



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALANNA MAYARA SOARES DE SOUSA

**EFEITOS INIBITÓRIOS DE LACTOFERRINA E INTERAÇÃO
FARMACOLÓGICA COM ANTIFÚNGICOS CLÁSSICOS
FRENTE A CEPAS DE *Sporothrix* spp.**

FORTALEZA

2022

ALANNA MAYARA SOARES DE SOUSA

EFEITOS INIBITÓRIOS DE LACTOFERRINA E INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA
COM ANTIFÚNGICOS CLÁSSICOS FRENTE A CEPAS DE *Sporothrix* spp.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

FORTALEZA

2022

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

S696e Sousa, Alanna Mayara Soares de.
Efeitos inibitórios de lactoferrina e interação farmacológica com antifúngicos clássicos frente a cepas de *Sporothrix* spp / Alanna Mayara Soares de Sousa. – 2022.
44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. Esporotricose. 2. Micologia. 3. Quelantes de ferro. 4. Sinergismo farmacológico. I. Título.

CDD 570

ALANNA MAYARA SOARES DE SOUSA

EFEITOS INIBITÓRIOS DE LACTOFERRINA E INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA
COM ANTIFÚNGICOS CLÁSSICOS FRENTE A CEPAS DE *Sporothrix* spp.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Biológicas do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 12/12/2022

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Germana Costa Paixão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

MSc. Anderson Da Cunha Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus. À minha mãe, Luzimar, que é minha
inspiração e força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me abençoar e dá forças para continuar nessa jornada, que apesar de árdua foi muito gratificante, por sempre iluminar meus passos e me cercar de pessoas boas!

À minha mãe, Luzimar, por tanto amor, dedicação e confiança que depositou em mim. Só nós sabemos o quanto foi difícil a caminhada até aqui, mas a senhora nunca me pediu para ir por outro caminho mesmo que fosse o mais seguro para nós. Obrigada por segurar as pontas em tudo o que fosse preciso, por ser minha maior inspiração, meu porto seguro. A senhora é o amor da minha vida. Todo meu esforço é por você!

Ao meu irmão, Alan, a quem tanto amo, por ser meu companheiro de vida mesmo com os desentendimentos; foi você quem Deus escolheu para ser o irmãozinho que eu sempre pedia.

Ao Pablo, meu amor, meu parceiro, meu maior incentivador, por nesses dez anos me ajudar com todo suporte físico, emocional e agora financeiro. Por aguentar os momentos de estresse, por se dedicar para que tenhamos conforto e qualidade de vida, por fazer o possível e o impossível para me ver feliz. Amo muito você, meu amor!

Ao meu pai, Raimundo, por me esperar na parada de ônibus durante o semestre que fiz à noite para que eu tivesse um pouco mais de segurança e por sempre falar com orgulho de mim, isso me motiva. Amo o senhor!

Às minhas tias, Lucimar e Lindomar, por toda torcida e ajuda em muitos momentos.

Aos meus sogros, Ana de Fátima e José Mauro, por todo carinho que têm comigo, por se fazerem presente, sempre dispostos a ajudar no que for preciso. Tenho sorte de fazer parte da família de vocês.

Aos meus melhores amigos, Álvaro, Cecília, Thays e João Pedro, por tudo que vocês representam para mim, por toda história que vivemos juntos nesses dezessete anos de amizade, por estarem comigo nos melhores e piores momentos da minha vida, pelo apoio mesmo que só para ouvir os desabaços, obrigada por todas as risadas e brigas, elas também foram importantes. Amo muito vocês, como o Álvaro diz: amo tanto que chega a doer.

Às melhores amigas que a Universidade poderia me dar, Isa Maria, Isadora Alexandre, Mariany Oliveira e Rebeca Morada por toda parceria, carinho e acolhimento nos assuntos da vida pessoal e acadêmica. Eu amo e admiro cada uma de vocês e sou eternamente grata a Deus por nossas vidas terem se encontrado. Com vocês a caminhada da graduação foi mais leve!

Aos biomigos mais incríveis que alguém pode ter, Carlos Henrique, Emerson Oliveira, Kaio César e Leandro Pontes. Obrigada pelas companhias, risadas e ensinamentos.

À minha orientadora, Prof.^a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por ter me acolhido no estágio supervisionado sem ao menos me conhecer, por ter confiado e me indicado para a bolsa PIBIC, pois sabemos o quanto é difícil sem um apoio financeiro, sou muito grata também por me deixar sob os cuidados de pessoas tão incríveis. Obrigada por ter me dado esta oportunidade de aprender e crescer profissionalmente.

Aos amigos maravilhosos que fiz no CEMM. Ao Anderson, por estar sempre disposto a responder minhas dúvidas e me ajudar nas escritas da vida, mesmo com muitas outras tarefas para realizar e pelas risadas bobas que tirava de mim. À Mirele e ao Feynman, por desde os primeiros dias me ensinarem tanto e confiarem no que sou capaz de fazer. Obrigada por toda a ajuda nos experimentos e por todos os risos que compartilhamos. Ao Igor e a Mabel, por serem meus amigos IC's favoritos. Vocês todos são maravilhosos, e sou muito feliz em tê-los encontrado.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental – LAMAB, minha primeira casa científica e onde vivi bons momentos. Agradecimento especial ao Leonardo Bandeira e à Prof.^a Suzana Cláudia Silveira Martins, por terem me ensinado os conhecimentos básicos em Microbiologia, por confiarem em mim até bem mais do que eu confiava e por terem apoiado quando decidi viver novas experiências. Eu sou muito grata por tudo que vocês me ensinaram. Obrigada de coração, por tudo!

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, agradeço por todos os ensinamentos e contribuições para a minha formação.

À Universidade Federal do Ceará e ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), por fornecerem a estrutura, equipamentos e materiais necessários para realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Cearense de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro dado.

“É o meu desejo mais sério que alguns de vocês continuem a fazer o trabalho científico e mantenham a ambição e a determinação de fazer uma contribuição permanente para a Ciência” (Marie Curie).

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, os quais necessitam de micronutrientes, dentre eles o íon ferro, para crescimento, expressão de fatores de virulência e execução de processos biológicos. Estudos demonstraram que a limitação de ferro por quelantes tem sido eficaz em inibir o crescimento de diversos fungos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do quelante lactoferrina (LF) e sua interação com drogas antifúngicas frente a cepas do complexo *S. schenckii*. Foram utilizadas 12 cepas de *Sporothrix* spp. nas formas filamentosa e leveduriforme (04 *S. brasiliensis*, 01 *S. globosa*, 04 *S. mexicana* e 03 *S. schenckii sensu stricto*). Os testes de sensibilidade foram realizados através do método de microdiluição em caldo em placas com 96 poços para as formas filamentosa e leveduriforme, enquanto o efeito da combinação do quelante com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina foi avaliada pelo método *checkerboard*. Os resultados foram lidos visualmente após o período de incubação de 72h a 35°C (para a fase filamentosa do fungo) e 96h a 37°C (para a forma leveduriforme do fungo). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de LF foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% de crescimento, para os antifúngicos a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% (AMB e TRB) ou 80% (ITC) do crescimento fúngico em comparação com o crescimento do controle sem droga. A glicoproteína LF apresentou atividade antifúngica em todas as cepas, com CIM variando de 16 a 64 µg/mL para a forma filamentosa e de 8 a 32 µg/ml para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. O quelante apresentou sinergismo com itraconazol em duas cepas, enquanto sua interação com anfotecina B foi indiferente, além disso, observou-se interações antagônicas entre LF e TRB. Conclui-se que a LF apresentou atividade antifúngica frente células planctônicas de *Sporothrix* spp., e interações variando de sinérgicas a antagônicas com os antifúngicos clássicos.

Palavras-chave: esporotricose; micologia; quelantes de ferro; sinergismo farmacológico.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by dimorphic fungi belonged to *Sporothrix schenckii* complex. Fungi require micronutrients for their growth, expression of virulence factors and making biological processes. The iron ion is an essential micronutrient for the survival of almost all eukaryotic organisms and has great relevance during fungal infections. Studies have shown that iron limitation by chelants has been effective in inhibiting the growth of various fungi. Thus, the present study aimed to evaluate the antifungal activity of lactoferrin chelator (LF) and its interaction with antifungal drugs in strains of the *S. schenckii* complex. Twelve strains of *Sporothrix* spp. were used in filamentous and yeast forms (04 *S. brasiliensis*, 01 *S. globosa*, 04 *S. mexicana* and 03 *S. schenckii sensu stricto*). Sensitivity tests were performed using the microdilution method in broth in plates with 96 wells for filamentous and yeast forms, and on how much the effect of combining chelator with antifungal amphotericin B (AMB), itraconazole (ITC) and terbinafine (TRB) was evaluated by the checkerboard method. The results were read visually after the incubation period of 72h to 35°C (filamentous) and 96h at 37°C (yeast). The Minimum Injuncton Concentration (MIC) of LF was defined as the lowest concentration capable of inhibiting 50% growth, for the antifungals the MIC was defined as the lowest concentration capable of inhibiting 100% (AMB and TRB) or 80% (ITC) of fungal growth compared with the growth of control without drug. The drug LF showed antifungal activity in all strains, with MIC ranging from 16 to 64 µg/mL for the filamentous form and from 8 to 32 µg/ml for the yeast form of *Sporothrix* spp. The chelator presented synergism with itraconazole in two strains, interaction between chelator and amphotericin B were indifferent, in addition, antagonistic interactions between LF and TRB were observed. It is concluded that LF have antifungal activity against planktonic cells of *Sporothrix* spp. and interactions ranging from synergistic to antagonistic with classical antifungals.

