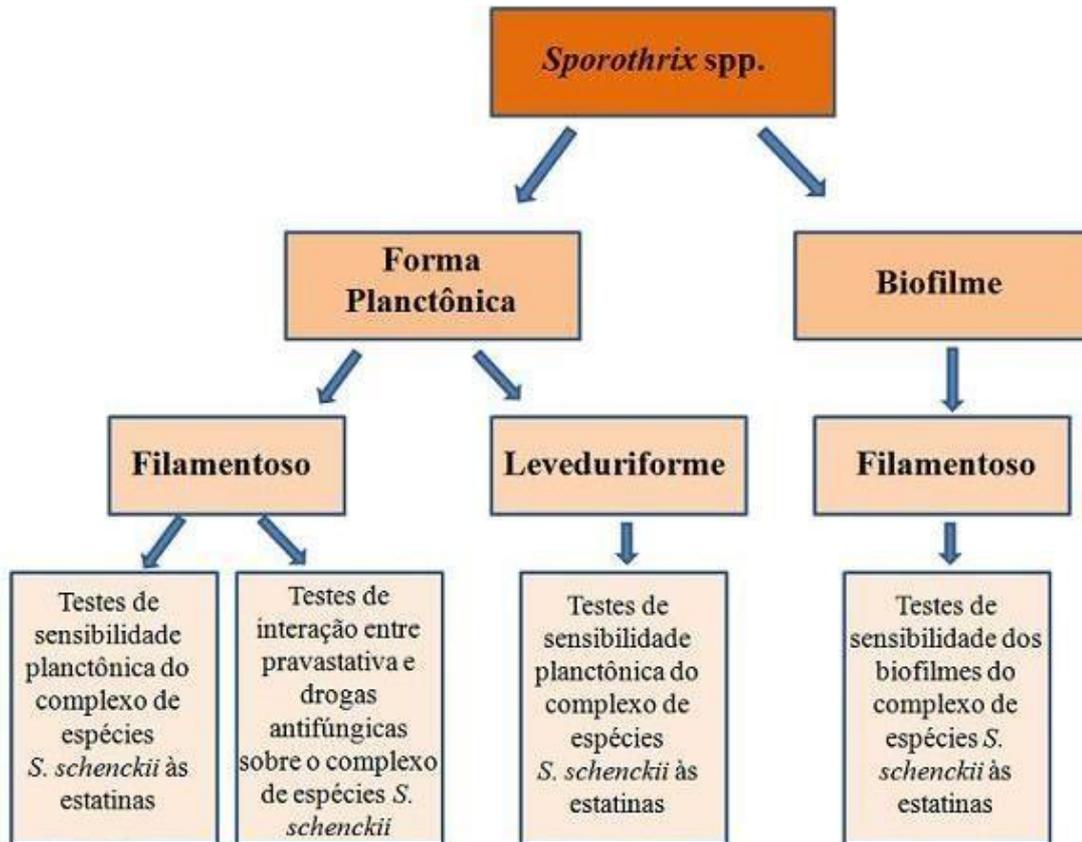
Para ensaios com a forma filamentosa, as cepas foram cultivadas em ágar batata dextrose (PDA) (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 35°C por 5 dias (CLSI, 2008a). Para obter o crescimento de leveduras, subculturas sucessivas foram realizadas no BHI caldo suplementado de glicose a 2%, pH 7,8, a 37 °C por 7 dias com agitação orbital (150 rpm) (BORBA-SANTOS et al., 2017).

Tabela 1 –Cepas de espécies 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 05-3-075	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-078	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-087	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Humano
CEMM 05-3-088	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Humano
CEMM 05-3-089	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Humano
CEMM 05-4-004	<i>Sporothrix globosa</i>	Humano
CEMM 05-4-005	<i>Sporothrix globosa</i>	Humano
CEMM 05-3-100	<i>Sporothrix mexicana</i>	Vegetal
CEMM 05-3-101	<i>Sporothrix mexicana</i>	Solo
CEMM 05-4-008	<i>Sporothrix mexicana</i>	Humano
CEMM 05-4-009	<i>Sporothrix mexicana</i>	Humano
CEMM 05-3-090	<i>Sporothrix schenckii sensu strict</i>	Humano
CEMM 05-3-095	<i>Sporothrix schenckii sensu strict</i>	Humano
CEMM 05-3-097	<i>Sporothrix schenckii sensu strict</i>	Humano
CEMM 05-3-048	<i>Sporothrix schenckii sensu strict</i>	Gato

5.3 Fluxograma

Figura 11 – Fluxograma dos experimentos realizados



5.4 Estatinas e drogas antifúngicas

As soluções-estoque das estatinas foram produzidas na concentração de 10.000 µg/ml. Sinvastatina (SIN, Medley farmacêutica, São Paulo, Brasil) foi ativada através de hidrólise em NaOH etanólico (15% (v/v) etanol, 0,25% (w/v) NaOH) a 60 °C por 1 hora (BRILHANTE et al., 2015); atorvastatina (ATO, Medley farmacêutica, São Paulo, Brasil) foi diluída em dimetil sulfóxido (DMSO) e pravastatina (PRA, Medley farmacêutica, São Paulo, Brasil) em água destilada estéril. Os antifúngicos: anfotericina B (AMB, Sigma, St. Louis, MO, EUA), itraconazol (ITC, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) e terbinafina (TRB, Sigma, St Louis, MO, USA) foram preparados com base no documento M38-A2 do CLSI (CLSI, 2008a). As soluções-estoque de anfotericina B, itraconazol e terbinafina foram diluídas na

concentração de 1.600 µg/mL. Todos os antifúngicos foram diluídos em DMSO a 100% e ficaram estocados a – 20°C até o uso.

5.5 Teste de sensibilidade antifúngica

Os testes de sensibilidade foram realizados em microplacas de 96 poços, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme os documentos M38-A2 para a forma filamentosa, e M27-A3 para a forma leveduriforme, do CLSI (CLSI, 2008a, 2008b), com adaptações. A faixa de concentração testada foi de 4 a 2.048 µg/mL de sinvastatina para a forma filamentosa do fungo e de 0,12 a 64µg/mL para forma leveduriforme; de 4 a 2.048 µg/mL de pravastatina; de 1 a 512 µg/mL de atorvastatina (BRILHANTE et al., 2015) e de 0,03 a 16 µg/mL de anfotericina B, itraconazol e terbinafina para ambas formas testadas. Os inóculos foram preparados em solução salina a 0,9% e em seguida ajustados para uma concentração final de 0,4 a 5×10^4 UFC/mL (forma filamentosa) e de 0,5- $2,5 \times 10^3$ UFC/ml (forma leveduriforme) em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), tamponados a pH 7,0 com 0,165M de MOPS (Sigma, St. Louis, MO, USA). As microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 horas (forma filamentosa) e a 37 °C por 96 horas (forma leveduriforme). A concentração inibitória mínima (CIM) das estatinas foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico em comparação com o crescimento fúngico sem a presença da droga. Para os antifúngicos, a CIM de anfotericina B foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% de crescimento, a de terbinafina foi de 80% de inibição de crescimento e a de itraconazol foi de 100% para fungos filamentosos e de 50% para leveduras em comparação com o crescimento fúngico na ausência das drogas. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candidakrusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controles de qualidade dos experimentos. Os experimentos foram conduzidos em duplicata em momentos distintos.

