

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**INFLUÊNCIA DO FERRO NO CRESCIMENTO E NA SUSCETIBILIDADE AO
ITRACONAZOL E DEFERASIROX EM *SPOROTHRIX* SPP.**

ALESSANDRA HELENA DA SILVA HELLWIG

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**INFLUÊNCIA DO FERRO NO CRESCIMENTO E NA SUSCETIBILIDADE AO
ITRACONAZOL E DEFERASIROX EM *SPOROTHRIX SPP.***

ALESSANDRA HELENA DA SILVA HELLWIG

Orientadora: Prof. Dra. Maria Lúcia Scroferneker

Coorientador: Prof. Dr. Régis Adriel Zanette

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Hellwig, Alessandra Helena da Silva
INFLUÊNCIA DO FERRO NO CRESCIMENTO E NA
SUSCETIBILIDADE AO ITRACONAZOL E DEFERASIROX EM
SPOROTHRIX SPP. / Alessandra Helena da Silva Hellwig.
-- 2019.
90 f.
Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Coorientador: Régis Adriel Zanette.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. esporotricose. 2. micose subcutânea. 3.
deferasirox. 4. itraconazol. 5. ferro. I.
Scroferneker, Maria Lúcia, orient. II. Zanette, Régis
Adriel, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha orientadora prof. Dra. Maria Lúcia Scroferneker, por todos os ensinamentos que me foram disponibilizados em todos esses anos que se iniciaram em 2016, quando fui bolsista de Iniciação Científica no seu laboratório, e que continuaram a serem dados nesses dois anos como sua aluna de Mestrado. Muito obrigada pela confiança dada a mim.

E o meu muito obrigada ao meu coorientador prof. Dr. Régis Adriel Zanette, que sempre muito solícito aceitou embarcar nesse projeto conosco. Seu conhecimento foi de extrema importância para esse trabalho.

Agradeço ao Dr. Santin, que não importava se fazia chuva ou sol, se era dia ou noite, sempre estava disposto a me receber. O senhor mostrou o real significado do que é ser médico. Eternamente grata. Levo esse gesto comigo.

Agradeço a todos os alunos de Iniciação Científica que acompanharam essa caminhada e que levo como meus amigos: Audren, Eduarda, Elisa, Henrique, Juliana, Millena, Nathália, Renata e, em especial, Amanda e Iasmin, que estiveram sempre ao meu lado durante essa caminhada.

E aos colegas do laboratório 325, pelos momentos de distrações no café de todo dia e pelas conversas (científicas ou não), são eles: Alejandra, Betina, Daiane, Fabiana, Simone, prof. Patrícia e, em especial, Danielle, que também foi minha terapeuta durante esse caminho, sempre apoiando e dando forças!

E meu obrigada às amigas do 'verapamil', Carine e Helenita, pessoas que com certeza levarei para a vida!

Agradeço aos meus pais, Wilmar e Nésia, por sempre se mostrarem orgulhosos com meus passos. Isso é fruto de vocês também. E às minhas irmãs, Bárbara, Débora e

Denise, por serem minhas confidentes e sempre me distraírem e verem o lado bom quando as coisas não saíam conforme o meu planejado.

Agradeço ao meu namorado Gustavo, por ser meu apoiador, meu terapeuta nas horas vagas e por me ouvir falar sobre micologia mesmo não entendendo nada sobre o assunto.

Agradeço também a minha segunda família, meus sogros Carmen Lia e Sérgio, por sempre me receberem de braços abertos.

Agradeço ao segurança José, pela companhia quase diária.

À UFRGS pela oportunidade de ensino e a CAPES pela bolsa de estudos.

Meu muito obrigada a todos vocês.

RESUMO

Introdução: A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix*. O itraconazol é o antifúngico de escolha para esporotricose humana e animal, mas há relatos de resistência ou recorrência ao tratamento. Alguns patógenos necessitam de ferro para o seu desenvolvimento e o quelante de ferro deferasirox tem demonstrado atividade contra certos fungos patogênicos.

Objetivo: O presente estudo avaliou o crescimento e a suscetibilidade ao estresse oxidativo de *Sporothrix* spp. *in vitro* quando exposto a diferentes concentrações de ferro e sua suscetibilidade ao itraconazol sozinho e em combinação com deferasirox.

Materiais e métodos: Foram utilizados 10 isolados de cada espécie de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. A afinidade das cepas por ferro foi avaliada medindo o crescimento radial em placas de ágar batata dextrose contendo diferentes concentrações de ferro. As cepas também foram submetidas a 40 mM de peróxido de hidrogênio para avaliação da resposta ao estresse oxidativo. O crescimento dos isolados em meio com restrição ou sobrecarga de ferro também foi avaliado no caldo RPMI 1640 usando o ensaio colorimétrico com 2,3-Bis- (2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida (XTT). A suscetibilidade dos isolados fúngicos frente ao itraconazol e ao deferasirox foi avaliada pela técnica de microdiluição *in vitro*.

Resultados: A disponibilidade de ferro afetou o crescimento e a viabilidade de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* ao estresse oxidativo. No entanto, a combinação de deferasirox com itraconazol *in vitro* resultou em indiferença para a maioria dos isolados de *Sporothrix* spp.

Conclusão: Ferro é necessário para o desenvolvimento de *Sporothrix* spp., sendo *S. brasiliensis* mais sensível às diferentes concentrações de ferro que *S. schenckii*, embora o quelante de ferro deferasirox combinado com itraconazol não tenha sido sinérgico *in vitro* para esses isolados. Adição de ferro no meio de cultivo também aumentou a suscetibilidade de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* ao estresse oxidativo. No entanto, mais estudos são necessários para analisar deferasirox como adjuvante terapêutico para *Sporothrix* spp.

Palavras-chaves: Esporotricose; micose subcutânea; deferasirox; itraconazol; ferro.

ABSTRACT

Introduction: Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by fungi of the genus *Sporothrix*. Itraconazole is the drug of choice for human and animal sporotrichosis, but there are reports of resistance or recurrence to treatment. Some pathogens use iron for their development and the iron chelator deferasirox has demonstrated activity against some pathogenic fungi.