Keywords: sporotrichosis; mycology; iron chelating agents; drug synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global do complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	20
Figura 2 – Principais vias de transmissão da esporotricose	22
Figura 3 – Forma linfocutânea da esporotricose	23
Figura 4 – Forma cutânea localizada da esporotricose.....	24
Figura 5 – Lesões em gato com esporotricose.....	24
Figura 6 – Diferenças morfológicas em <i>Sporothrix</i> spp.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem e local de isolamento das cepas de espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> utilizadas neste estudo.	32
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima de lactoferrina frente às espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> na forma filamentosa.	35
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima de lactoferrina frente às espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> na forma leveduriforme.	36
Tabela 4 – Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionada de lactoferrina em combinação com antifúngicos, contra células planctônicas de <i>Sporothrix</i> spp., na forma filamentosa.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

AMB	Anfotericina B
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração inibitória mínima
CSLI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DFP	Deferiprona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
GMS	Coloração de metenamina de prata de Grocott-Gomori
HIV/AIDS	<i>Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
ITC	Itraconazol
ITS	Internal Transcribed Spacer
KOH	Hidróxido de potássio
LF	Lactoferrina
MALDI TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MOPS	Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico
mL	Militro
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCRq	<i>real time quantitative PCR</i>
PDA	Ágar batata dextrose
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RPMI	Meio suplementado (de <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SSP	Espécies
TRB	Terbinafina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 <i>Sporothrix</i> spp.	17
2.1.1 Aspectos taxonômicos.....	17
2.1.2 Aspectos Ecológicos	18
2.2 Esporotricose.....	19
2.2.1 Aspectos epidemiológicos.....	19
2.2.2 Fatores de Virulência	20
2.2.4 Patogenia da esporotricose	21
2.2.5 Manifestações Clínicas	23
2.2.6 Diagnóstico da esporotricose	25
2.2.7 Tratamento farmacológico	28
2.3 Lactoferrina como estratégia no controle das infecções por <i>Sporothrix</i> spp.	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 Local de estudo	32
4.2 Microrganismos	32
4.3 Quelante e drogas teste	33
4.4 Teste de sensibilidade antifúngica planctônica	33
4.5 Teste de interação entre drogas.....	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Ensaio de sensibilidade antifúngica planctônica	35
5.2 Sinergismos	36
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea, causada por fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, podendo acometer humanos e outros animais. As 4 espécies mais citadas causando essa infecção são: *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa* e *S. luriei* (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018). A esporotricose tem distribuição cosmopolita, tendo sido relatada ao redor de todo o mundo, com maior prevalência nas américas, especialmente no Brasil, onde o número de casos vem crescendo nos últimos anos, sendo considerada uma zoonose emergente importante (GREMIÃO *et al.*, 2017).

Para sobreviver no ambiente e no hospedeiro, as espécies do complexo *S. schenckii* expressam importantes atributos de virulência com destaque para a transição morfológica em resposta a temperatura, um meio importante pelo qual o fungo é capaz de infectar mamíferos (GARCIA-CARNERO; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, 2022), além da formação de biofilmes (BRILHANTE *et al.*, 2018) e produção de melanina (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2017).

A terapia utilizada para tratar esporotricose é diversa e depende da espécie etiológica, do estado imunológico do paciente e do tipo e extensão das lesões. O tratamento da doença se dá pela administração de solução saturada de iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina ou anfotericina B (RODRIGUES; HAGEN; DE CAMARGO, 2022), sendo esta última indicada para casos mais graves, como nas infecções extracutâneas e disseminadas (SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022). Em gestantes, idosos e indivíduos imunossuprimidos há dificuldade no manejo terapêutico (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022), em decorrência de fatores como: limitado arsenal de medicamentos, efeitos colaterais que fazem com que os tratamentos farmacológicos sejam contraindicados, falha terapêutica, especialmente em casos de esporotricose disseminada e extracutânea, e aumento da resistência a medicamentos em alguns isolados (SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022). Diante disso, enfatiza-se a grande necessidade da busca por novas moléculas com potencial antifúngico contra *Sporothrix* spp.

Os fungos necessitam de macro e micronutrientes para sobreviver em ambientes hostis e expressar seus fatores de virulência. O íon ferro é um micronutriente importante para diversos organismos, se constituindo em fator essencial para a sobrevivência, persistência e virulência durante infecções microbianas (MARTÍNEZ-PASTOR; PUIG, 2020). O ferro também é necessário em diversos processos bioquímicos e metabólicos como respiração celular, crescimento, síntese de DNA, biossíntese de proteínas e resistência a fármacos (NAIR, *et al.*, 2017).

No entanto, durante o processo infeccioso, o hospedeiro mamífero reduz a biodisponibilidade de ferro, isso o protege da toxicidade associada ao ferro livre e restringe o crescimento do patógeno microbiano (TRIPATHI *et al.*, 2020). Portanto, a competição por ferro estabelecida entre o patógeno e o hospedeiro é um dos principais determinantes do processo infeccioso e para sobreviver os fungos desenvolveram mecanismos especializados e eficazes para aquisição de ferro, como síntese e transporte de sideróforos, absorção redutora de ferro e mecanismos que usam heme e hemoglobina (BAIRWA; HEE JUNG; KRONSTAD, 2017).

Estudos já demonstram a ação de fármacos quelantes de metais contra leveduras de *Cryptococcus* spp. e fungos dimórficos como *Sporothrix* spp. (LAI *et al.*, 2016; BRILHANTE *et al.*, 2020). A lactoferrina é um peptídeo antimicrobiano multifuncional, participando da resposta imune com ação antiviral, antibacteriana e antifúngica, no entanto, destaca-se por sua grande afinidade pelo ferro (PALMA-RAMOS *et al.*, 2016). É produzida pelo tecido hematopoiético da medula óssea e por células epiteliais de diversas espécies de mamíferos, como consequência, é encontrada em grânulos de neutrófilos e na maioria das secreções exócrinas, como leite, lágrimas, secreções nasais, saliva e urina (ACOSTA-ZALDÍVAR *et al.*, 2016; SINHA *et al.*, 2013). Fernandes; Weeks e Carter (2020) demonstraram que esse quelante de ferro tem ação antifúngica promissora, possuindo ampla atividade antimicótica contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., apresentando também atividade sinérgica quando combinada ao antifúngico anfotericina B.

Contudo, não há estudos, *in vitro*, da sensibilidade de cepas do complexo *S. schenckii* à lactoferrina nem da interação farmacológica entre esse quelante e os principais antifúngicos de escolha para o tratamento de esporotricose. Dessa forma, este estudo propõe-se a investigar a ação de lactoferrina frente células planctônicas de *Sporothrix* spp. e seus sinergismos com anfotericina B, itraconazol e terbinafina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Sporothrix* spp.

2.1.1 Aspectos taxonômicos

A taxonomia de *Sporothrix* spp. no século XXI tornou-se uma tarefa árdua devido à grande sobreposição nas características fenotípicas desses fungos (RODRIGUES *et al.*, 2020). O primeiro relato da descrição clínica da esporotricose remonta a 1898 por Benjamin R. Schenck, que isolou o agente a partir de lesões nas mãos e braços de um paciente atendido no John Hopkins Hospital nos Estados Unidos (EUA). Schenck detalhou as características morfológicas, desenvolvimento e resultados das inoculações desse microrganismo (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; SCHENCK, 1898).

Em 1900, Hektoen e Perkins descrevem o segundo caso de esporotricose, também nos Estados Unidos (Chicago). Nesse caso, o paciente foi uma criança do sexo masculino que, após ser atingido com um martelo, apresentou uma lesão no dedo de regressão espontânea (RODRIGUES *et al.*, 2020). Esses pesquisadores denominaram o gênero *Sporothrix*, no entanto, o nome foi aplicado sem o fornecimento de sua diagnose e logo foi considerado inválido pela maioria dos pesquisadores daquela época (DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016; HEKTOEN; PERKINS, 1900). Assim, outros estudiosos, com base nas descrições fenotípicas realizadas por Schenck em 1898, classificaram o agente etiológico da esporotricose no gênero *Sporothrichum*, filo Basidiomycota e ordem Polyporales (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; SCHENCK, 1898).

Somente em 1962, com a reclassificação de Carmichael que o nome *Sporothrix* passou a ser gradativamente utilizado (DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016; CARMICHAEL, 1962). De acordo com a classificação taxonômica atual, o gênero *Sporothrix* está inserido na divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Ophiostomatales, família Ophiostomataceae (ROSSATO, 2017). Atualmente abriga 53 espécies já descritas, sendo *S. schenckii sensu stricto*; *S. brasiliensis*; *S. globosa* e *S. luriei*, as 4 espécies mais relacionadas aos casos de esporotricose humana e animal (RODRIGUES; HAGEN; DE CAMARGO, 2022; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018).

Durante muito tempo, as espécies de *Sporothrix* spp. clinicamente relevantes, foram classificadas como um "complexo de espécies", chamado de complexo *S. schenckii*

(MARIMON *et al.*, 2007). Segundo de Hoog *et al.* (2015), um complexo de espécies caracteriza-se como um clado monofilético de espécies de mesma relevância clínica, enquanto espécies crípticas refere-se às espécies que não foram reconhecidas como distintas com base nos seus fenótipos morfológicos, mas têm reconhecimento pela variação nos ácidos nucleicos. No entanto, pesquisas básicas e clínicas realizadas com o sistema *Sporothrix*-esporotricose, revelaram diferenças significativas na fisiologia, genética, epidemiologia e virulência de *Sporothrix* spp., distanciando-se da ideia de complexo de espécies crípticas e favorecendo o reconhecimento de espécies distintas (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Com essa mudança, alguns autores passaram a sugerir o uso do termo “clado clínico” para referir-se ao então complexo *S. schenckii*, visto que são frequentemente isolados de casos humanos e animais, enquanto as outras espécies passam a fazer parte de um “clado ambiental”, com frequência associados a substratos como solo, matéria orgânica em decomposição e até mesmo insetos e plantas (RODRIGUES *et al.*, 2020). Por ser o termo mais consolidado na literatura, complexo *S. schenckii* será utilizado para se referir ao conjunto de espécies consideradas patogênicas (*S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei*) ao longo deste trabalho.