A concentração fungicida mínima (CFM) das estatinas foi realizada por semeadura em ágar batata do conteúdo de todos os poços com ausência visual de crescimento fúngico a 35 °C (forma filamentosa) e a 37 °C (forma leveduriforme) por 7 dias. A CFM foi considerada como a menor concentração das drogas que inibiu 99,9% do crescimento fúngico (SCORDINO et al., 2015).

5.6 Interação da pravastatina com antifúngicos sobre *Sporothrix* spp.

Os testes de interação entre pravastatina e as drogas antifúngicas (anfotericina B, itraconazol ou terbinafina) em células planctônicas de *Sporothrix* spp. (04 cepas de *S. brasiliensis*, 02 de *S. schenckii stricto sensu*, 02 de *S. mexicana* e 02 de *S. globosa*) foram realizados na forma filamentosa de acordo com o método de microdiluição em caldo (*checkerboard*) descrito por Almeida-Paes et al. (2016) e adaptado por Brilhante et al. (2018b). Os valores de CIM obtidos foram utilizados para determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). As combinações com $ICIF \leq 0,5$ foram consideradas sinérgicas; aquelas com $0,5 < ICIF \leq 4$ foram tidas como indiferentes; e apenas aquelas com $ICIF > 4$ foram classificadas como antagônicas (ODDS, 2003). Os experimentos foram conduzidos em duplicatas.

5.7 Formação de biofilmes

A formação do biofilme da forma filamentosa foi realizada de acordo com Brilhante et al. (2018b). Uma alíquota de 200 μ L de suspensão fúngica a 1×10^6 conídios/ml foi preparada em meio RPMI 1640 e adicionada à microplacas de 96 poços. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para adesão celular. Após esse período as placas foram lavadas com PBS e adicionados 200 μ L de meio RPMI 1640. As placas foram então incubadas novamente por 96 horas, nas mesmas condições, para formação do biofilme.

5.8 Efeito das estatinas sobre os biofilmes de *Sporothrix* spp.

A ação das estatinas sobre os biofilmes de *Sporothrix* spp. foi realizada sobre a forma filamentosa desses, pois, segundo Brilhante et al. (2018b), os biofilmes das formas filamentosas são mais complexos, têm mais camadas, sendo mais tolerantes que os biofilmes da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. Após a formação dos biofilmes, eles foram lavados com PBS e alíquotas de 200 μ L de meio RPMI 1640 contendo diluições em série de sinvastatina, atorvastatina e pravastatina. Anfotericina B, itraconazol e terbinafina foram adicionadas às microplacas, as quais foram incubadas a 35 °C por 72 horas. A faixa de concentração testada foi de 4-2.048 μ g/mL para sinvastatina e pravastatina; 1-512 μ g/mL para atorvastatina (BRILHANTE et al., 2015) e 0,03-16 μ g/mL para os anfotericina B, itraconazol

e terbinafina. Após exposição, o efeito das drogas foi avaliado pela quantificação da atividade metabólica, através do ensaio de redução do 2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) (Sigma Chemical Corporation, EUA), como descrito por Brillhante et al. (2018a).

A quantificação da atividade metabólica foi feita pela preparação de alíquotas da solução de XTT-menadiona [0,5 mg/mL de XTT e 1 mM de menadiona (Sigma Chemical Co., EUA)], preparada em PBS e adicionada aos poços, seguida de incubação das placas no escuro por 3 horas a 35 °C. Posteriormente, a solução de XTT-menadiona foi transferida para poços de uma nova placa e realizada leitura em espectrofotômetro a 492 nm.

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

5.9 Análises estatísticas

Para as análises realizadas foram utilizadas as variáveis CIM (em número de diluições realizadas) e absorvância (DO). Quando os dados apresentaram simetria e variâncias semelhantes, foi utilizada a ANOVA para as análises realizadas em três ou mais grupos de dados, seguido do teste *post hoc* de *Tukey* para a comparação entre pares; e o teste t de Student para 2 grupos de dados. Nas situações de elevada assimetria dos dados foi utilizado o teste de Friedman (3 ou mais grupos de dados), seguido do teste *post hoc* de *Dunn* para a comparação entre pares, ou o teste de Mann-Whitney (2 grupos de dados não pareados) ou Wilcoxon (2 grupos de dados pareados). Em todas as situações, o nível de significância adotado para conclusões afirmativas foi de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Sensibilidade planctônica de *Sporothrix* spp.

Dentre as estatinas, sinvastatina e atorvastatina apresentaram menores CIMs em relação a pravastatina sobre as espécies do complexo *S. schenckii* nas formas filamentosa e leveduriforme (Tabela 2).

As CIMs para a forma filamentosa de *Sporothrix* spp. variaram de 16 a 128 µg/mL para sinvastatina; de 8 a 32 µg/mL para atorvastatina; e de 128 a 512 µg/mL para pravastatina, (Tabela 2). Para as drogas antifúngicas, os valores de CIM obtidos variaram de 0,25 a 4µg/mL para anfotericina B e itraconazol; e de 0,12 a 4µg/mL para terbinafina (Tabela 3).

A sinvastatina apresentou valores de CIM menores que pravastatina e maiores que atorvastatina ($p < 0,0001$). A forma filamentosa de *S. brasiliensis* foi a espécie que apresentou maiores CIMs de sinvastatina ($p = 0,0008$). Com relação aos valores de CFM de sinvastatina variaram de 128 a >2048 µg/mL, atorvastatina de 512 a >512 µg/mL e pravastatina de 1024 a >2048 µg/mL, respectivamente, sem diferenças estatísticas com a CIM para 100% de inibição fúngica.

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima de estatinas frente às espécies do complexo *S. schenckii* na forma filamentosa.