Aim: The present study evaluated the *in vitro* growth and susceptibility to oxidative stress of *Sporothrix* spp. exposed to different iron levels and the susceptibility of *Sporothrix* spp. to itraconazole alone and in combination with deferasirox.

Materials and methods: Ten isolates of each *S. schenckii* and *S. brasiliensis* species were used. The affinity of the strains for iron was evaluated by measuring the radial growth in potato dextrose agar plates containing different iron levels. Strains were further subjected to 40 mM hydrogen peroxide to evaluate oxidative stress response. Growth of the strains to iron-restricted or iron-overload medium was also assessed in RPMI 1640 broth using the 2,3-Bis- (2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida (XTT) colorimetric assay. The susceptibility of fungal isolates to itraconazole and deferasirox was evaluated using *in vitro* microdilution technique.

Results: Iron availability affected *S. schenckii* and *S. brasiliensis* growth and viability to oxidative stress. Nonetheless, the combination of deferasirox with itraconazole *in vitro* resulted in indifference for most *Sporothrix* spp. isolates.

Conclusions: Iron is required for the development of *Sporothrix* spp. *S. brasiliensis* is more sensitive to different iron concentrations than *S. schenckii*, although iron chelator deferasirox combined with itraconazole was not synergistic *in vitro* for these strains. Iron addition in the culture medium also increased the susceptibility of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* to oxidative stress. Further studies are required to analyze deferasirox as a therapeutic adjunct to *Sporothrix* spp.

Keywords: Sporotrichosis; subcutaneous mycosis; deferasirox; itraconazole; iron.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de busca com as palavras-chave usadas nas bases de dados.....	12
Figura 2. Linha do tempo com os aspectos históricos da esporotricose.....	15
Figura 3. Análise filogenética das espécies de <i>Sporothrix</i> spp. realizada por agrupamento vizinho (ITS1 + 5.8s + ITS2).....	16
Figura 4. Distribuição global das espécies <i>Sporothrix brasiliensis</i> , <i>Sporothrix globosa</i> e <i>Sporothrix schenckii</i> (<i>clade</i> IIa representa isolados da América do Norte e do Sul; <i>clade</i> IIb é restrito à América do Sul, principalmente Peru e Argentina).....	17
Figura 5. (A-B) Cultura de <i>Sporothrix schenckii</i> mostrando a variabilidade de coloração das colônias formadas. Cultivo em Ágar Sabouraud Dextrose em 25 °C (A) e 28 °C (B). (C) Microscopia da fase filamentosa de <i>S. schenckii</i> mostrando hifas septadas com conidióforos com conídios na forma ovoide arranjados na forma de “flor”. (D) Microscopia da fase leveduriforme de <i>S. schenckii</i> com células na forma de “charuto” e aparência pleomórfica com formação de pseudohifa.....	18
Figura 6. Distribuição mundial da esporotricose.....	19
Figura 7. (A) Esporotricose felina pelo mundo com casos isolados ou pequenos surtos. Região Sul do Brasil com maiores casos de esporotricose felina causada por <i>S. brasiliensis</i> . Fora do Brasil, maioria dos casos de zoonose é causado por <i>S. schenckii</i> . (B) Evolução da esporotricose felina no Brasil.....	21
Figura 8. Casos de esporotricose felina em humanos de 1998 a 2012 no estado do Rio de Janeiro.....	22
Figura 9. (A-H) Apresentação clínica da forma linfocutânea da esporotricose.....	28
Figura 10. (A-C) Apresentação clínica da forma cutânea fixa da esporotricose.....	29
Figura 11. Apresentação clínica da forma cutânea disseminada da esporotricose associada ao alcoolismo.....	30
Figura 12. Corpo asteroide cercado por neutrófilos em um corte histopatológico corado com PAS.....	35
Figura 13. Estrutura química de deferasirox sozinho (A) e quando complexado com o ferro (B).....	46
Figura 14. Mapa conceitual da dissertação de mestrado sobre <i>Sporothrix</i> spp. e sua relação com o ferro e estudo de sinergismo entre deferasirox e itraconazol.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamento para esporotricose recomendado pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América.....	38
Tabela 2 - Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações efetivas mínimas (CEM) de antifúngicos contra espécies de <i>Sporothrix</i> spp. descritos nos 23 estudos encontrados na literatura até março de 2019 que utilizaram o protocolo para fungos filamentosos M38-A2 do CLSI.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	Flucitosina
AMB	Anfotericina B
ANI	Anidulafungina
AS	Ágar Sabouraud dextrose
BHI	Ágar Brain Heart Infusion
B.I.D	Duas vezes ao dia
CAS	Caspofungina
CEM	Concentração efetiva mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DEF	Deferasirox
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCZ	Fluconazol
FICI	Índice de concentração inibitória fracionada
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gp	Glicoproteína
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A liase
ITZ	Itraconazol
KI	Solução saturada de iodeto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
KTZ	Cetoconazol
LILACS	Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde
Máx	Máximo
MCZ	Miconazol
MFG	Micafungina
Mín	Mínimo

PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRM	Peptideoramnomanana
PSZ	Posaconazol
PubMed	Public Medicine Library
SciELO	Scientific Electronic Library Online
SsCBF	<i>Sporothrix schenckii</i> Con A-Binding Fraction
SsDRK1	Histidina quinase
TRB	Terbinafina
UFC	Unidade formadora de colônia
VRZ	Voriconazol
XTT	2,3-Bis- (2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazolium-5-Carboxanilida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Esporotricose	13
2.1.1 Definição	13
2.1.2 Aspectos históricos.....	13
2.1.3 Agentes etiológicos e taxonomia.....	15
2.1.4 Epidemiologia	18
2.1.5 Fatores de Virulência	23
2.1.6 Manifestações Clínicas.....	27
2.1.7 Diagnóstico.....	31
2.1.8 Tratamento	36
2.1.9 Ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos	40
2.2 Relação do ferro com fungos patogênicos	44
2.3 Deferasirox	45
2.3.1 Deferasirox e fungos patogênicos.....	47
2.4 Estresse oxidativo	48
3. MARCO CONCEITUAL	50
3 JUSTIFICATIVA	52
4 OBJETIVOS	52
5.1 Primários	52
5.2 Secundários	52
6. REFERÊNCIAS	53
Artigo 1: formatado para submissão à Revista Mycoses (FI = 3,065).	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
PERSPECTIVAS	85

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix* que afeta humanos e animais, sendo *Sporothrix schenckii* a principal espécie [1,2]. Tais micro-organismos são considerados dimórficos por apresentarem dois estágios morfológicos no seu ciclo de vida: a fase miceliana, encontrada em temperatura ambiente, e a fase leveduriforme, observada nas lesões da doença [1,2].