2.1.2 Aspectos Ecológicos

Sordariomycetes é a segunda maior classe de *Ascomycota*, possuindo distribuição cosmopolita e acomoda principalmente táxons terrestres (MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2016). Nesta classe pode-se encontrar fungos saprófitas, alguns fitopatógenos associados às folhas, caules e raízes de diversas plantas, além de patógenos de insetos e animais (KIM *et al.*, 2022; MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2016). No entanto, mesmo existindo essa relação com patógenos de plantas, não há evidências de que as espécies do complexo *S. schenckii* também são fitopatogênicas (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Dentro de um gênero essencialmente ambiental, algumas espécies surgiram com a habilidade de infectar hospedeiros de sangue quente (RODRIGUES; HAGEN; DE CAMARGO; 2022). Dentro do gênero *Sporothrix*, oito espécies são consideradas patógenos humanos. Dessas, apenas quatro causam infecções frequentes, formando o complexo *S. schenckii* (*S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. schenckii sensu stricto*). As espécies *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. chilensis* e *S. stenoceras*, estão com frequência associadas a madeira e raramente causam infecções em mamíferos (DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016).

O fungo cresce na forma micelial no ambiente, produzindo abundantes conídios. Durante atividades ocupacionais e recreativas, os humanos tendem a adquirir a infecção geralmente por implantação traumática (CHAKRABARTI *et al.*, 2015, SIDRIM; ROCHA 2004).

2.2 Esporotricose

2.2.1 Aspectos epidemiológicos

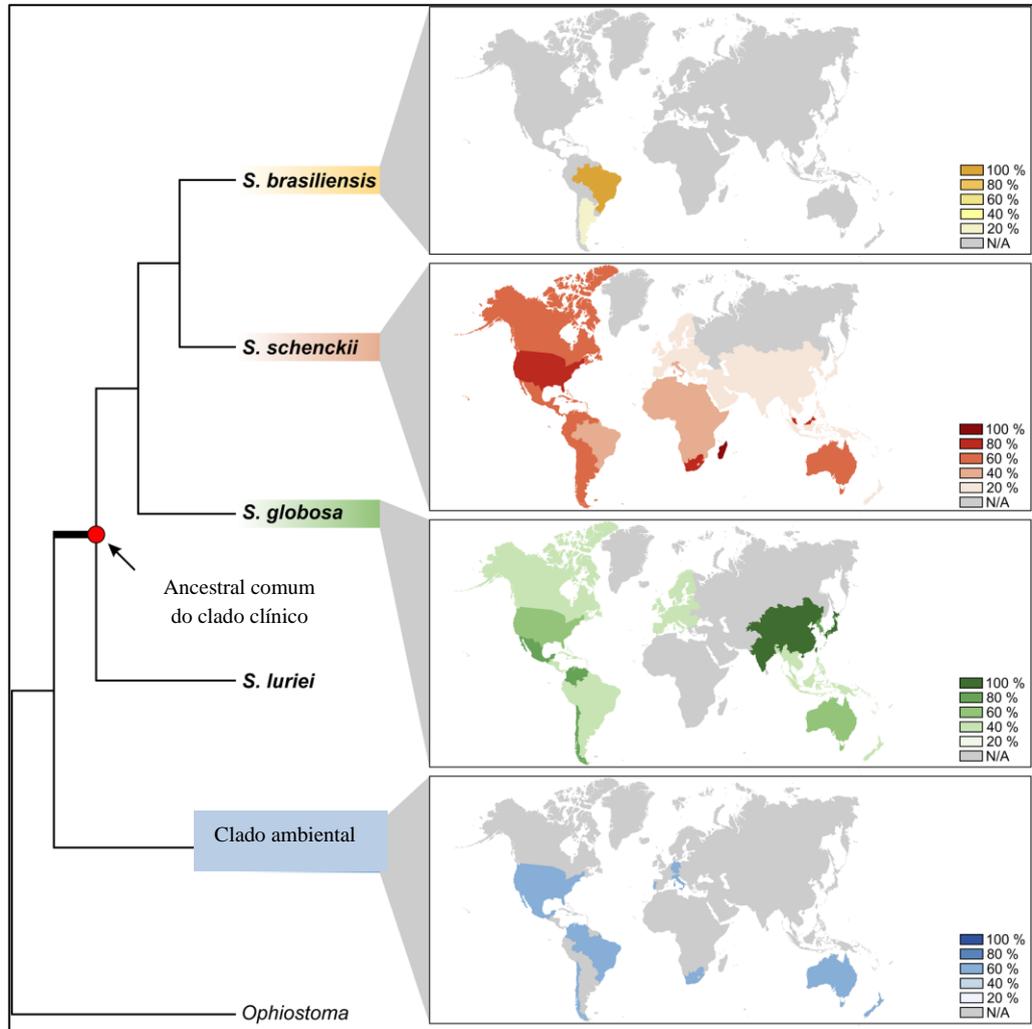
A esporotricose é uma infecção fúngica de evolução subaguda ou crônica, causada por fungos termicamente dimórficos do gênero *Sporothrix*, podendo afetar seres humanos e vários outros animais, a exemplo de gatos, cães, tatus, ratos, camundongos, camelos, bovinos, cavalos e aves (SIDRIM; ROCHA, 2004). A infecção está distribuída mundialmente, porém, é mais frequente em áreas de clima tropical e temperado. É considerada uma micose endêmica das Américas, com uma alta prevalência nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (CARVALHO *et al.*, 2021).

A distribuição geográfica das espécies de *Sporothrix* spp., tem diferenças relevantes, como mostra a Figura 1. *S. schenckii sensu stricto* é amplamente distribuído, e na maioria dos países, mostra-se como o principal agente etiológico (CARVALHO *et al.*, 2021). Já *S. brasiliensis*, é uma espécie que normalmente é isolada somente no Brasil, é altamente patogênica infectando principalmente gatos, mas acomete também cães e humanos (RODRIGUES; HAGEN; DE CAMARGO, 2022). *S. globosa*, é responsável por sapronoses¹ na Austrália, China e Índia (THOMSON *et al.*, 2019). A relevância epidemiológica de *S. luriei* é pequena, poucos casos foram registrados (DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016).

No Brasil, a esporotricose é de notificação compulsória no Rio de Janeiro, Pernambuco, Paraíba e em alguns municípios de São Paulo, Bahia e Minas Gerais (FALCÃO *et al.*, 2019). No país, nas últimas décadas, destaca-se a transmissão zoonótica por meio de arranhões, mordidas ou contato direto com gatos infectados (FALCÃO *et al.*, 2019; GREMIÃO *et al.*, 2020). Hábitos comportamentais como lambar, afiar as garras nas árvores, enterrar fezes no solo e as disputas por territórios, tornam os gatos vulneráveis à infecção por *Sporothrix* spp. e como consequência, ótimos transmissores de esporotricose.

¹ Doença causada por um microrganismo que vive no meio ambiente.

Figura 1 – Distribuição global do complexo *Sporothrix schenckii*



Fonte: Adaptado e traduzido de Rodrigues *et al.* (2020).

Apesar de determinados grupos serem mais suscetíveis à esporotricose, o fato é que a doença pode afetar diversas espécies animais, e quando se trata de humanos, ambos os sexos e todas as idades podem ser acometidas; tudo depende da exposição. Além disso, algumas ocupações como jardineiros, agricultores e veterinários e hábitos recreativos podem aumentar o risco de infecção (CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

2.2.2 Fatores de Virulência

Os microrganismos dispõem de fatores de virulência, os quais ajudam na sobrevivência em ambientes hostis e como consequência, a acessar regiões específicas do hospedeiro ou até mesmo interferir no funcionamento do sistema imunológico durante a infecção (AGUIAR, 2016). Alguns fatores de virulência já foram descritos para as espécies do

complexo *S. schenckii*, tais como o dimorfismo térmico (GARCIA-CARNERO; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, 2022), a capacidade de formar biofilmes (BRILHANTE *et al.*, 2018) e a produção de melanina (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2017). Membros do complexo *S. schenckii* têm sucesso durante infecções de mamíferos, isto se explica, ao menos em parte, por sua capacidade de mudar de um estilo de vida saprófita micelial a cerca de 25°C para uma levedura patogênica quando exposto a temperaturas entre 35°C e 37°C, encontradas em hospedeiros de sangue quente (GREMIÃO *et al.*, 2017).