Espécies (n)	SINVASTATINA		ATORVASTATINA		PRAVASTATINA	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
	50%		50%		50%	
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=8)						
Range	32 - 128	256- >2048	16 - 32	512 - >512	128 - 512	1024- > 2048
GM	64	512	20,7	512	256	1024
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)						
Range	16 - 32	128-512	16	512	128	> 2048
GM	22,6	256	16	512	128	> 2048
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)						
Range	16 - 32	256 - 2048	8 - 32	512 - >512	256 - 512	> 2048
GM	22,6	724,4	19	512	362	> 2048
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=4)						
Range	16	128 - 2048	8 - 32	512 - >512	128 - 512	> 2048
GM	16	724,1	13,5	512	256	> 2048

Legenda: GM: média geométrica; CIM: Concentração inibitória mínima (mg/L); CFM: concentração fungicida mínima (mg/L).

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima dos antifúngicos frente às espécies do complexo *S. schenckii* na forma filamentosa.

Espécies(n)	ANFOTERICINA B		ITRACONAZOL		TERBINAFINA	
	CIM 100%	CFM	CIM 100%	CFM	CIM 80%	CFM
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=8)						
Range	0,5 - 4	1 - 4	0,25 - 4	16 - >16	0,03 - 0,12	0,5 - 2
GM	1,5	2,2	1,2	16	0,1	1
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)						
Range	0,5 - 2	2 - 4	1 - 2	16 - > 16	0,06	0,5 - 1
GM	1	2,8	1,4	16	0,06	1
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)						
Range	0,25 - 2	1- 16	0,5 - 2	8 -> 16	0,12 - 0,25	1 - 2
GM	0,7	1,2	1,2	12,7	0,1	2
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=4)						
Range	0,25 - 1	0,25 - 1	0,5 - 1	16 - > 16	0,12 - 0,25	2 - 4
GM	0,7	1	1	16	0,25	3

Legenda: GM: média geométrica; CIM: Concentração inibitória mínima (mg/l); CFM: concentração fungicida mínima (mg/l).

Quanto as CIM para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., essas variaram de 8 a 32 μ g/mL para sinvastatina; 8 a 64 μ g/mL para atorvastatina; e de 128 a 256 μ g/mL para pravastatina (Tabela 4). Para as drogas antifúngicas, os valores de CIM obtidos variaram de 0,03 a 0,5 μ g/mL para anfotericina B, 0,03 a 1 μ g/mL itraconazol; e de 0,03 a 0,125 μ g/mL para terbinafina (Tabela 5). Em relação aos dados obtidos para ambas as formas analisadas, observou-se que a forma leveduriforme apresentou CIMs menores quando comparadas com os valores para forma filamentosa de *Sporothrix* spp. ($p < 0,0001$).

Os valores de CFM variaram de 64 a >64 μ g/mL para sinvastatina, de 64 a >512 μ g/mL para atorvastatina e 1024 a >2048 μ g/mL para pravastatina.

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima das estatinas sobre espécies do complexo *S. schenckii* na forma leveduriforme.

Espécies(n)	SINVASTATINA		ATORVASTATINA		PRAVASTATINA	
	CIM 50%	CFM	CIM 50%	CFM	CIM 50%	CFM
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=7)						
Range	8 - 32	64 - >64	8 - 64	64 - >512	128 - 256	1024 - >2048
GM	17,7	64	13,1	337,8	210	1024
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)						
Range	32	>64	64	>512	256	>2048
GM	32	>64	64	>512	256	>2048
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)						
Range	2 – 16	64 - >64	8 - 64	256 – 512	128 - 256	1024 - >2048
GM	6,7	64	27	430,5	215,3	1024
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=2)						
Range	32	>64	16	>512	128 - 256	2048
GM	32	>64	16	>512	181	2048

Legenda: GM: média geométrica; CIM: Concentração inibitória mínima (mg/l); CFM: concentração fungicida mínima (mg/l).

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima dos antifúngicos sobre espécies do complexo *S. schenckii* na forma leveduriforme.

Espécies(n)	ANFOTERICINA B		ITRACONAZOL		TERBINAFINA	
	CIM 100%	CFM	CIM 100%	CFM	CIM 80%	CFM
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=7)						
Range	0,12 – 0,5	0,125 – 1	0,25 – 0,5	0,25 - >16	0,03 – 0,12	0,03 – 0,12
GM	0,25	0,16	0,34	0,84	0,1	0,1
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)						
Range	0,03 – 0,25	2 – 4	0,03 – 0,25	16 - >16	0,03	0,12
GM	0,1	2,8	0,1	16	0,031	0,12
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)						
Range	0,12 – 0,5	0,5 – 2	0,25 - 1	8 - >16	0,03 – 0,12	0,03 – 0,5
GM	0,30	1,2	0,42	12,7	0,1	0,2
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=2)						
Range	0,06	0,06	0,5	>16	0,03	0,03
GM	0,06	0,06	0,5	>16	0,03	0,03

Legenda: GM: média geométrica; CIM: Concentração inibitória mínima (mg/l); CFM: concentração fungicida mínima (mg/l).

6.2 Interação de pravastatina e antifúngicos frente *Sporothrix* spp. na forma filamentosa

Os testes de interação foram feitos em 10 cepas (04 *S. brasiliensis*, 02 *S. schenckii stricto sensu*, 02 *S. mexicana* e 02 *S. globosa*), com base nos resultados obtidos para a forma filamentosa, as combinações entre pravastatina e itraconazol, anfotericina B e terbinafina apresentaram indiferença farmacológica. Não sendo evidenciada nenhuma interação antagônica nas combinações testadas.

Tabela 6 – Índice de concentração inibitória fracionada de pravastatina e antifúngicos frente *Sporothrix* spp. na forma filamentosa

Espécie (n)	Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)							Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)		
	Drogas isoladas				Drogas combinadas			PRA +	PRA +	PRA +
	PRA	AMB	ITC	TRB	PRA/AMB	PRA/ITC	PRA/TRB	AMB	ITC	TRB
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=4)	512	2	0,25	0,125	16/2	256/0,5	256/0,125	1,03 ¹	2,5 ¹	1,5 ¹
	256	2	0,5	0,25	16/2	256/0,5	128/0,12	1,06 ¹	2 ¹	1 ¹
	512	2	1	0,06	256/1	32/1	512/0,06	1 ¹	1,06 ¹	2 ¹
	128	4	2	0,25	64/2	64/2	32/0,25	1 ¹	1,5 ¹	1,25 ¹
<i>Sporothrix schenckii s. s.</i> (n=2)	512	1	0,25	0,25	16/2	256/0,5	64/0,5	2,03 ¹	2,5 ¹	2,12 ¹
	256	1	0,5	0,125	128/1	256/0,5	64/125	1,5 ¹	2 ¹	1,25 ¹
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)	512	0,25	0,25	0,06	256/0,5	256/0,5	512/0,06	2,5 ¹	2,5 ¹	2 ¹
	512	0,25	0,25	0,06	256/0,5	256/0,5	256/0,06	2,5 ¹	2,5 ¹	1,5 ¹
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=2)	512	1	0,5	0,125	16/2	256/0,5	256/0,125	2,03 ¹	1,5 ¹	1,5 ¹
	128	1	2	0,25	16/2	64/2	32/0,5	2,12 ¹	1,5 ¹	2,25 ¹

Legenda: PRA: Pravastatina; AMB: Anfotericina B; ITC: Itraconazol; TRB: Terbinafina. ¹: Interação indiferente.