Em relação à distribuição mundial, a esporotricose ocorre mais frequentemente em regiões de climas tropical, subtropical e temperado [3]. As áreas endêmicas, por sua vez, são América Latina, África do Sul e Japão [4,5]. No Brasil, é a micose subcutânea de maior incidência no estado do Rio Grande do Sul [2].

A infecção por *Sporothrix* spp. ocorre por inoculação traumática do micro-organismo na pele, podendo desenvolver lesões na forma de nódulos supurativos, que seguem o trajeto de um vaso linfático, ou na forma de placa cutânea verrucosa [6]. Geralmente, apresenta-se de forma benigna e limitada à pele e ao tecido subcutâneo. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, apresenta-se na forma disseminada, com lesões pulmonares, ósseas, articulares e no sistema nervoso central [6].

O fármaco de escolha para tratamento de formas cutâneas e linfocutâneas em humanos é o fungistático azólico itraconazol que possui, como mecanismo de ação, a inibição da biossíntese do ergosterol, ocorrendo alteração da permeabilidade da membrana [7,8]. Entretanto, há relatos de isolados resistentes a este tratamento, o que leva a falhas terapêuticas e remissão da doença [9]. Para contornar a resistência dos micro-organismos e diminuir a toxicidade dos tratamentos, variados estudos são feitos combinando antifúngicos com diferentes mecanismos de ações, visando obter, além de tudo, uma atividade antifúngica sinérgica [10,11].

Tendo em vista que alguns agentes patogênicos necessitam de ferro para seu desenvolvimento, por ser este um nutriente essencial, sua deficiência pode impactar negativamente as funções biológicas dos micro-organismos [12,13]. O fármaco deferasirox é um quelante de ferro utilizado por pacientes com sobrecarga desse metal [12,13]. Em alguns estudos com fungos patogênicos, como Mucorales, viu-se o potencial do deferasirox na intervenção terapêutica [12,13]. Além de ser um quelante de ferro, o deferasirox possui propriedades imunomoduladoras ainda pouco compreendidas [12,14].

Seguindo esta linha de raciocínio e na crescente necessidade de buscas por novos tratamentos para a infecção, é interessante e conveniente avaliar a combinação de itraconazol e deferasirox frente aos agentes da esporotricose e como estes se comportam quando em contato com o ferro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão da literatura está focada nos principais aspectos da esporotricose, abordando os seguintes temas: **definição, aspectos históricos, agentes etiológicos, taxonomia, epidemiologia, fatores de virulência, manifestações clínicas, diagnóstico, tratamento, ensaio de suscetibilidade a antifúngicos, relação do ferro com fungos patogênicos, deferasirox e estresse oxidativo**. Essa estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, SciELO e LILACS, com publicações até março de 2019. As buscas nas bases de dados foram realizadas no dia 19 de março de 2019, através do esquema representado na Figura 1, que mostra a combinação das palavras-chave utilizadas, assim como o número de artigos encontrados, incluídos, repetidos e o número final de estudos inseridos nesta revisão da literatura.

Para todos os temas abordados foi utilizado filtro de idioma (inglês, espanhol e português). Já para os temas **definição, aspectos históricos, agentes etiológicos, taxonomia, epidemiologia, fatores de virulência, manifestações clínicas, diagnóstico, tratamento e relação do ferro com fungos patogênicos** foram utilizadas revisões e estudos dos últimos cinco anos disponíveis nas bases de dados.

Base de dados: PubMed LILACS SciELO

Palavras-chave	Artigos encontrados			Artigos incluídos			Duplicados	Total incluído
Sporotrichosis AND review	55	6	6	43	3	4	5	45
Deferasirox AND review	73	0	1	27	0	1	1	27
Sporotrichosis AND antifungal activity	60	0	0	9	0	0	0	9
Sporotrichosis AND antifungal susceptibility	48	0	0	20	0	0	8	12
<i>Sporothrix</i> AND antifungal activity	115	0	0	11	0	0	9	2
<i>Sporothrix</i> AND antifungal susceptibility	61	0	0	23	0	0	22	1
Fungus AND iron	927	2	5	21	1	1	0	23
Sporotrichosis AND iron	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Sporothrix</i> AND iron	2	0	0	1	0	0	0	1
Fungus AND deferasirox	19	0	0	16	0	0	0	16
Sporotrichosis AND deferasirox	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sporothrix</i> AND deferasirox	0	0	0	0	0	0	0	0
Sporotrichosis AND oxidative stress	4	0	0	4	0	0	0	4
<i>Sporothrix</i> AND oxidative stress	4	0	0	4	0	0	4	0
Total de artigos incluídos								140

Figura 1. Esquema de busca com as palavras-chave usadas nas bases de dados.

2.1 Esporotricose

2.1.1 Definição

Esporotricose é uma infecção fúngica subaguda ou crônica causada por várias espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*, grupo de fungos dimórficos, sendo o principal representante *S. schenckii* [15-17]. Essa infecção é uma das micoses subcutâneas mais frequentes e apresenta distribuição mundial, porém é mais comumente encontrada nas zonas tropicais e subtropicais, como América Latina, África e Ásia [15,16].