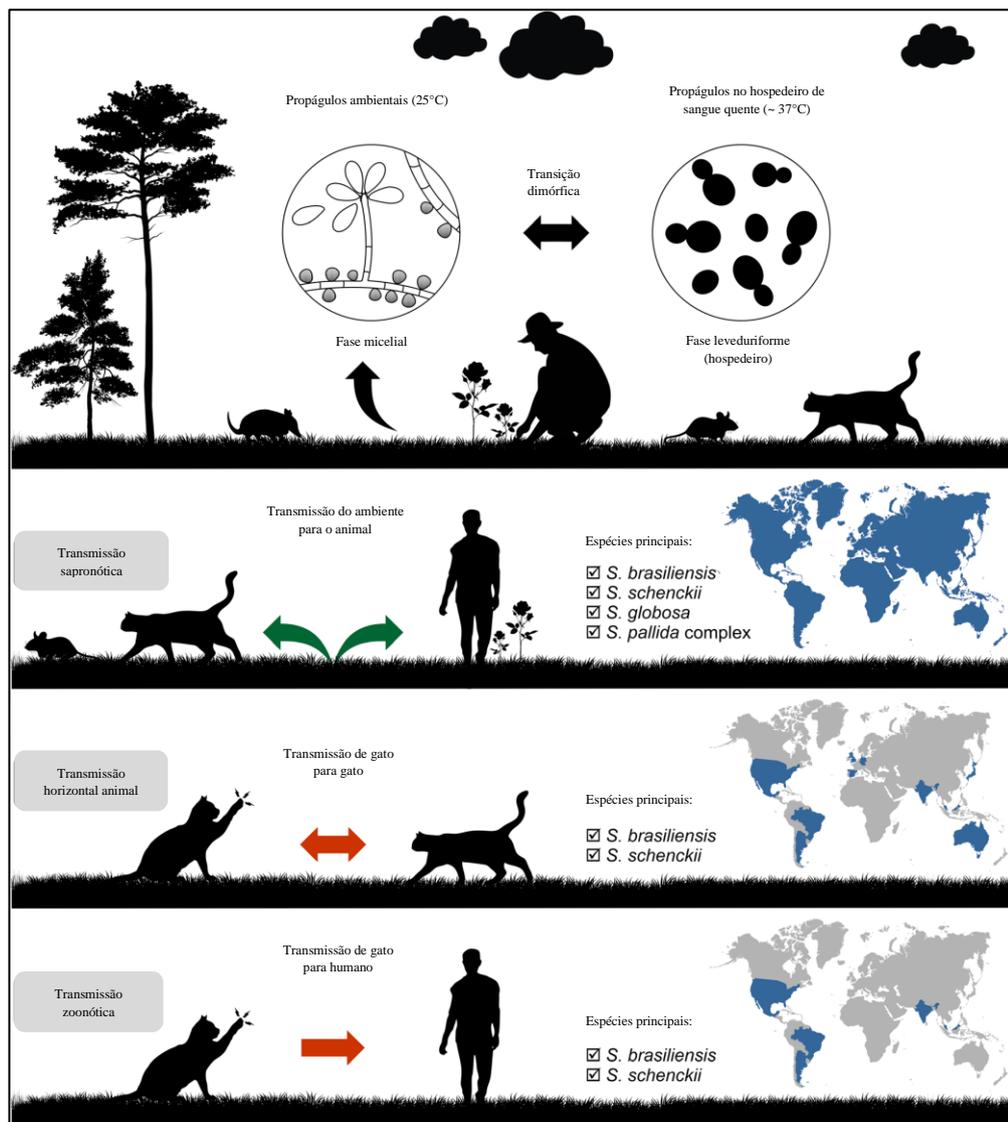
Quanto aos biofilmes, estes são considerados comunidades microbianas que podem aderir-se tanto a superfícies bióticas como abióticas; são envolvidos por uma matriz polimérica extracelular, possuindo um fenótipo diferente das células planctônicas com base em vários fatores morfológicos ou genéticos, como transcrição gênica, metabolismo, e resistência aos antimicrobianos (AGUIAR, 2016). O tratamento antifúngico torna-se complicado diante dessa estrutura, pois funciona como uma barreira, impedindo o acesso a determinadas moléculas no interior do biofilme (GARCÍA-CARNERO; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, 2022). Recentemente, Brilhante *et al.* (2018) descreveram a capacidade de espécies de *Sporothrix* spp. de formar biofilmes, em que várias cepas foram consideradas fortes produtoras de biofilme.

2.2.4 Patogenia da esporotricose

A esporotricose é caracterizada por ser uma micose crônica, que normalmente se inicia com a inoculação traumática de solo, plantas e matéria orgânica contaminados com o fungo (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Alternativamente, casos de transmissão zoonótica têm sido relatados, bem como casos menos frequentes de propágulos fúngicos infecciosos inalados, apresentando-se clinicamente como uma micose sistêmica que pode ser fatal (GREMIÃO *et al.*, 2017; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; ALVES, *et al.*, 2020;). Essa micose ainda pode ser associada a algumas atividades ocupacionais, como floricultura, agricultura, mineração e exploração de madeira; médicos veterinários e cuidadores e donos de gatos vêm sendo considerados uma nova categoria suscetível a aquisição de esporotricose (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). A Figura 2 mostra as principais vias de transmissão da esporotricose. A via de transmissão clássica refere-se à sapronose, ou seja, do ambiente para o hospedeiro vertebrado de sangue quente, sendo observada em atividade recreativas e ocupacionais como jardinagem, agricultura e extração de madeira. Enquanto a via alternativa de infecção está relacionada à epizootia (animal transmitindo para outro animal) e à transmissão

zoonótica (animal para o homem), acometendo principalmente gatos domésticos, ratos e tatus (RODRIGUES; HAGEN; DE CAMARGO, 2022). O eixo Sul-Sudeste do Brasil destaca-se como o epicentro da esporotricose zoonótica, tendo os gatos como principais vetores, em que através de mordeduras, arranhaduras ou por meio de secreções transmitem a doença para o homem e outros animais (CARVALHO *et al.*, 2021).

Figura 2 – Principais vias de transmissão da esporotricose



Fonte: Adaptado e traduzido de Rodrigues; Hagen e De Camargo (2022).

2.2.5 Manifestações Clínicas

As apresentações clínicas da esporotricose dependem de fatores como estado imunológico do hospedeiro, patogenicidade, carga e profundidade do inóculo e tolerância térmica da cepa (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). Segundo Sharma; Sharma e Sharma (2022), a esporotricose cutânea abrange três formas clínicas. A primeira é a linfocutânea, a forma mais frequente, observando-se em geral, nódulos ulcerados dolorosos e pruriginosos de distribuição linear em braços, pernas e face do indivíduo (Figura 3), podendo se tornar placas verrucosas em estágio crônico.

Figura 3 – Forma linfocutânea da esporotricose



Fonte: Palma-Ramos *et al.* (2016). **Legenda:** Lesões nodulares e ulcerativas com seguimento aos vasos linfáticos.

A forma cutânea localizada é a segunda forma mais comum, e surge no local de inoculação. De forma típica, contém uma lesão vegetativa assintomática, verrucosa de crescimento lento e um halo escamoso, violáceo ou eritematoso principalmente nas mãos e braços (Figura 4). A terceira forma é a cutânea disseminada, também conhecida como esporotricose hematogênica. É rara, com frequência associada a indivíduos imunocomprometidos (FALCÃO *et al.*, 2019).

A forma extracutânea ocorre quando a infecção se espalha para outra parte do corpo além da pele (SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022). É uma forma rara, mais frequentemente associada a pacientes vivendo com HIV que já desenvolveram a aids. Depois da pele, o tecido ósseo é o mais afetado. As lesões variam de pequenos granulomas a grandes lesões líticas idênticas à osteomielite (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

Figura 4 – Forma cutânea localizada da esporotricose



Fonte: Adaptada de Orofino-Costa *et al.* (2022). **Legenda:** Lesões presentes na forma cutânea localizada da esporotricose, no dorso da mão.

Já os gatos, hospedeiros mais suscetíveis a contaminação pelo *Sporothrix*, em geral desenvolvem as formas mais graves da doença, podendo evoluir para óbito. Múltiplas lesões ulcerativas são geralmente observadas na região cefálica, principalmente no nariz e na pata (Figura 5). Nos felinos, um número elevado de leveduras pode ser observado, diferentemente do que ocorre em lesões em humanos (RODRIGUES *et al.*, 2022).

Figura 5 – Lesões em gato com esporotricose



Fonte: Silva *et al.* (2018). **Legenda:** Esporotricose felina. (A) Gato com múltiplas lesões cutâneas ulceradas na face e no membro anterior. (B) Gato com lesão ulcerada na região nasal.

2.2.6 Diagnóstico da esporotricose

O diagnóstico de esporotricose pode ser realizado com a correlação dos dados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial é baseado no exame micológico direto, no isolamento e identificação do agente em cultura, na histopatologia, nas técnicas moleculares, entre outros testes. Já o diagnóstico clínico deve considerar, que os aspectos das lesões cutâneas em esporotricose são semelhantes aos de outras doenças, podendo ser confundida com outras manifestações dermatológicas, a exemplo de actinomicose, blastomicose, criptococose, leishmaniose tegumentar americana, micobacteriose e paracoccidioidomicose, sendo necessário, portanto, um diagnóstico laboratorial precoce e preciso (RODRIGUES *et al.*, 2022).

Através do exame micológico direto, busca-se encontrar elementos fúngicos na amostra. Com esse intuito costuma-se tratar as amostras com hidróxido de potássio (KOH) a 10% para a visualização das células em crescimento (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). A carga fúngica em gatos infectados é muita elevada, logo, quando o teste é realizado com amostras coletadas desses animais, células de levedura podem ser facilmente encontradas. No entanto, em casos de esporotricose humana é raro encontrar o fungo ao exame direto, logo, um exame direto negativo não exclui a possibilidade de diagnóstico positivo (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; SIDRIM; ROCHA, 2004).