6.3 Efeito das estatinas sobre biofilmes de *Sporothrix* spp.

Na avaliação do efeito das estatinas sobre os biofilmes da forma filamentosa de *Sporothrix* spp., observou-se que sinvastatina apresentou CIMB_{50%} variando de <128 a >2048 µg/mL, <128 – 256 µg/mL, 512 µg/mL e 128 a 512 µg/mL para as cepas de *S. brasiliensis*; de *S. schenckii stricto sensu*; de *S. globosa*; e de *S. mexicana*, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as CIMB_{50%} de sinvastatina e dos antifúngicos, nem entre as CIMB_{90%} de sinvastatina e as de itraconazol e anfotericina B (Tabela 6).

Atorvastatina apresentou CIMB_{50%} variando de 128 a >512 µg/mL, 512 a >512 µg/mL, 512 µg/mL, 512 a >512 µg/mL para as cepas de *S. brasiliensis*; de *S. schenckii stricto sensu*; de *S. globosa*; e de *S. mexicana*, respectivamente. Pravastatina não apresentou CIMB_{50%} nas concentrações testadas. Para as drogas antifúngicas apresentou CIMB_{50%} de 32 a 128 µg/mL para anfotericina B, 64 a 128 µg/mL para itraconazol e 4 a 64 µg/mL para terbinafina para as cepas de *S. brasiliensis*; de *S. schenckii stricto sensu*; de *S. globosa*; e de *S. mexicana*, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima das estatinas e dos antifúngicos sobre biofilmes das espécies do complexo de espécies *S. schenckii* na forma filamentosa.

Espécies(n)	SIN		ATO		PRA		AMB		ITC		TRB	
	CIMB 50%	CIMB 90%	CIMB 50%	CIM B 90%	CIMB 50%	CIMB 90%	CIMB 50%	CIM B 90%	CIMB 50%	CIMB 90%	CIMB 50%	CIMB 90%
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=8)												
Range	<128 - >2048	512 - >2048	128 - >512	>2048	>2048	>2048	16 – 64	64 - 128	16 – 64	64 - 128	1 - 8	4 - 64
GM	181	861,1	337,8	> 2048	> 2048	> 2048	34,9	111,4	32	111,4	2,8	12,1
<i>Sporothrix globosa</i> (n=2)												
Range	512 - 2048	>2048	512	>2048	>2048	>2048	32	64 - 128	32	128	4	8
GM	1024	>2048	512	> 2048	> 2048	> 2048	32	90,5	32	128	4	8
<i>Sporothrix mexicana</i> (n=4)												
Range	128 - 512	512 - >2048	512 - >512	>2048	>2048	>2048	16 – 64	32 - 128	16 – 32	64 - 128	8 - 16	16 - 64
GM	362	512	512	> 2048	> 2048	> 2048	38,1	76,1	22,6	107,6	9,5	26,9
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=4)												
Range	<128 - 2048	>2048	512 - >512	>2048	>2048	>2048	16 – 32	32 - 128	16 – 32	64 - 128	8 - 16	16- 32
GM	161,3	>2048	512	> 2048	> 2048	> 2048	27	64	19	90,5	9,5	23

65

Legenda: SIN: Sinvastatina; ATO: Atorvastatina; PRA: Pravastatina; AMB: Anfotericina B; ITC: Itraconazol; TRB: Terbinafina. GM: Média Geométrica. CIMB50% e CIMB90%: CIM sobre biofilme (mg/l) capaz de inibir 50% e 90% da atividade metabólica do biofilme quando comparado ao controle de crescimento, respectivamente.

7 DISCUSSÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea com crescente surgimento de casos no Brasil e no mundo, com diversos casos de epidemias ao longo dos anos e com crescente casos de tranmissões zoonóticas evidenciando assim a necessidade de expansão do arsenal terapêutico para essa doença (QUEIROZ-TELLES et al., 2019).

Estudos anteriores descreveram desafios para o tratamento da esporotricose, reforçando a necessidade de medicamentos eficazes. No entanto, a produção de novos fármacos é um processo lento e de custo elevado, conseqüentemente, o reposicionamento de drogas é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas terapias (NYILASI et al., 2013).

O complexo *Sporothrix schenckii* é formado por diferentes espécies consideradas patogênicas que constituem o complexo *Sporothrix schenckii*, são elas: *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, *S. schenckii stricto sensu*, *S. luriei* e *S. pallida* sendo as espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii* as de maior prevalência no Brasil e mais relacionadas a infecção humana e a transmissão zoonótica, sendo classificadas como mais virulentas (RODRIGUES et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2016b BRILHANTE et al., 2016). As espécies que compõem o complexo *S. schenckii* é composta por fungos termodimórficos, no qual, possuem morfologias distintas dependendo da temperatura que estejam inseridos. Apresentando a forma micelial quando estão a temperatura ditas ambientais (entre 25-28°C) e quando estão em temperaturas de aproximadamente 37 °C, se apresentam leveduriforme (RODRIGUES et al., 2016).

Estudos *in vitro* relatam que *Sporothrix* spp. na forma filamentosa tem capacidade de formar biofilme (SÁNCHEZ-HERRERA et al., 2014; BRILHANTE et al., 2017). *Sporothrix* pode apresentar diversas adaptações para sobreviver em diferentes ambientes, dentre eles a formação de biofilme (BRILHANTE et al., 2018). Os biofilmes são determinados como comunidades sésseis, aderidas a um substrato biótico ou abiótico, recobertas por uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (RAMAGE et al., 2012). Em geral a habilidade de formar biofilme leva os micro-organismos a uma maior virulência, pois permite aos envolvidos sobreviverem a ambientes hostis, como mudança de pH, desidratação, substâncias químicas, dentre outros. Acredita-se também que grande parte das infecções microbianas em seres humanos e animais são provocadas por micro-organismos nesse tipo de associação, no qual podem apresentar maior refratariedade ao tratamento com antimicrobianos convencionais (BRILHANTE et al., 2014; NET; ANDES, 2015; MITCHELL et al., 2016). Com isso, é de

grande importância o estudo de fármacos que atuem não só frente a forma planctônica, como no biofilme.