A doença pode afetar tanto humanos como animais domésticos [18], e sua transmissão ocorre por implantação traumática: os propágulos infecciosos são inoculados, principalmente, na pele ou mucosa, através de fontes encontradas no ambiente, como solo, plantas e matérias orgânicas contaminadas pelo fungo [15,17]. Menos frequentemente, pode ser transmitida através da inalação dos conídios do fungo, ocorrendo envolvimento pulmonar [15]. Variadas manifestações clínicas da esporotricose são relatadas, desde localizada à disseminada [19]. A forma mais comum é a linfocutânea, caracterizada pela presença de pápulas ou pústulas na forma de nódulos ulcerados com envolvimento linfático [17].

2.1.2 Aspectos históricos

Benjamin Schenk, estudante de medicina no Hospital Johns Hopkins (Baltimore), em 1898, publicou o primeiro caso clínico de esporotricose cutânea [17,20-27], a partir de amostras coletadas do braço e da mão de um paciente [24,28]. No mesmo período, o micologista Smith isolou e identificou o fungo causador da esporotricose, sendo inicialmente identificado como *Sporothricum* [25,27,29]. O gênero *Sporothrix*, como é conhecido atualmente, só foi classificado assim mais tarde, no ano 1900, por Hektoen e Perkins, quando isolaram o fungo a partir de um exsudato das lesões na pele [23-26,29].

Em 1907, Lutz e Splendore [26,30], através da observação da doença em humanos e ratos, relataram a fase patogênica (leveduriforme) e as formas linfocutânea e extracutânea da doença [20]. Em 1912, Beurmann e Gougerot foram os primeiros que

relataram casos de esporotricose disseminada e que utilizaram o termo “fungo oportunista” [23, 29]. O teste de reação intradérmica, primeiro método de diagnóstico da doença, teve seu primeiro uso relatado em 1947 por Gonzáles-Ochoa e Soto-Figueroa [24]. Anos mais tarde, em 1961, Howard confirmou a natureza dimórfica do microorganismo causador da esporotricose e, em 1979, Kwon-Chung analisou a heterogeneidade das cepas de *Sporothrix* spp. quanto ao seu crescimento e à virulência no modelo animal [27].

Inicialmente, acreditou-se que a esporotricose era causada por um único organismo, conhecido como *S. schenckii* [17], mas com o advento das ferramentas genéticas e moleculares e maior conhecimento da doença [20], observou-se o envolvimento de diversas espécies, como *S. brasiliensis*, *S. globosa*, entre outros, sendo então renomeado para Complexo *S. schenckii* ou *S. schenckii sensu lato* em 2006 [17,24,26,29,31]. A descrição dessas novas espécies com variado grau patogênico mudou a visão da esporotricose em relação a resposta imune do hospedeiro, aos aspectos epidemiológicos, de diagnóstico e de tratamento já que a variabilidade patogênica entre essas espécies difere [20].

No ano 2000, o cenário da esporotricose no Brasil mudou quando a infecção por *S. brasiliensis*, que é transmitida principalmente por gatos, através de arranhadura e mordidas, foi observada no estado do Rio de Janeiro, uma importante zona de epidemia da esporotricose felina [20,32,33], sendo considerada um problema de saúde pública [32-35]. Além do Rio de Janeiro, outros estados brasileiros têm reportado esporotricose felina, como do Rio Grande do Sul e São Paulo [32,33]. Conseqüentemente, a epidemiologia dessa infecção fúngica tem mudado nas últimas décadas, sendo caracterizada como uma doença predominantemente zoonótica [18]. Na Figura 2 encontra-se a linha do tempo com os aspectos históricos relacionados à esporotricose.

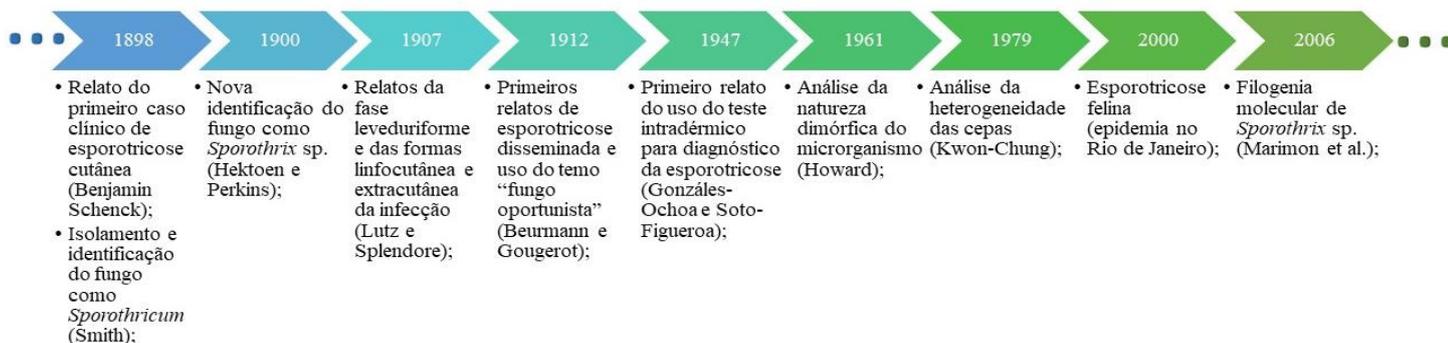


Figura 2. Linha do tempo com os aspectos históricos da esporotricose.

Fonte: Autor.

2.1.3 Agentes etiológicos e taxonomia

Por muito tempo, *S. schenckii* (*sensu lato*) foi considerado o único agente etiológico da esporotricose. Com maior conhecimento e advento de ferramentas moleculares, observou-se que esta infecção fúngica era adquirida por outras espécies de fungo - que apresentavam variabilidade morfológica [26,27,29,36,37], diferenças na distribuição geográfica, frequência, nicho ecológico, suscetibilidade antifúngica e diferentes níveis de virulência -, compondo, como é conhecido atualmente, o Complexo *Sporothrix schenckii* [19,23,25,36-38].