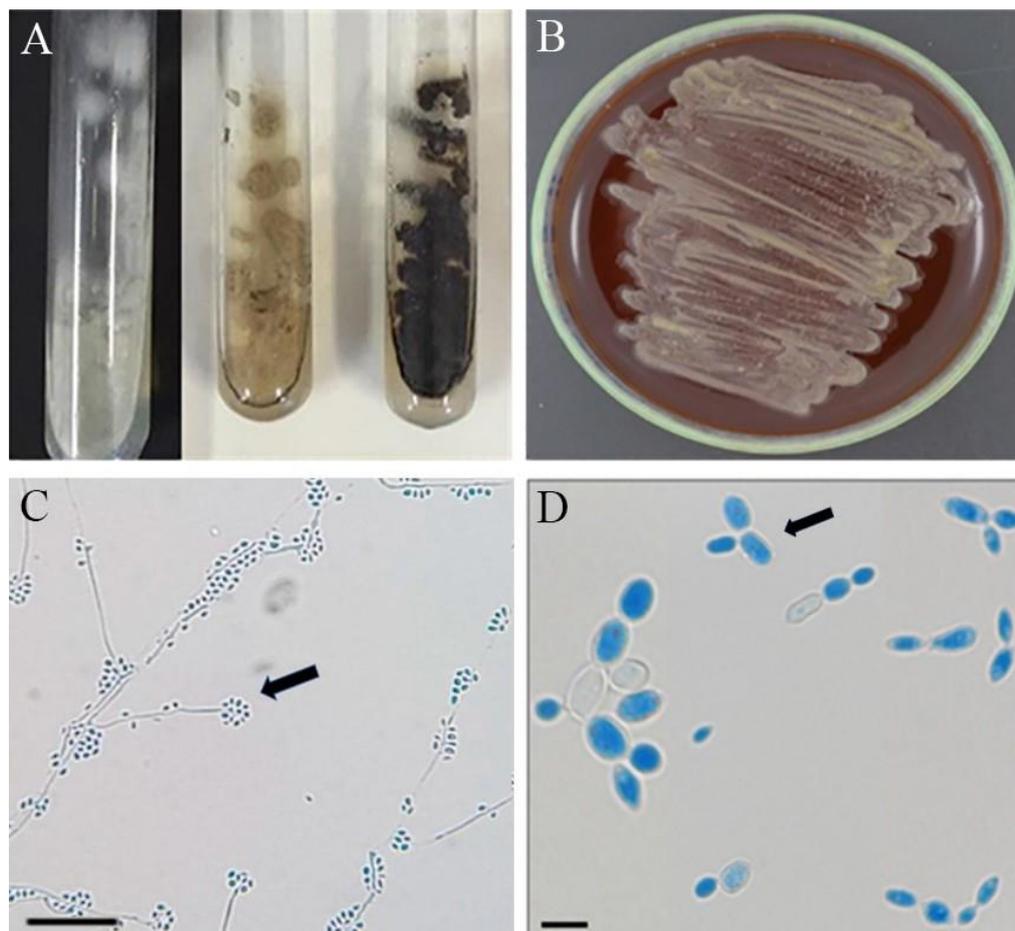
A cultura continua sendo o método de referência para o diagnóstico da esporotricose (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022). Ela se dá por meio do isolamento e identificação de microrganismos suspeitos em meios de cultura e caracterização do agente por parâmetros micro e macromorfológicos. Dependendo da forma clínica e das abordagens laboratoriais, várias amostras biológicas podem ser investigadas, tais como biópsia de pele, líquido sinovial, secreção purulenta, escarro e líquido cefalorraquidiano (RODRIGUES *et al.*, 2022; SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022). Para o cultivo, utiliza-se, em geral, os meios ágar Sabouraud dextrose, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Mycosel (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; OROFINO-COSTA *et al.*, 2022). Espécimes positivos e incubados a temperatura de 25-28°C têm seu crescimento visível em cerca de 1 a 2 semanas, com morfologia filamentosa. Para a forma leveduriforme, portanto, utiliza-se meios enriquecidos, tal como ágar de infusão de cérebro e coração (BHI) a temperaturas entre 35°C e 37°C (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022).

A Figura 6 mostra a macro e microscopia de *Sporothrix* spp., nas formas filamentosa e leveduriforme. Quando cultivados à temperatura entre 25°C e 28°C, as colônias desse fungo

apresentam coloração inicialmente creme, tornando-se marrom escuro com o tempo, superfície plana, rugosa com aspecto aveludado a membranoso. Micromorfológicamente apresentam-se como hifas hialinas septadas e com ramificações, os conídios crescem direto nas hifas ou ao redor de um conidióforo (simpodialoconídios), lembrando uma flor de margarida (SIDRIM; ROCHA, 2004; BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, 2013). Na forma de levedura, as colônias são de cor bege ou creme e lisas. Micromorfológicamente, observa-se células fusiformes e ovais com 2,5 a 5 μm de diâmetro, como botões em forma de charuto (RODRIGUES *et al.*, 2022).

Outra técnica aplicada para identificação de *Sporothrix* spp. é a histopatologia. No entanto, devido à escassez de estruturas fúngicas, os achados histopatológicos em amostras humanas podem ser inespecíficos. O padrão histopatológico está associado a reações granulomatosas e piogênicas, que podem se apresentar com hiperplasia epidérmica (com ou sem ulceração), hiperqueratose na borda, acantose papilomatosa e elementos fúngicos como células leveduriformes e corpos asteroides, que consiste em um precipitado ao redor do fungo composto ao que se admite por complexos antígeno-anticorpo e os eosinófilos têm uma presença marcante (SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022; SIDRIM; ROCHA, 2004). Em cortes histológicos corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS) ou impregnados pela prata de Grocott (GMS), as leveduras podem ser visualizadas (SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022). Em pacientes vivendo com HIV/AIDS, os achados histopatológicos são incomuns; a resposta inflamatória é menor e não há presença de corpos asteroides, no entanto, a quantidade de levedura é abundante (RODRIGUES *et al.*, 2022). Em amostras com um número elevado de estruturas fúngicas, pode-se observar célula globosas e ovais, semelhantes a leveduras em brotamento, que ficaram conhecidas como formas de “charuto” (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Figura 6 – Diferenças morfológicas em *Sporothrix* spp.



Fonte: CEMM. **Legenda:** A: Macroscopia de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa a 28 °C. B: Macroscopia de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme a 37°C. C: Microscopia de estruturas de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa coradas com lactofenol azul de algodão, sendo possível observar hifas hialinas e conídios hialinos terminais dispostos simpodialmente, semelhante a uma flor de margarida (seta preta) (Barra = 5 µm). D: Microscopia de estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. coradas com lactofenol azul de algodão, onde observamos os blastoconídios com brotamentos (seta preta) (Barra = 5 µm).

Técnicas moleculares foram desenvolvidas para aprimorar o diagnóstico fúngico, melhorando a velocidade, especificidade, precisão e a sensibilidade da identificação a nível de espécie (RODRIGUES *et al.*, 2020). O sequenciamento de DNA é considerado o método de referência para diferenciar espécies de *Sporothrix*. O ITS é usado como marcador primário de código de barras de DNA. Quitina sintase, calmodulina e β -tubulina, destacam-se entre os marcadores mais utilizados para identificação de *Sporothrix* spp. (RODRIGUES *et al.*, 2022). Atualmente, os métodos para detectar DNA de *Sporothrix* diretamente de amostras clínicas ou ambientais oferecem uma identificação mais rápida e boas opções incluem aquelas baseadas em qPCR (PCR quantitativa em tempo real; do inglês, *real time quantitative PCR*) (DELLA

TERRA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2019). O MALDI-TOF MS (espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo; do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) é outra técnica com alta precisão que pode ser utilizada na identificação de espécies patogênicas de *Sporothrix* (MATOS *et al.*, 2019).

2.2.7 Tratamento farmacológico

São raros os casos de cura espontânea em esporotricose humana e animal, sendo necessário o tratamento com antifúngicos para a maioria dos infectados (RODRIGUES *et al.*, 2022). O fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose é o itraconazol, tendo como alternativas o iodeto de potássio, a terbinafina e a anfotericina B, que é indicada em casos graves da doença (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2017b).

O iodeto de potássio foi a primeira droga utilizada para o tratamento da esporotricose, sendo empregada desde o início do século XX. Por ser uma droga de baixo custo, continua sendo um dos medicamentos mais prescritos para o tratamento das formas cutânea ou linfocutânea da esporotricose humana e em alguns casos felinos, podendo estar ou não associada ao itraconazol (RODRIGUES *et al.*, 2020). O mecanismo de ação exato dessa droga ainda não é bem elucidado. No entanto, um estudo recente de Brilhante *et al.*, (2018b) revela que o iodeto de potássio pode inibir o desenvolvimento de biofilme em *Sporothrix* spp.

Atualmente, o itraconazol é o fármaco de eleição para o tratamento da esporotricose humana e animal (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). O itraconazol age inibindo a biossíntese do ergosterol na parede celular do fungo, através da inibição da enzima citocromo P450 14 α -desmetilase (MAHAJAN, 2014). A dose terapêutica pode variar de 100 a 400 mg/dia a depender da gravidade da doença e do estado imunológico do hospedeiro (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

Outra droga de escolha para o tratamento da esporotricose é a terbinafina. É um derivado alilamina que interfere na síntese inicial do ergosterol através da inibição da enzima esqualeno epoxidase (MAHAJAN, 2014). É utilizada para tratar a forma cutânea ou linfocutânea quando não há resposta ao itraconazol ou quando seu uso não for tolerado (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022).

A anfotericina B é bastante efetiva nas formas disseminadas ou extracutâneas da esporotricose. Recomenda-se o uso até que haja melhora clínica, quando deverá ser substituída por itraconazol (SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022). Tem como alvo a molécula de ergosterol da membrana citoplasmática fúngica, promovendo a formação de poros, aumentando assim, a permeabilidade da membrana celular a íons e várias outras moléculas, além disso, é capaz de induzir dano oxidativo na célula com a liberação de radicais livre letais (MAHAJAN, 2014).

2.3 Lactoferrina como estratégia no controle das infecções por *Sporothrix* spp.

Os fungos necessitam do íon ferro para sobreviver em diferentes condições. Esse micronutriente funciona como um cofator para a maioria das enzimas, sendo essencial para o crescimento, respiração celular, síntese e reparo de DNA e para a persistência e virulência durante a infecção (MARTÍNEZ-PASTOR; PUIG, 2020). No entanto, por existir na forma de óxido férrico insolúvel, a biodisponibilidade do ferro no meio ambiente é bastante limitada. Além disso, durante a infecção, o sistema imunológico dos hospedeiros mamíferos reconhece a importância dos íons metálicos para a proliferação de patógenos e, portanto, restringe a quantidade de íon ferro na corrente sanguínea, nos tecidos e nas células (BAIRWA; HEE JUNG; KRONSTAD, 2017). Em contrapartida, os patógenos podem driblar esta imunidade nutricional por meio da aquisição de ferro heme e de hemoproteínas, da obtenção do ferro da transferrina, lactoferrina e ferritina; da aquisição de ferro através de sideróforos ou por aquisição de ferro reduzido (Fe^{2+}) (KORNITZER; ROY, 2020; ZANETTE, 2014).