Este estudo avaliou a atividade inibitória das estatinas sobre o crescimento fúngico das espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu strict*, *S. globosa* e *S. mexicana* do complexo *S. schenckii* contra células planctônicas e biofilmes, nas formas filamentosa e leveduriforme. Os testes em células planctônicas foram realizados nas duas formas, pois, segundo Borba-Santos et al. (2015b), ambas apresentaram diferentes perfis de sensibilidade aos antifúngicos.

Inicialmente obtivemos as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das cepas em crescimento planctônico. Os resultados obtidos para as drogas antifúngicas anfotericina B, itraconazol e terbinafina estão na mesma faixa de concentrações descrita por outros estudos (ALMEIDA-PAES et al., 2016a; BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2018). O efeito antifúngico de sinvastatina, atorvastatina e pravastatina no crescimento planctônico de *Sporothrix* spp. foi observado, assim como em estudos anteriores, pois sinvastatina e a atorvastatina foram descritas causando inibição em espécies de *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, dentre outros microrganismos (QIAO et al., 2007; BRILHANTE et al., 2015). Nesse estudo a ação antifúngica das estatinas afetou as duas formas de crescimento de *Sporothrix* spp, tendo a forma leveduriforme apresentado CIMs em torno de 4 vezes menor que as obtidas para a forma filamentosa, o que corrobora com Brilhante et al. (2018b). Essa diferença na sensibilidade entre as formas de *Sporothrix* spp. já foi relatada anteriormente e possivelmente está relacionada com a presença de melanina na parede celular deste fungo, pois age protegendo o microrganismo contra drogas antifúngicas, sendo produzida em menor quantidade pela forma leveduriforme em relação à forma filamentosa (ALMEIDA-PAES et al., 2017, SANCHOTENE et al., 2017).

Em relação a sinvastatina e atorvastatina, pravastatina apresentou maiores CIMs. Tal resultado pode estar relacionado a diferenças em suas características químicas, já que sinvastatina e pravastatina são formas semisintéticas, derivadas de lovastatin, e atorvastatina é a forma sintética pura (HOFFMAN et al., 1986; GRAZIANO et al., 2015). Entretanto, sinvastatina e atorvastatina, assim como lovastatina, cerivastatina, fluvastatina e pitavastatina são lipofílicas, enquanto pravastatina é hidrofílica, o que pode explicar maior atividade de sinvastatina e atorvastatina, pois a membrana celular fúngica é lipoproteica e apresenta maior afinidade com moléculas lipofílicas, facilitando assim a entrada da molécula na célula (GRAZIANO et al., 2015; LIU et al., 2019).

Em relação às interações de estatinas com antifúngicos, estudos anteriores relataram efeitos sinérgicos e antagônicos *in vitro* dessa associação (NYILASI et al., 2013). Devido a esse

dado, buscou-se pesquisar a interação da pravastatina com os antifúngicos clássicos usados no tratamento da esporotricose, tendo sido escolhida por não haver relatos de toxicidade de seu uso concomitante a utilização de antifúngicos (anfotericina B, itraconazol e terbinafina), porém essas drogas apresentaram interações indiferentes. Entretanto, o fato de a interação ser indiferente é um dado importante, pois pode-se investir no estudo da utilização da pravastatina já que a mesma pode ser utilizada concomitante a utilização de antifúngicos e obteve resultado *in vitro* frente a forma planctônica.

Brilhante et al. (2018a, 2018b) mostraram que *Sporothrix* spp. são capazes de formar biofilmes tanto na forma filamentosa quanto na leveduriforme, sendo considerado um importante fator de virulência para *Sporothrix* spp. associado ao aumento da tolerância às drogas antifúngicas. Devido a isso, é importante o estudo de drogas que sejam capazes de destruir os biofilmes formados. Sinvastatina tem ação inibitória sobre biofilmes formados de *Sporothrix* spp., assim como em células planctônicas, sendo CIMB₅₀ e CIMB₉₀ de sinvastatina semelhante estatisticamente aos antifúngicos testados, demonstrando que a ação dessas drogas nos biofilmes de *Sporothrix* spp. nas concentrações testadas é semelhante a ação dos antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose, o que corrobora com a possível realocação desses fármacos para o tratamento dessa doença.

Foram observados que as CIMB₅₀ foram maiores que as CIMs da sensibilidade planctônica, demonstrando o aumento da tolerância dos biofilmes às drogas testadas. Apesar de formar biofilmes em ambas as formas, biofilmes das formas filamentosas são mais complexos e possuem maior número de camadas que biofilmes de leveduras de *Sporothrix* spp. (BRILHANTE et al., 2018c). Além disso, a forma filamentosa é responsável por manter o ciclo biológico de disseminação deste fungo, por isso foi avaliado o efeito das estatinas sobre esta forma de crescimento.

O uso de estatinas desregula a produção celular de isoprenóide, que leva à disfunção mitocondrial, déficit respiratório, alterações na estrutura lipídica e na dinâmica da membrana plasmática das células de *C. albicans*, o que pode também acontecer em célula de *Sporothrix* spp., podendo ser os possíveis mecanismos responsáveis pela redução do biofilme e inibição de células planctônicas (GYETVAI et al., 2006; CABRAL et al., 2013).

As estatinas em células de mamíferos agem na extremidade proximal da via do mevalonato, inibindo a HMG-CoA redutase, diminuindo assim a síntese imediata da biossíntese de mevalonato e colesterol (PARIHAR et al., 2018). Hipotetizamos que o mesmo possa

acontecer na biossíntese do ergosterol, principal esterol presente da membrana fúngica, o que pode explicar a presença de células mortas ou com dano na membrana celular.

Esporotricose está presente em regiões em que a grande maioria da população se enquadra como baixa renda e com estrutura sanitária precária, o que enfatiza a importância de uma terapêutica que vise custo-efetividade, já que é um tratamento longo, no qual existem relatos de recidivas da doença seja por resistência as drogas às utilizadas ou por abandono do tratamento (SHINOGI et al., 2004, BARROS et al., 2011, MACEDO et al., 2014, PAIXÃO et al., 2015, VETTORATO et al., 2018). Neste contexto, o possível uso das estatinas no tratamento da esporotricose seria de grande benefício.

Embora o uso das estatinas como potenciais antifúngicos tenha sido analisado em outros estudos *in vitro*, este é um estudo pioneiro sobre a atividade inibitória envolvendo espécies do complexo *S. schenckii* ante a sinvastatina, atorvastatina e pravastatina. Também é o primeiro ensaio de microdiluição em caldo apresentando CIM e CFM das estatinas frente a *S. schenckii* nas suas duas formas filamentosa e leveduriforme.