A partir de sequências de genes como quitina sintase, β -tubulina e calmodulina, as espécies que compõem o complexo *S. schenckii* foram agrupadas em seis clados (Figura 3): *S. brasiliensis* (Clade I); *S. schenckii* (Clade II); *S. globosa* (Clade III); *S. luriei* (Clade IV); *S. mexicana* (Clade V); *S. pallida*, também conhecida como *S. albicans* (Clade VI) [29,39-41]. Além dessas, outras espécies já foram descritas posteriormente, como *S. chilensis*, *S. stylites*, *S. humicola*, *S. lignivora*, *S. inflata*, *S. dimorphospora*, *S. variecibatus* e *S. brunneoviolacea* [28,29,37].

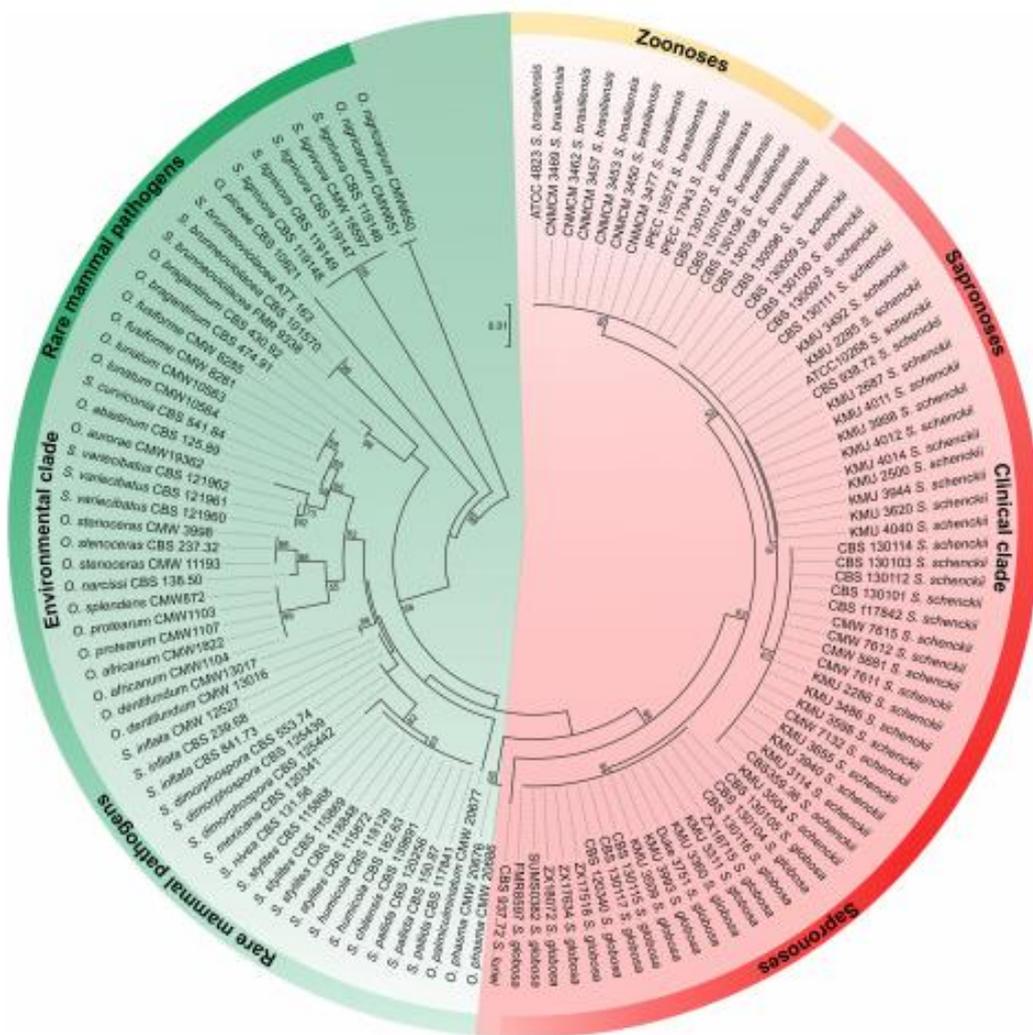


Figura 3. Análise filogenética das espécies de *Sporothrix* sp. realizada por agrupamento vizinho (ITS1 + 5.8s + ITS2).

Fonte: Rodrigues et al. [33].

Espécies do complexo que já foram reportadas como agentes da esporotricose em humanos e animais, que possuem maior virulência e clinicamente mais relevantes são *S. brasiliensis* (espécie mais restrita ao Brasil e que está relacionada com transmissão zoonótica através de arranhão ou mordidas de animais infectados pelo fungo) [18-20,42-44], *S. schenckii sensu stricto* (América, Ásia e África) e *S. globosa* (Ásia) (Figura 4) [19,25,36,40,42,45]. As espécies *S. luriei*, *S. mexicana*, *S. pallida* (*S. albicans*) e *S. chilensis* são cepas do ambiente, mas podem atuar como fungos oportunistas em indivíduos imunocomprometidos [19].