Compostos orgânicos ou inorgânicos com alta afinidade e capacidade de formar complexos com um ou mais íons metálicos são denominadas de agentes quelantes (CARRASQUEIRA, 2017). O uso de fármacos quelantes para limitar metais no organismo, tem sido uma importante estratégia de defesa em casos de falha da terapêutica antimicrobiana tradicional (ZANETTE, 2014). Agentes quelantes vêm demonstrando efeitos inibitórios contra diversos patógenos fúngicos como *Aspergillus fumigatus* (ZAREMBER *et al.*, 2007), *Cryptococcus* ssp. (LAI *et al.*, 2016; FERNANDES; WEEKS; CARTER, 2020), *Candida* spp. (FERNANDES; WEEKS; CARTER, 2020) e *Sporothrix* spp. (BRILHANTE *et al.*, 2020). Os principais quelantes utilizados na clínica são deferoxamina, deferiprona, deferasirox, ácido etilenoaminotetracético e lactoferrina (CHAYAKULKEEREE *et al.*, 2020).

De coloração vermelha ou rosa-salmão, a lactoferrina é uma proteína multifuncional reconhecida por sua forte ligação ao ferro, com características similares às da transferrina (LONNERDAL; LYER, 1995). Seu primeiro isolamento data de 1960, sendo detectada nos leites bovino e humano e desde então é objeto de estudos estruturais e funcionais intensivos, em especial pelas possibilidades de aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica (GRUDEN; ULRIH, 2021). Essa glicoproteína está presente em neutrófilos ou em vários fluidos biológicos, como lágrimas, saliva, leite materno e secreções nasais de diferentes espécies de mamíferos, incluindo humanos, camelos, vacas, cães, cabras, cavalos e diversos roedores (HABIB *et al.*, 2021). No entanto, as maiores concentrações são encontradas no leite e colostro (FERNANDES; WEEKS; CARTER, 2020; ACOSTA-ZALDÍVAR *et al.*, 2016).

Lactoferrina exerce um papel fisiológico significativo na regulação do ferro e na resposta imune inata, e muitos trabalhos revelam que LF possui atividade contra diversos patógenos fúngicos (ACOSTA-ZALDÍVAR *et al.*, 2016; LAI *et al.*, 2016; SINHA *et al.*, 2013). Palma-Ramos *et al.* (2016) relataram a ação fungistática da lactoferrina e seu papel na resposta imune inata durante a esporotricose linfocutânea, através da detecção do quelante em superfície de leveduras de *S. schenckii* e de linfócitos CD4+ na reação granulomatosa presente nos tecidos adjacentes. Atualmente outros estudos vêm demonstrando que os quelantes de metais possuem atividade antifúngica, *in vitro*, frente leveduras e fungos dimórficos (LAI *et al.*, 2016; FERNANDES; WEEKS; CARTER, 2020; BRILHANTE *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos inibitórios do quelante lactoferrina, *in vitro*, e suas interações farmacológicas com drogas antifúngicas clássicas frente a células planctônicas de cepas do complexo *Sporothrix schenckii*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de lactoferrina, frente às células planctônicas das formas filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp.;
- Avaliar as interações entre lactoferrina e anfotericina B, itraconazol e terbinafina frente às células planctônicas da forma filamentosa de *Sporothrix* spp.

4 METODOLOGIA

4.1 Local de estudo

A pesquisa foi realizada nos laboratórios do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2 Microrganismos

Nesse estudo foram utilizadas 12 cepas pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*: 04 cepas de *S. brasiliensis*, 01 de *S. globosa*, 04 de *S. mexicana* e 03 de *S. schenckii sensu stricto* (Tabela 1).

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

Código da Cepa	Espécie	Fonte de Isolamento
CEMM 05-3-050	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-052	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão
CEMM 05-3-075	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
CEMM 05-3-078	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Gato
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 stricto</i>	Humano
CEMM 05-3-097	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Humano
CEMM 05-4-002	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Solo

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica.

Os isolados foram obtidos da coleção de cultura do Centro Especializado de Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil. Todas as cepas foram previamente caracterizadas a nível da espécie, sequenciando do *locus* da calmodulina (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2013).

Para realização dos experimentos na forma filamentosa, cultivos foram realizados em ágar batata dextrose (PDA) (Himedia, Índia) e incubados a 35°C, durante 7 dias. Para obtenção da forma leveduriforme, cultivos sucessivos foram realizados em ágar BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro, incubados a 37°C por 7 dias. Após a reversão as cepas foram mantidas na forma leveduriforme por repiques em ágar BHI.

4.3 Quelante e drogas teste

Para o desenvolvimento deste estudo foi utilizada, em todos os experimentos, lactoferrina (LF; Sigma-Aldrich, E.U.A.), referida como quelante teste. As drogas antifúngicas clássicas anfotericina B (AMB; Sigma-Aldrich, E.U.A.), itraconazol (ITC; Janssen Pharmaceutical, Bélgica) e terbinafina (TRB; Sigma-Aldrich, E.U.A) foram utilizadas na verificação das interações farmacológicas e como controle para os testes de sensibilidade. Para o preparo de soluções-estoque, lactoferrina foi diluída em água, enquanto anfotericina B, itraconazol e terbinafina foram diluídas em DMSO a 100%. Todas as soluções foram homogeneizadas em agitador mecânico tipo vórtex até completa dissolução da droga e, em seguida, transferidas para microtubos estéreis. Posteriormente, foram estocadas a -20°C até o momento do uso.

4.4 Teste de sensibilidade antifúngica planctônica

Os testes de sensibilidade foram realizados pela técnica microdiluição em caldo sendo usadas microplacas de 96 poços, conforme os documentos M27 (forma leveduriforme) e M38 (forma filamentosa) do CLSI (CLSI, 2017a, 2017b), com adaptações. As drogas foram testadas em concentrações variando de 2 a 1024 µg/ml (LF), 0,03 a 16 µg/ml (AMB, ITC e TRB). Os inóculos foram preparados em solução salina e em seguida ajustados para uma concentração final $0,4-5 \times 10^4$ UFC/ml (forma filamentosa) e $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/ml (forma leveduriforme) em

meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA), tamponado a pH 7,0 com 0,165M de MOPS (Sigma, St Louis, MO, USA). As microplacas foram incubadas a 35°C por 72h (forma filamentosa) e 37°C por 96 h (forma leveduriforme). A concentração inibitória mínima (CIM) de lactoferrina foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento visual fúngico em comparação com o crescimento fúngico nos poços sem a presença da droga. Para os antifúngicos a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% (AMB e TRB) ou 80% (ITC) do crescimento fúngico em comparação com o crescimento fúngico na ausência das drogas.

4.5 Teste de interação entre drogas

Para a avaliação das interações entre lactoferrina e antifúngicos, foram selecionadas 4 cepas de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa, 1 cepa representativa de cada espécie. As combinações de LF (2 a 1024 µg/ml) com AMB, ITC (0,03 a 16 µg/ml) e TRB (0,06 a 4 µg/ml) foram avaliadas através do método de *checkerboard*, conforme escrito por Almeida-Paes *et al.* (2016), com adaptações. Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração capaz de inibir 50%, 80% ou 100% do crescimento fúngico na combinação entre o quelante lactoferrina com AMB, ITC e TRB. Os valores de CIM obtidos foram utilizados para determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). As interações foram definidas como sinérgicas quando apresentaram $ICIF \leq 0,5$, indiferentes quando $0,5 < ICIF < 4$ e antagônicas quando apresentaram $ICIF > 4$ (ODDS, 2003). O ICIF indica do grau de interação medicamentosa, e pode ser calculado pela seguinte fórmula: $ICIF = CIFA + CIFB = CIM_{A(B)}/CIM_A + CIM_{B(A)}/CIM_B$ (GÓMARA; RAMÓN-GARCÍA, 2019).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de sensibilidade antifúngica planctônica

Lactoferrina apresenta atividade inibitória frente às espécies do complexo *S. schenckii* na sua forma filamentosa (Tabela 2) e leveduriforme (Tabela 3). Os valores de CIM de LF para a forma filamentosa de *Sporothrix* spp. variaram de 16 a 64 µg/ml. Para as drogas antifúngicas os valores de CIM obtidos variaram de 0,25 a 4 µg/ml para anfotericina B, e 0,125 a 1 µg/ml para itraconazol e de 0,06 a 0,5 µg/ml para terbinafina (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima de lactoferrina frente às espécies do complexo *Sporothrix schenckii* na forma filamentosa.

Espécies	Cepas (código CEMM)	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			
		AMB	ITC	TRB	LF
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CEMM 05-3-050	4	0,5	0,25	32
	CEMM 05-3-052	2	0,25	0,06	64
	CEMM 05-3-075	2	0,5	0,25	32
	CEMM 05-3-078	0,5	0,125	0,125	64
<i>Sporothrix globosa</i>	CEMM-05-4-005	2	0,5	0,25	32
<i>Sporothrix mexicana</i>	CEMM 05-3-100	1	0,25	0,25	32
	CEMM 05-3-101	1	0,25	0,5	32
	CEMM 05-4-008	0,5	0,25	0,25	64
	CEMM 05-4-009	2	1	0,25	32
<i>Sporothrix schenckii</i> <i>sensu stricto</i>	CEMM 05-3-090	0,25	0,25	0,5	16
	CEMM 05-3-097	1	0,25	0,125	16
	CEMM 05-4-002	1	0,25	0,5	32

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. LF: Lactoferrina. TRB: Terbinafina.

Quanto aos resultados de CIM da lactoferrina na forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., a droga apresentou inibição variando de 8 a 32 µg/ml. Para as drogas antifúngicas, os valores de CIM observados encontravam-se entre 0,13 e 0,25 µg/ml para anfotericina B, de 0,25 a 0,5 µg/ml para itraconazol e 0,03 µg/ml para terbinafina (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima de lactoferrina frente às espécies do complexo *Sporothrix schenckii* na forma leveduriforme.

Espécies	Cepas (código CEMM)	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			
		AMB	ITC	TRB	LF
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CEMM 05-3-075	0,25	0,5	0,03	16
<i>Sporothrix globosa</i>	CEMM 05-4-005	0,25	0,5	0,03	32
<i>Sporothrix mexicana</i>	CEMM 05-3-101	0,25	0,25	0,03	8
<i>Sporothrix schenckii</i> <i>sensu stricto</i>	CEMM 05-3-097	0,13	0,5	0,03	8

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. LF: Lactoferrina. TRB: Terbinafina.