Em suma, sinvastatina e atorvastatina apresentam atividade antifúngica contra células planctônicas do complexo *S. schenckii* nas formas filamentosa e leveduriforme; e contra biofilmes da forma filamentosa de *Sporothrix* spp. Ademais, pravastatina mostrou interações indiferentes com anfotericina B, itraconazol e terbinafina. Diante do exposto, o presente estudo torna-se importante para nortear e estruturar futuros estudos *in vivo* para melhor entender os processos envolvidos na ação das estatinas sobre espécies do complexo *S. schenckii* e as possíveis aplicações clínicas desses medicamentos.

8 CONCLUSÕES

- a) Sinvastatina, atorvastatina e pravastatina possuem atividade antifúngica sobre as formas planctônicas de espécies do complexo *S. schenckii* nas fases filamentosa e leveduriforme;
- b) Pravastatina apresenta interações indiferentes frente as espécies do complexo *S. schenckii* quando combinada com anfotericina B, itraconazol e terbinafina;
- c) Sinvastatina e atorvastatina possuem atividade antifúngica sobre biofilmes da forma filamentosa de espécies do complexo *S. schenckii*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H. L.; LETTNIN, C. B. E.; BARBOSA, J. L.; DIAS, M. C. F. Spontaneous resolution of zoonotic sporotrichosis during pregnancy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 237–238, 2009.
- ALMEIDA-PAES, R.; BRITO-SANTOS, F.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; MACHADO, A. C. S.; OLIVEIRA, M. M. E.; PEREIRA, S. A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 5, p. 376–381, 2017.
- 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. **PLoSOne**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2016a.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M.; FREITAS, D. F.; VALLE, A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to *in vivo* resistance. **Medical Mycology**, v. 55, n. 5, p. 507–517, 2016b.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, doi: 10.1371/journal.pntd.0003094, 2014.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMedResearchInternational**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- ARAM, H. Sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, v. 25, n. 3, p.203-206, 1986.
- BARILE, F.; MASTROLONARDO, M.; LOCONSOLE, F.; RANTUCCIO, F. Cutaneous sporotrichosis in the period 1978–1992 in the province of Bari, Apulia, Southern Italy. **Mycoses**, v. 36, n. 5, p. 181–185, 1993.
- BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; OLIVEIRA, R. V. C.; MARTINS, E. B.; TEIXEIRA, J. L.; WANKE, B. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole--study of 645 patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 12, p. 200-206, 2011.
- BARROS, M. B. D. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p.633-654, 2011.
- BAZZI, T.; MELO, S. M. P.; 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.

BERGMAN, P. W.; BJÖRKHEM-BERGMAN, L. Is there a role for statins in fungal infections? **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 12, p. 1391–1400, 2013.

BONIFAZ, A.; ROJAS-PADILLA, R.; TIRADO-SÁNCHEZ, A.; PONCE, R. M. Sporotrichosis: The-State-of-The-Art. **Medical Mycology**, p. 234–253, 2016.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 6, p. 1–13, 2017.

BORBA-SANTOS, L. P.; VISBAL, G.; GAGINI, T.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ROZENTAL, S. Δ 24-Sterol methyltransferase plays an important role in the growth and development of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 311, 2016b.

BORBA-SANTOS, L. P.; DE SÁ, L. F. R.; RAMOS, J. A.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; ROZENTAL, S.; FERREIRA-PEREIRA, A. Tacrolimus increases the effectiveness of itraconazole and fluconazole against *Sporothrix* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1759, 2017.

BRAULT, M.; RAY, J.; GOMEZ, Y. H.; MANTZOROS, C. S.; DASKALOPOULOU, S. S. Statin treatment and new-onset diabetes: a review of proposed mechanisms. **Metabolism**, v. 63, n. 6, p. 735–745, 2014.

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. S. C.; CORREIA, E. E. M.; PEREIRA-NETO, W. A.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. **Medical Mycology**, v. 56, n. 3, p. 297–306, 2018a.

BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, E. P.; OLIVEIRA, J. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C.; SOUZA, E. R. Y.; ALENCAR, L. P.; CORDEIRO, R. A.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 459–465, 2015.

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.; DE CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Medical Mycology**, doi: 10.1093/mmy/myy119., 2018c.

BRILHANTE, R. S.; PEREIRA, V. S.; OLIVEIRA, J. S.; LOPES, R. G.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO, Z. P.; PEREIRA-NETO, W. A.; CASTELO-BRANCO, D. S.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future Microbiology**, v.13, p. 1129–1140, 2018b.

- BOLTZ, J. P.; SMETS, B. F.; RITTMANN, B. E.; VAN LOOSDRECHT, M. C.; MORGENROTH, E.; DAIGGER, G. T. From biofilm ecology to reactors: a focused review. **Water Science and Technology**, v. 75, n. 8, p. 1753-1760, 2017.
- BORGHI, E.; BORGIO, F.; MORACE, G. Fungal biofilms: update on resistance. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 931, p. 37-47, 2016.
- CARNERO, L. C. G.; PÉREZ, N. E. L.; HERNÁNDEZ, S. E. G.; ÁLVAREZ, J. A. M. Immunity and treatment of sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p.1-14, 2018.
- CARRADA-BRAVO, T.; OLVERA-MACÍAS, M. I. New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis 2. Ecological niches of *S. schenckii* and zoonotic outbreaks. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica**, v. 60, n. 1, p. 5-24, 2013.
- CASADEVALL, A. Cards of virulence and the global virulome for humans. **Microbe-American Society for Microbiology**, v. 1, n. 8, p. 359, 2006.
- CASADEVALL, A. Amoeba provide insight into the origin of virulence in pathogenic fungi. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 710, p. 1-10, 2012.
- CASTREJÓN, O. V.; ROBLES, M.; ARROYO, O. E. Fatal fungaemia due to *Sporothrix schenckii*. **Mycoses**, v. 38, n. 9-10, p. 373–376, 1995.
- CASTRO, V. S., DA SILVA, A. S., COSTA, M. M., PAIM, F. C., ALVES, S. H., LOPES, S. T.; DUARTE, M. M. Cholinergic enzymes and inflammatory markers in rats infected by *Sporothrix schenckii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 94-102, 2016.
- CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **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, 2008a.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition**. CLSI document M27A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2008b.
- COSTA, R. O.; MACEDO, P. M. DE; CARVALHAL, A.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 396–402, 2013.
- CORDEIRO, F. N.; PAULA, C. D. R.; BRUNO, C. B.; MOTTA, J. O. C. Orientação familiar esporotricose zoonótica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 121-124, 2011.
- CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 08-28, 2013.