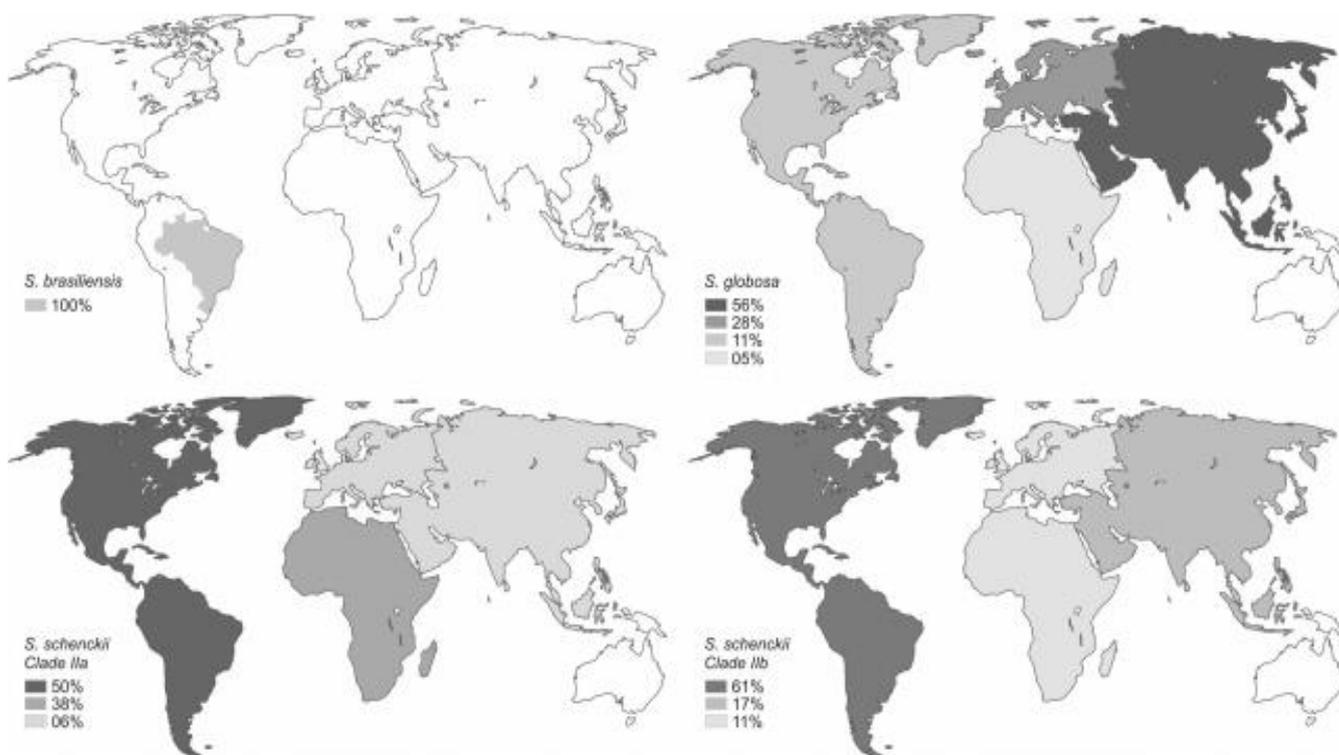


Figura 4. Distribuição global das espécies *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix schenckii* (*clade* IIa representa isolados da América do Norte e do Sul; *clade* IIb é restrito à América do Sul, principalmente Peru e Argentina).

Fonte: Chakrabarti et al. [27].

Todas as espécies do complexo são pertencentes à família *Ophiostomataceae*, ordem Ophiostomatales, classe Pyrenomycetes, divisão Ascomycota [23,26-28,33,37], e são encontradas na vegetação, excremento de animais e solos ricos em celulose com pH entre 3,5 a 9,4, temperatura média de 31 °C e umidade relativa acima de 92% [23,24,43,45]. Além disso, esses fungos possuem como característica o dimorfismo, sendo capazes de formar conídios na fase micelial ou saprofítica, desenvolvendo-se à 25 °C, e na fase leveduriforme ou parasítica, desenvolvendo-se à 35-37 °C [19,20,23-25,28,29,42]. Dessa forma, o fungo após ser inoculado no ser humano apresenta-se na forma leveduriforme [28,33].

Na fase micelial ou saprofítica, encontram-se presente hifas hialinas septadas e ramificadas com conídios (2 a 4 μm) arranjados na forma da flor margarida no ápice de conidióforos (Figura 5). Já a forma leveduriforme ou parasítica é considerada pleomórfica por apresentar células com variadas formas (ovais e/ou na forma de “charuto”) e tamanhos (2,5 a 5 μm) (Figura 5) [24,26,28].