5.2 Sinergismos

Também foram realizados testes de interação entre lactoferrina e os antifúngicos AMB, ITC e TRB. A Tabela 4 mostra os resultados da CIM para drogas isoladas e em combinação contra *Sporothrix* spp., na forma filamentosa. A combinação entre LF e AMB mostrou-se indiferente em todas as cepas testadas. LF mostrou interação sinérgica com ITC em duas cepas. Foram observadas interações antagônicas entre LF e TRB diante de três cepas. (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionária de lactoferrina em combinação com antifúngicos, contra células planctônicas de *Sporothrix* spp., na forma filamentosa.

Espécies	Concentração inibitória mínima (µg/mL)							Interpretações dos valores de FICI		
	Drogas isoladas				Drogas combinadas					
	LF	AMB	ITC	TRB	LF/ AMB	LF/ ITC	LF/ TRB	LF/ AMB	LF/ ITC	LF/ TRB
<i>S. brasiliensis</i>	32	4	16	0,25	2/4	2/2	128/2	IND	SYN	ANT
<i>S. globosa</i>	32	8	16	0,06	2/8	2/16	1024/0,06	IND	IND	ANT
<i>S. mexicana</i>	32	16	1	0,06	4/16	16/0,5	1024/0,06	IND	IND	ANT
<i>S. schenckii</i> <i>sensu stricto</i>	32	4	16	0,25	2/4	2/2	2/0,25	IND	SYN	IND

LF: Lactoferrina. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. ANT: Antagônico. IND: Indiferente. SYN: Sinérgico.

6 DISCUSSÃO

O íon ferro é essencial para praticamente todos os organismos. É o mais abundante e multifuncional dentre os metais traço, logo, hospedeiros e patógenos desenvolveram mecanismos sofisticados para garantir a distribuição e o suprimento contínuo de íon ferro, de modo a assegurar o pleno funcionamento de seus processos celulares, como o transporte de oxigênio e o ciclo do ácido tricarbóxico; além de deixar as concentrações do metal em níveis homeostáticos para evitar toxicidade (GERWIEN *et al.*, 2017).

Durante a infecção, o hospedeiro limita a disponibilidade de íons metálicos, em especial o íon ferro, para restringir sua absorção por microrganismos, em um processo denominado imunidade nutricional (SILVA, 2017). Dessa forma, para driblar a limitação desse micronutriente, os fungos dispõem de táticas para obtenção de ferro, como absorção redutora, síntese e transporte de sideróforos e mecanismos que usam heme e hemoglobina; sistemas que contribuem para os processos biológicos e expressão dos fatores de virulência no patógeno (BAIRWA; HEE JUNG; KRONSTAD, 2017).

Em um estudo realizado no México, Palma-Ramos *et al.* (2016) observaram a presença de lactoferrina, presente em vários fluidos biológicos, em cortes histológicos de lesões de esporotricose linfocutânea. O quelante de ferro natural apresentava-se aderido às leveduras de *Sporothrix*, sugerindo ser uma estratégia de defesa do hospedeiro diante desse patógeno fúngico (PALMA-RAMOS *et al.*, 2016).

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou que os quelantes de metais ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e deferiprona (DFP), foram capazes de inibir o crescimento de formas planctônicas e a formação de biofilmes em cepas do complexo *S. schenckii* (BRILHANTE *et al.*, 2020). Além disso, nos estudos de Brilhante *et al.* (2020), os quelantes de metais utilizados foram sintéticos, com a realização de experimentos de recaptação de todos os metais, incluindo recaptação do íon ferro. No entanto, não havia sido investigado o efeito da limitação de ferro sob atividade específica do quelante lactoferrina, uma glicoproteína endógena, frente cepas de *Sporothrix* spp.

Inicialmente obtivemos as CIMs diante do teste de sensibilidade. Os resultados obtidos para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina encontram-se mesma faixa de concentrações descrita em outros estudos (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2017b; BRILHANTE *et al.*, 2018a). Com relação ao efeito antifúngico de lactoferrina no crescimento planctônico de *Sporothrix* spp., verificou-se que essa molécula foi capaz de inibir o crescimento desses patógenos fúngicos, com CIM variando de 16 a 64 µg/ml para a forma filamentosa e de 8 a 32

$\mu\text{g/ml}$ para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. Estudos anteriores realizados com LF bovina, relataram valores de CIM de 32 a 64 $\mu\text{g/ml}$ em *Cryptococcus* spp. e de 16 $\mu\text{g/ml}$ frente *Saccharomyces cerevisiae* (LAI *et al.*, 2016). Enquanto, Fernandes; Weeks e Carter (2020) utilizando LF humana, relataram valores superiores em experimentos com *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., com CIM >256 $\mu\text{g/ml}$. Apesar de altamente homólogas, moléculas de lactoferrina de diferentes espécies, podem variar quanto a atividade antifúngica, devido suas pequenas diferenças estruturais (FERNANDES; CARTER, 2017).

Além disso, de modo geral, a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. apresentou CIMs em torno de 2 vezes menores que os obtidos para a forma filamentosa, com relação a droga testada neste estudo. Tendo como base o estudo de Martínez-Álvarez *et al.* (2017), a diferença na suscetibilidade entre as duas formas morfológicas de *Sporothrix* spp., pode estar relacionada à variação nas proporções dos constituintes da parede celular dos fungos, tal como β -1,3-glucana e glucosamina. A parede celular é uma estrutura importante para manutenção da forma celular, proteção contra estresses ambientais e para o crescimento dos fungos (YOSHIMI; MIYAZAWA; ABE, 2017).

Com a reversão para a forma leveduriforme há a remodelação rápida da parede celular, servindo como estratégia para evitar o reconhecimento por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) associados às células fagocíticas, contribuindo assim para o estabelecimento da doença (NAVARRO *et al.*, 2021; BOYCE; ANDRIANOPOULOS, 2015). Para mais, Mesa-Arango *et al.* (2016), relacionaram a diminuição da suscetibilidade à anfotericina B em *Candida* spp. com mudanças na estrutura da parede celular desses fungos. Dessa forma, presumimos que a variação na composição da parede celular entre as formas filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp., pode influenciar na suscetibilidade à lactoferrina.

Sabendo que esse quelante possuía atividade antifúngica frente *Sporothrix* spp., passamos a avaliar o efeito das interações entre quelante e antifúngicos clássicos frente a forma filamentosa de *Sporothrix* spp., com o objetivo de verificar se essa combinação seria capaz de aumentar ou não o efeito antifúngico quando comparado às drogas isoladas. Os resultados mostraram que as interações variaram bastante nos ensaios com a forma filamentosa.

As combinações de LF com AMB apresentaram resultados indiferentes. Nesse caso, houve redução apenas da CIM de LF, em até 16 vezes. Podemos levantar uma hipótese com base nos mecanismos de ação dessas drogas. Sabidamente, o mecanismo de ação da AMB se dá pela ligação ao ergosterol, principal esteroide das membranas fúngicas, causando poros na membrana plasmática e como consequência, o vazamento de íons (ODDS; BROWN; GOW,

2003; KRISTANC *et al.*, 2019). No entanto, essa não é a única forma pela qual AMB exerce sua ação fungicida, essa droga possui capacidade de causar auto-oxidação da membrana plasmática do fungo, por meio da liberação de radicais livres letais (MAHAJAN, 2014).

Para LF diferentes mecanismos de ação foram descritos. Zarembler *et al.* (2007) demonstraram que LF, *in vitro*, é capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus fumigatus* através do sequestro de Fe^{3+} . No entanto, estudos realizados recentemente sugerem que, para além da quelatação de ferro, LF é capaz de interagir com a superfície do fungo, causando um desequilíbrio na membrana celular (FERNANDES; CARTER, 2017). É possível que a formação de poros na membrana por AMB, facilite e aumente a penetração de LF para o interior da célula, promovendo o sequestro de ferro intracelular (JOHNSON *et al.*, 2004), sem, no entanto, interferir na ação do antifúngico. Isso explicaria, pelo menos em parte, porque a combinação de AMB e LF foram indiferentes, assim, mais experimentos são necessários.

Na combinação de LF com ITC, apenas duas cepas apresentaram sinergismos. Nesses casos a redução da CIM do antifúngico foi de 8 vezes. A ação de ITC se dá pela inibição da biossíntese de ergosterol, por inibir a 14α -desmetilase (ODDS; BROWN; GOW, 2003). A ação de LF em células de *Sporothrix* spp., não é totalmente entendida. No entanto, com base nos estudos anteriormente citados, podemos hipotetizar que LF e ITC agem em sítios diferentes, como alvos de parede celular e membrana (JOHNSON *et al.*, 2004). Assim, essa ação conjunta em diferentes alvos moleculares poderia explicar o sinergismo observado. Além disso, o sinergismo ocorreu com cepas de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, principais causadores da esporotricose dentro do complexo (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022), podendo sugerir que para essas espécies o ferro tem maior importância metabólica, no entanto, mais dados são necessários, visto que análise foi realizada com apenas uma cepa de cada espécie.

A maior parte das combinações de LF com TRB apresentaram resultados antagônicos. Considerando que a CIM de TRB não foi alterada, apenas de LF, com aumentos em até 32 vezes, é possível que a ação da TRB na inibição da esqualeno epoxidase e, portanto, da síntese de ergosterol, tenha levado a uma mudança no alvo de LF, tornando o fungo menos suscetível a ação dessa droga (JOHNSON *et al.*, 2004). Mais estudos são necessários para melhor detalhar esse fenômeno.

Portanto, LF isolada apresenta atividade antifúngica promissora frente cepas do complexo *S. schenckii*, no entanto, pesquisas futuras são necessárias para entender o mecanismo exato de ação dessa molécula e o metabolismo de ferro em espécies de *Sporothrix* spp., bem como seu potencial para apoiar as drogas de escolha para tratamento de esporotricose.