- DA ROSA, A. C. M., SCROFERNEKER, M. L., VETTORATO, R., GERVINI, R. L., VETTORATO, G., WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 451-459, 2005.
- DAVIES, J.T.; DELFINO, S.F.; FEINBERG, C.E.; JOHNSON, M.F.; NAPPI, V.L.; OLINGER, J.T.; SCHWAB, A.P.; SWANSON, H.I. Current and emerging uses of statins in clinical therapeutics: a review. **Lipid Insights**, v. 9, p.13-29, 2016.
- DE BEURMANN, L.; GOUGEROT, H.; VAUCHER, A. B. Sporotrichose expérimentale du chat. **Comptes Rendus Des Seances La Société de Biologie**. v.66, n.1, p.370-372, 1909.
- DE MEYER, E. M.; SUMMERBELL, R. C.; MOHARRAM, A. M.; DE HOOG, G. S.; ISMER, H. F.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy and phylogeny of new wood and soil-inhabiting *sporothrix* species in the *Ophiostomasteno-ceras – Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**. v.100, n. 4, p.647-661, 2008.
- DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. v. 2009, 642502, 2019.
- DINESH, N.; SOUMYA, N.; SINGH, S. Antileishmanial effect of mevastatin is due to interference with sterol metabolism. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p. 3873-3883, 2015.
- DIXON, D.M.; SALKIN, I.F.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J.; HAINES, J.H.; KEMNA, M.E.; COLES, F.B. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.6, p.1106-1113, 1991.
- DOOLEY, D.P.; BOSTIC, P.S.; BECKIUS, M.L. Spook house sporotrichosis. A point-source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in a Halloween haunted-house. **Archives in Medical**, v.157, n.16, p.1885-1887, 1997.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Review. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-33, 2010.
- FERNÁNDEZ-SILVA, F.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; GUARRO, J. Virulence of *Sporothrix luriei* in a murine model of disseminated infection. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 245-249, 2012.
- FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F.; DA SILVA, M. B. T.; CAMPOS, D. P.; LYRA, M. R.; DE SOUZA, R. V.; VELOSO, V. G.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; BASTOS, F. I.; GALHARDO, M. C. G. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, doi: 10.1371/journal.pntd.0003110, 2014.
- FREITAS, D. F. S.; LIMA, M. A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; LAMAS, C. C.; DO VALLE, A. C. F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; GUTIERREZ-

GALHARDO, M. C. Sporotrichosis in the central nervous system caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 4, p. 663–664, 2015.

FREITAS, D.; MIGLIANO, M.; ZANI NETO, L. Esporotricose: Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo**, v. 5, n. 4, p. 601–604, 1956.

GEZUELE, E.; DA ROSA, D. Importance of the sporotrichosis asteroid body for therapid diagnosis of sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, n. 3, p. 147–150, 2005.

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.

GOMPERTZ, O. I.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; BENTUBO, H. D.; DE CAMARGO, Z. P.; PETRI, V. Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to itraconazole. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1218-1222, 2016.

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.

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

GREMIÃO, I. D.; MIRANDA, L. H.; REIS, E. G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **Plos Pathogens**, v.13, n.1, p.1-7, 2017.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungaltaxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

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

HELM, M. A. F.; BERMAN, C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. In: **Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association. Sporotrichosis Infection on Mines of the Witwatersrand**. Johannesburg: The Transvaal Chamber of Mines; p. 59-74., 1947.

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

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

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; WU, S.; LIN, J.; KIM, J. A.; CALVO, C. R. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* from China, Korea and Spain. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**. v. 45, n. 1, p. 23-25, 2004.

KO, H. H. T.; LAREU, R. R.; DIX, B. R.; HUGHES, J. D. In vitro antibacterial effects of statins against bacterial pathogens causing skin infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 6, p. 1125–1135, 2018.

KWON-CHUNG, K., BENNET, J. Sporotrichosis. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, **Medical Mycology**, p. 707-729, 1992.

LACAZ, C. D. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.; MELO, N. T. D. Guia de identificação fungos, actinomicetos, algas de interesse médico. In: **Guia de identificação fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. Sarvier, 1998.

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

LESZCZYNSKA, A.; BURZYNSKA, B.; PLOCHOCKA, D.; KAMINSKA, J.; ZIMNICKA, M.; KANIA, M.; KILISZEK, M.; WYSOCKA-KAPCINSKA, M.; DANIKIEWICZ, W.; SZKOPINSKA, A. Investigating the effects of statins on cellular lipid metabolism using a yeast expression system. **PLoS One**, v.4, n. 12, doi: 10.1371/journal.pone.0008499, 2009.

LI, P.; PU, X.; FENG, B.; YANG, Q.; SHEN, H.; ZHANG, J.; LIN, B. FocVell influences asexual production, filamentous growth, biofilm formation, and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 312, 2015.

LIU, A.; WU, Q.; GUO, J.; ARES, I.; RODRÍGUEZ, J. L.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; YUAN, Z.; ANADÓN, A.; WANG, X.; MARTÍNEZ, M. A. Statins: adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 195, p. 54-84, 2019.

LONDERO, A. T.; RAMOS, CECY D. Esporotricose no Rio Grande do Sul: Três décadas de observação. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 64, n. 6, p. 307-10, 1989.

LOPES, J. O., ALVES, S. H., MARI, C. R., BRUM, L. M., WESTPHALEN, J. B., ALTERMANN, M. J., PRATES, F. B. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 541-545, 1999.

LOPES-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M.; BONIFAZ, A. *Sporothrix* and Sporotrichosis. **Current Progress Medical Mycology**, v. 2017, p. 309–331, 2017.

LOPES-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M.; ZHANG, Y.; NINO-VEJA, G.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; DE HOOG, S. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p.126-143, 2018.

LÓPEZ-ROMERO, E.; DEL ROCÍO REYES-MONTES, M.; PÉREZ-TORRES, A.; RUIZ-BACA, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; MORA-MONTES, H. M.; FLORES-CARREÓN, A.; TORIELLO, C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future 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.

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

MCFARLAND, A. J.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; ARORA, D. S.; GRANT, G. D.; MCDERMOTT, C. M.; PERKINS, A. V.; DAVEY, A. K. Molecular mechanisms underlying the effects of statins in the central nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20607–20637, 2014.