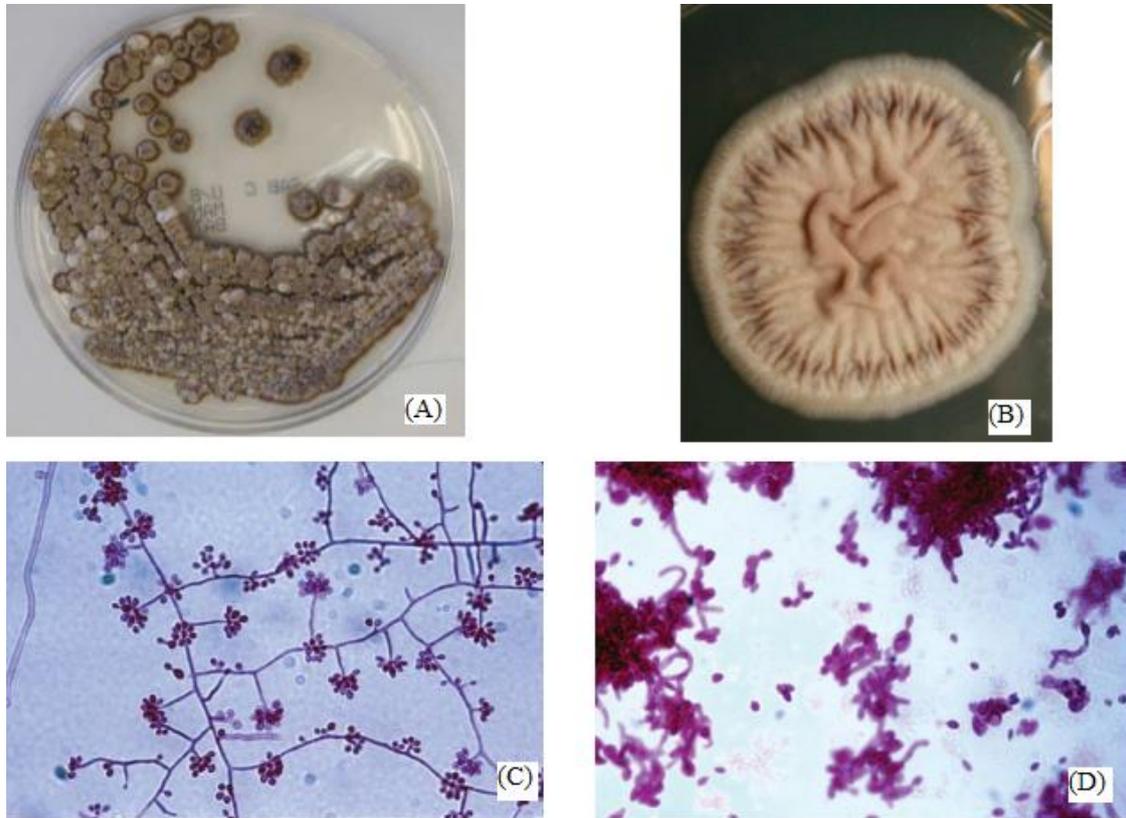


Figura 5. (A-B) Cultura de *Sporothrix schenckii* mostrando a variabilidade de coloração das colônias formadas. Cultivo em Ágar Sabouraud Dextrose em 25 °C (A) e 28 °C (B). (C) Microscopia da fase filamentosa de *S. schenckii* mostrando hifas septadas com conidióforos com conídios na forma ovoide arranjados na forma de “flor”. (D) Microscopia da fase leveduriforme de *S. schenckii* com células na forma de “charuto” e aparência pleomórfica com formação de pseudo-hifa.

Fontes: adaptado de Aung et al. [25]; Bonifaz et al. [29].

2.1.4 Epidemiologia

Geografia

A esporotricose possui distribuição mundial com algumas regiões endêmicas [17,26,29,46,47]. É comum em áreas tropicais e subtropicais [17,25] com clima quente e umidade favoráveis para o desenvolvimento fúngico [24,46-48]. A incidência mundial desta doença é desconhecida, mas sabe-se que Japão, China, Austrália, Índia, América do Sul e Central são as regiões onde essa infecção possui uma frequência maior [27,38,46] (Figura 6).



Figura 6. Distribuição mundial da esporotricose.

Fonte: adaptado de Chakrabarti et al. [27].

Condição socioeconômica

Esta micose subcutânea é considerada uma “doença tropical negligenciada”, sendo mais prevalente em populações de baixa renda, com pouca voz política, baixa visibilidade [36,49] e com difícil acesso a serviços de saúde [27], representando um problema de saúde em países da América Latina [49]. Além disso, esta infecção não é de notificação obrigatória, o que dificulta determinar sua incidência [29,49].

Estudos epidemiológicos realizados no Peru confirmam que a distribuição conhecida da esporotricose no país é em área onde a doença tem sido, historicamente, um problema de saúde [49], visto que as áreas endêmicas são caracterizadas por condições sanitárias e moradias precárias além de pouco acesso aos serviços de saúde, o que dificulta a erradicação e o controle da doença [45].

Doença ocupacional

Por ser tipicamente adquirida por inoculação traumática em áreas rurais ou por profissionais que lidam com plantas e no campo [17,18,28,38,46-48,50,51], a esporotricose também é considerada uma doença ocupacional [24]. Popularmente, é conhecida como “doença do jardineiro” [18,28,38].

Em um estudo de investigação epidemiológica realizado na Austrália, todos os pacientes que trabalhavam no campo, com contato direto com feno [52]. Uma das formas de diminuir casos de esporotricose relacionados com a manipulação do feno, foi realizar recomendações para os produtores e trabalhadores: usar roupas que protejam o manipulador (luvas e camisas de manga comprida); evitar o acondicionamento do produto durante a estação das monções, já que a chuva favorece uma umidade favorável pro desenvolvimento fúngico; e, ainda, a inspeção visual do feno para evitar vendê-lo contaminado [52].

Zoonose

A transmissão zoonótica tem sido reportada por mordidas de inseto, manipulação de peixes, mordidas de gatos, pássaros, cachorros, ratos, répteis e cavalos [26,46]. A incidência desse tipo de transmissão vem aumentando, principalmente no Brasil [18,34], onde casos têm sido relatados nos estados Rio de Janeiro (com maior número de casos reportados), Rio Grande do Sul e São Paulo [31,32,34] (Figura 7).

Gatos têm sido uma problemática por serem fonte de infecção e disseminação na epidemia de esporotricose no Brasil, sendo 97% dos isolados identificados como *S. brasiliensis* [15,18,20,26,32,34,46]. Os casos de esporotricose felina causados por *S. schenckii* e *S. globosa* são ocasionais e extremamente raros, respectivamente [22]. Devido à epidemia que ocorreu a partir do ano 2000, o número de infecções humanas por esporotricose aumentou de 759 (1998) para mais de 4000 (2014) no Rio de Janeiro [36] (Figura 8).

No caso dos cães, a esporotricose é uma doença mais esporádica, aproximadamente 80% dos casos identificados são devidos o contato deles com gatos