7 CONCLUSÃO

- Todas as cepas de *Sporothrix* spp. foram inibidas pelo quelante lactoferrina, confirmando assim, sua atividade antifúngica *in vitro*.
- O quelante lactoferrina apresentou interação indiferente com o antifúngico anfotericina B, sinergismo com o antifúngico itraconazol em apenas 2 cepas, e antagonismo com terbinafina, frente a forma filamentosa de *Sporothrix* spp.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-ZALDÍVAR, M. *et al.* Human lactoferrin triggers a mitochondrial and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Apoptosis.**, v. 21, n. 2, p. 163–173, 2016.
- AGUIAR, Felipe Rodrigues Magalhães de. **Biofilmes do complexo *Sporothrix schenckii*: formação e sensibilidade *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/21572/1/2016_dis_frmaguiar.pdf. Acesso em: 10 ago. 2022.
- ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLoS ONE.**, v. 11, n. 3, p. 1-13, 2016.
- ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Melanin biosynthesis in pathogenic species of *Sporothrix*. **Fungal Biology Reviews.**, v.31, n. 1, p. 50-59, 2017.
- ALMEIDA-PAES, R. *et al.* 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, 2017b.
- ALVES, M. D. M. *et al.* Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases.**, v. 14, n. 5, p. 1–11, 2020.
- BAIRWA, G.; HEE JUNG, W.; KRONSTAD, J. W. Iron acquisition in fungal pathogens of humans. **Metallomics.**, v. 9, p. 215-227, 2017.
- BARROS, M.B.L; ALMEIDA-PAES, R. de; SCHUBACH, A.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.
- BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. Diagnosis and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: What are the options? **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 252–259, 2013.
- BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: The switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 5, p. 797-811, 2015.
- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. **Medical Mycology**, v. 56, n. 3, p. 297–306, 2018.
- BRILHANTE, R. S. *et al.* Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1129–1140, 2018a.
- BRILHANTE, R.S.N. *et al.* Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Medical Mycology**, v., 57, p. 764–772, 2018b.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Antifungal activity of deferiprone and EDTA against *Sporothrix* spp.: Effect on planktonic growth and biofilm formation. **Medical Mycology**, v. 59, n. 6, p. 537–544, 2020.

CARMICHAEL, J. W. Chrysosporium and some other aleuriosporic hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, [S. l.], v. 40, n. 8, p. 1137–1173, 1962. DOI: 10.1139/b62-104. Acesso em: 10 ago. 2022.

CARRASQUEIRA, Mafalda Duque. **Agentes Quelantes no Tratamento de Intoxicações por Ferro**. 2017. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/36065>. Acesso em: 25 nov. 2022.

CARVALHO, J. A. de. *et al.* Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging *Sporothrix* species. **Studies in Mycology**, v. 100, n.1, p. 1-31, 2021.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.

CHAYAKULKEEREE, M. *et al.* Impact of iron chelators on growth and expression of iron-related genes of *Cryptococcus* species. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2020.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard - Fourth Edition**. CLSI document M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2017a.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard - Third Edition**. CLSI document M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2017b.

HELLWIG, Alessandra Helena da Silva. **Influência do ferro no crescimento e na suscetibilidade ao itraconazol e deferasirox em *Sporothrix* spp.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/207705#:~:text=Resultados%3A%20A%20disponibilidad e%20de%20ferro,dos%20isolados%20de%20Sporothrix%20spp>. Acesso em: 13 out. 2022.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and Ophiostoma: Solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, p. 165–191, 2016.

DE HOOG, G. S. *et al.* Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1056-1062, 2015.

DELLA TERRA, P. P. *et al.* Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 4, p. 704–716, 2021.

FALCÃO, E. M. M. *et al.* Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). **Cadernos de Saúde Pública.**, Fundação Oswaldo Cruz, v. 35, n. 2, p. 1-6, 2019.

FERNANDES, K. E.; CARTER, D. A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: Mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2017.

FERNANDES, K. E.; WEEKS, K.; CARTER, D. A. Lactoferrin Is Broadly Active against Yeasts and Highly Synergistic with Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 5, p. 1-22, 2020.

GARCÍA-CARNERO, L. C.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A. Virulence Factors of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2022.

GERWIEN, F. *et al.* Metals in fungal virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, p. 1-21, 2017.

GÓMARA, M.; RAMÓN-GARCÍA, S. **The FICI paradigm:** Correcting flaws in antimicrobial in vitro synergy screens at their inception. **Biochemical Pharmacology**, v. 163, p. 299-307, 2019.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2017.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Geographic Expansion of Sporotrichosis. **Emerging Infectious Diseases**. v. 26, n. 3, p. 621-623, 2020.

GRUDEN, Š.; ULRIH, N. P. Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 20, p. 1-28, 2021.

HABIB, H. M. *et al.* The role of iron in the pathogenesis of COVID-19 and possible treatment with lactoferrin and other iron chelators. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 136, p. 1-10, 2021.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *sporothrix schenckii*, a new pathogenic fungus. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 77-89, 1900. DOI: 10.1084/jem.5.1.77.

JOHNSON, M. D. *et al.* Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KIM, W. *et al.* Transcriptional Divergence Underpinning Sexual Development in the Fungal Class Sordariomycetes. **mBio**, v. 13, n. 3, p. 1-18, 2022.

KORNITZER, D.; ROY, U. Pathways of heme utilization in fungi. **BBA - Molecular Cell Research**. v. 1867, n. 11, p. 1-12, 2020.

KRISTANC, L. *et al.* **The pore-forming action of polyenes:** From model membranes to living organisms. **BBA – Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 418-43, 2019.

LAI, Y. W. *et al.* Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 4, p. 388–394, 2016.

LONNERDAL, B.; LYER, S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. **Annual Review Nutrition**, v. 15, p. 93-110, 1995. DOI: 10.1146/anuurev.nu.15.070195.000.521

LOPES-BEZERRA, L. M. *et al.* 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.

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

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. *et al.* Families of Sordariomycetes. **Fungal Diversity**, v. 79, n. 1, p. 1–317, 2016.

MARIMON, R. *et al.* *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.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A. *et al.* *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 843, 2017.

MARTÍNEZ-PASTOR, M. T.; PUIG, S. Adaptation to iron deficiency in human pathogenic fungi. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 10, p. 1-14, 2020.

MATOS, A. M. F. *et al.* Identification by MALDI-TOF MS of *Sporothrix Brasiliensis* isolated from a subconjunctival infiltrative lesion in an immunocompetent patient. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2019.

MESA-ARANGO, A. C. *et al.* Cell wall changes in amphotericin B-resistant strains from *Candida tropicalis* and relationship with the immune responses elicited by the host. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2326–2335, 2016.

NAIR, R. *et al.* Non-heat shock responsive roles of HSF1 in *Candida albicans* are essential under iron deprivation and drug defense. **BBA - Molecular Cell Research.**, v. 1864, n. 2, p. 345–354, 2017.

NAVARRO, M. V. *et al.* The role of dimorphism regulating histidine kinase (Drk1) in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 12, p. 1-19, 2021.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. **Antifungal agents: Mechanisms of action.** **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 6, p. 757–777, 2022.

PALMA-RAMOS, A. *et al.* Presencia de lactoferrina (LF) en la esporotricosis linfocutánea. Péptido antimicrobiano unido a levaduras. **Gaceta Médica do México**, v. 152, n. 6, p. 831–835, 2016.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2013.

RODRIGUES, A. M. *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 813-842, 2020.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 1-32, 2022.

RODRIGUES, A. M.; HAGEN, F.; DE CAMARGO, Z. P. A Spotlight on *Sporothrix* and Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 407–411, 2022.

ROSSATO, Luana. ***Sporothrix brasiliensis* aspectos imunológicos e virulência**. 2017. Tese (Doutorado em Fisiopatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9142/tde-22012018-111625/pt-br.php>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SCHENCK, B.R. On Refractory Subcutaneous Abscesses caused by a Fungus possibly related to the Sporotricha. **John Hopkins Hospital Bulletin**, [S. l.], v. 9, n. 93, p. 286–290, 1898. Disponível em: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10020340577/>. Acesso em: 10 ago. 2022.

SHARMA, B; SHARMA, A. K.; SHARMA, U. Sporotrichosis: a Comprehensive Review on Recent Drug-Based Therapeutics and Management. **Current Dermatology Reports**, v. 11, p. 110-119, 2022.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica á Luz de Autores Contemporâneos**. 1.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, J. N. *et al.* Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 160, p. 72–78, 2018.

SILVA, Kassylo Lobato Potenciano da. **Caracterização dos mecanismos de captação de ferro em *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii***. 2017. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/7137>. Acesso em: 05 nov. 2022.

SINHA, M. *et al.* Antimicrobial lactoferrin peptides: The hidden players in the protective function of a multifunctional protein. **International Journal of Peptides**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

THOMSON, J. *et al.* An atypical cause of sporotrichosis in a cat. **Medical Mycology Case Reports**, v. 23, p. 72–76, 2019.

TRIPATHI, A. *et al.* Iron alters the cell wall composition and intracellular lactate to affect *Candida albicans* susceptibility to antifungals and host immune response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 29, p. 10032–10044, 2020.

YOSHIMI, A.; MIYAZAWA, K.; ABE, K. Function and biosynthesis of cell wall α -1,3-glucan in fungi. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 1-21, 2017.

ZANETTE, Régis Adriel. **O papel do íon ferro nas infecções por *Pythium insidiosum***. 2014. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/3850>. Acesso em: 25 nov. 2022.

ZAREMBER, K. A. *et al.* Human Polymorphonuclear Leukocytes Inhibit *Aspergillus fumigatus* Conidial Growth by Lactoferrin-Mediated Iron Depletion *Aspergillus*. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, p. 6367-6373, 2007.

ZHANG, M. *et al.* Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 1-11, 2019.