MACIEJAK, A.; LESZCZYNSKA, A.; WARCHOL, I.; GORA, M.; KAMINSKA, J.; PLOCHOCKA, D.; WYSOCKA-KAPCINSKA, M.; TULACZ, D.; SIEDLECKA, J.; SWIEZEWSKA, E.; SOJKA, M.; DANIKIEWICZ, W.; ODOLCZYK, N.; SZKOPINSKA, A.; SYGITOWICZ, G.; BURZYNSKA, B. The effects of statins on the mevalonic acid pathway in recombinant yeast strains expressing human HMG-CoA reductase. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

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 and Infection**, v. 12, n. 2, p. 162–165, 2010.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v. 1, n. 272376, p. 1–13, 2014.

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

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

MARQUES-MELO, E. H.; LESSA, D. F. DA S.; GARRIDO, L. H. A.; NUNES, A. C. B. T.; CHAVES, K. P.; PORTO, W. J. N.; NOTOMI, M. Felino doméstico como agente transmissor

de esporotricose para humano - relato do primeiro caso no estado de alagoas. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 490–498, 2014.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.

MELLO, C. X. DE; SCHUBACH, A. DE O.; MADEIRA, M. DE F. Canyeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 127, 2011.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v. 1, p. 1–13, 2014.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. Fungal Super Glue: The biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005828, 2016.

NETT, J. E.; ANDES, D. Fungal biofilms: in vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 30, 2015.

NUNES, G. D. L.; CARNEIRO, R. S.; FILGUEIRA, K. D.; FILGUEIRA, F. G. F.; FERNANDES, T. H. T. Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 2, p. 157-161, 2013.

NYILASI, I.; KOCSUBÉ, S.; KRIZSÁN, K.; GALGÓCZY, L.; PAPP, T.; PESTI, M.; NAGY, K.; VÁGVÖLGYI, C. Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. **Medical Mycology**, v. 52, p. 140–148, 2013.

ODDS, F. C. 2003. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 5, p.1, 2003.

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

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

OROFINO-COSTA, R.; DE MACEDO, P. M.; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p.606-620, 2017.

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.

- PAIXÃO, A. G.; GALHARDO, M. C. G.; ALMEIDA-PAES, R.; NUNES, E. P.; GONÇALVES, M. L. C.; CHEQUER, G. L.; LAMAS, C. DA C. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. **AIDS Research and Therapy**, v. 12, p. 16, 2015.
- PARIHAR, S. P.; GULER, R.; BROMBACHER, F. Statins: a viable candidate for host-directed therapy against infectious diseases. **Nature Review Immunology**, v. 19, n. 2, p. 104-117, 2018.
- PEREIRA, S.A.; GREMIÃO, I.D.; KITADA, A.A.; BOECHAT, J.S.; VIANA, P.G.; SCHUBACH, T.M. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, n.3, p.392-393, 2014.
- RAMOS, A. C. M. O.; OLIVEIRA, I. V. P. M.; REIS-LIMA, R. K.; DE PAULA, V. V.; FILGUEIRA, K. D. Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in north eastern Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 11, n. 1, p. 79–84, 2017.
- REIS-GOMES, A.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B.; TELLES, A. J.; WALLER, S. B.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 272–284, 2012.
- 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.
- RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383-387, 2014.
- RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. **Plos Pathogens**, v. 12, n. 7, e1005638, 2016.
- RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z. P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 5, doi: 10.1038/emi.2014.33., 2014b.
- 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, e2281, 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 in Brief**, v. 2, p. 32–38, 2015a.

ROILIDES, E.; SIMITSOPOULOU, M.; KATRAGKOU, A.; WALSH, T. J. How biofilms evade host defenses. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, 2015.

RUDRAMURTHY, S. M.; CHAKRABARTI, A. Sporotrichosis: Update on Diagnostic Techniques. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, p. 134–140, 2017.

SAMPAIO, S. A. P.; LACAZ, C. da S.; ALMEIDA, F. Aspectos clínicos da esporotricose em São Paulo. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 9, p. 391-402, 1954.

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

SASAKI, A.A.; FERNANDES, G.F.; RODRIGUES, A.M.; LIMA, F.M.; MARINI, M.M.; DOS S FEITOSA, L.; DE MELO TEIXEIRA, M.; FELIPE, M.S.; DA SILVEIRA, J.F.; DE CAMARGO, Z.P. Chromosomal polymorphism in the *Sporothrix schenckii* complex. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, e86819, 2014.

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

SCORDINO, F.; PERNICE, I.; PASSO, C. L. O.; GALBO, R.; MEDICI, M. A.; CRISEO, G.; ROMEO, O. Antifungal susceptibilities of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Italy. **Journal of Biology Research**, v. 88, p. 139–140, 2015.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 396 p., 2004.

SILVA, M.B.T.; COSTA, M.M.M.; TORRES, C.C.S.; GALHARDO, M.C.G.; VALLE, A.C.F.; MAGALHÃES, M.A.F.M.; SABROZA, P.C; OLIVEIRA, R.M.; Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saude Pública**, v.28, n.10, p.1867-1880, 2012.

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

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, 2004.

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

TÉLLEZ, M.D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS, I.Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v. 160, p. 2352-2365, 2014.

VALENTÍN, A.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; FERNANDEZ-RIVERO, M. E.; TORMOMAS, M. A.; MARTÍNEZ, J. P. *In vitro* activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 3449–3452, 2016.

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

VETTORATO, R.; HEIDRICH, D.; FRAGA, F.; RIBEIRO, A. C.; PAGANI, D. M.; TIMOTHEO, C.; AMARO, T. G.; VETTORATO, G.; SCROFERNEKER, M. L. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: case report. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, p. 18-20, 2017.

VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm formation as a pathogenicity factor of medically important fungi. In: **Fungal Pathogenicity**. London: InTech, 2016.

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**, doi: 10.5772/23590, 2011.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A. M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L.; CHEN, M.; DENG, S. Phylogeography and devolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14000 human and animal case reports. **Persoonia Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 1–20, 2015.

ZHANG, Y. Q.; XU, X. G.; ZHANG, M.; JIANG, P.; ZHOU, X. Y.; LI, Z. Z.; ZHANG, M. F. Sporotrichosis: clinical and histopathological manifestations. **The America Journal of Dermatopathology**, v. 33, n. 3, p. 296–302, 2011.

ZHAO, M. D.; ZHOU, X.; LIU, T. T.; YANG, Z. B. Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 16, n. 11, p. 940-947, 2015.

ZHOU, Y.; YANG, H.; ZHOU, X.; LUO, H.; TANG, F.; YANG, J.; ALTEROVITZ, G.; CHENG, L.; REN, B. Lovastatin synergizes with itraconazole against planktonic cells and biofilms of *Candida albicans* through the regulation on ergosterol biosynthesis pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 12, p. 5255–5264, 2018.