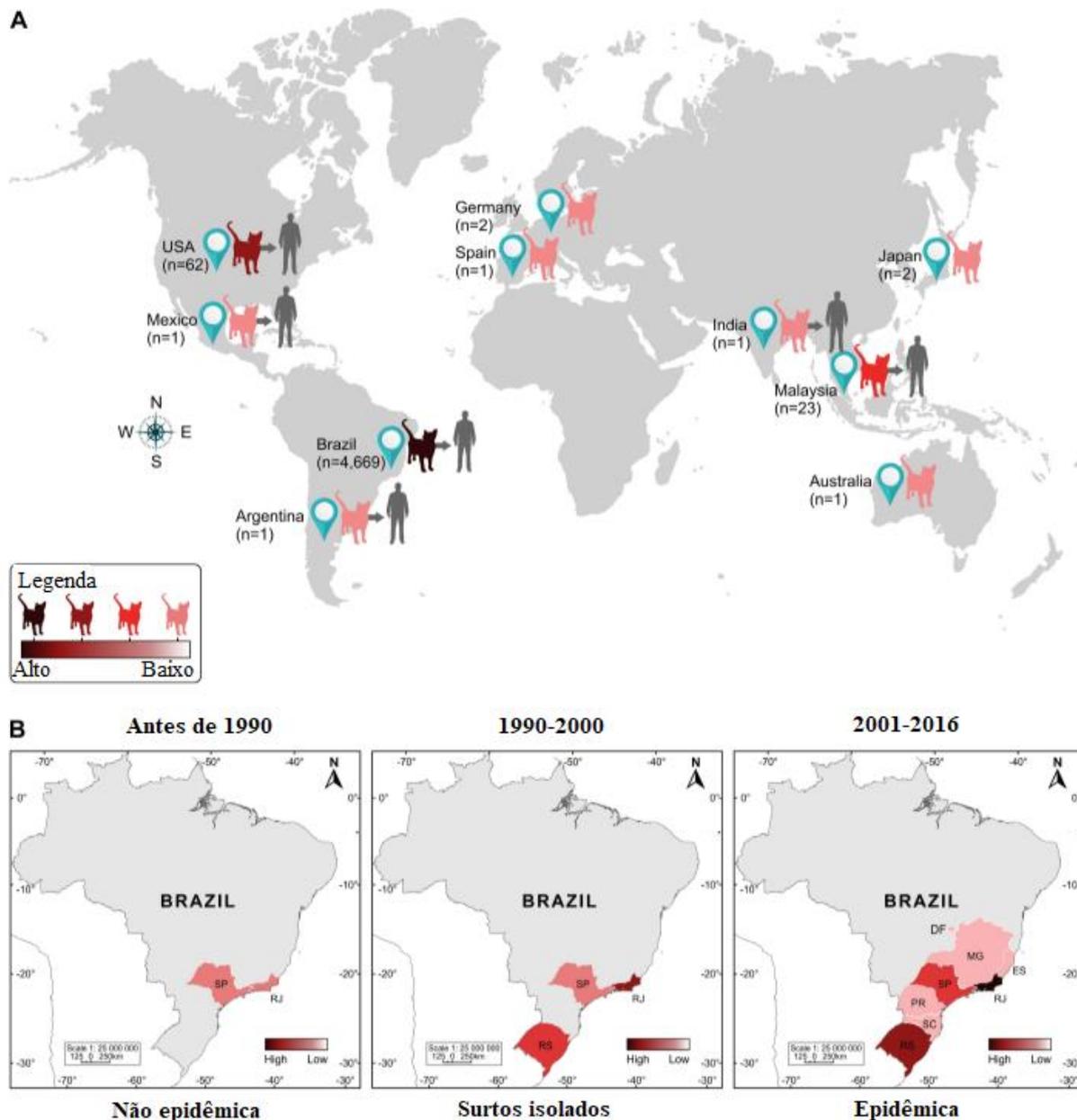


Figura 7. (A) Esporotricose felina pelo mundo com casos isolados ou pequenos surtos. Região Sul do Brasil com maiores casos de esporotricose felina causada por *S. brasiliensis*. Fora do Brasil, maioria dos casos de zoonose é causado por *S. schenckii*. (B) Evolução da esporotricose felina no Brasil.

Fonte: adaptado de Gremião et al. [34].

[53]. Como os felinos são a chave e fonte de transmissão dessa doença, foi realizada uma avaliação dessa população em áreas endêmicas [34]. A transmissão da esporotricose por gatos tem sido documentada em casos isolados, como Austrália, Espanha, Japão e Alemanha, e em pequenos surtos na América e Ásia [34] (Figura 7).

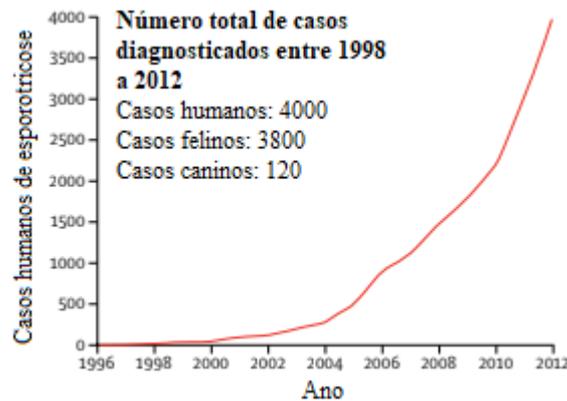


Figura 8. Casos de esporotricose felina em humanos de 1998 a 2012 no estado do Rio de Janeiro.

Fonte: adaptado de Queiroz-Telles et al. [36].

Idade, gênero, fatores de risco

A esporotricose pode ocorrer em qualquer pessoa, independentemente da idade, do gênero ou das comorbidades [24,27,51]. Dois terços dos casos de esporotricose são em jovens adultos, maioria entre 16 a 35 anos, e um terço dos casos ocorre em crianças entre 5 a 15 anos [29]. Hábitos ocupacionais, recreacionais e aspectos culturais das diferentes populações que aumentam o risco de infecção [27].

Em alguns estudos realizados no Peru, foi possível verificar que a maioria das pessoas acometidas por essa infecção é do sexo masculino, faixa etária menor que 15 anos, e forma clínica mais comum é a linfocutânea, sendo o rosto a principal região acometida [49,54]. Essas características variam de acordo com a região devido às diferentes culturas: na Índia e no Japão, a esporotricose é mais frequente em mulheres devido seu maior envolvimento na agricultura [17,24]. No caso do Brasil, a maioria das infecções por esporotricose ocorre em homens adultos que possuem contato frequente com o solo devido a sua situação ocupacional [27]. Em relação a transmissão zoonótica, a prevalência é maior em mulheres do lar, com média de 39 anos [27,29].

As partes mais acometidas numa infecção por *Sporothrix* spp. são as mais expostas devido a inoculação traumática, principalmente as extremidades do corpo [46]. Os membros superiores são mais comumente afetados do que os membros inferiores [46].

Além disso, a esporotricose tem aumentado sua incidência em pacientes imunodeprimidos, aparecendo como uma coinfeção em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV), por exemplo [15,48]. Nesses casos, a manifestação

clínica mais comum é a disseminada devido a imunossupressão associada com o vírus [24,26,48].

Outros fatores de risco também são relatados além da atividade ocupacional: alcoolismo, diabetes mellitus, neoplasias, doença pulmonar obstrutiva crônica, transplante de órgãos, uso de imunossupressores, entre outros [15,24].

2.1.5 Fatores de Virulência

Diferentes perfis de virulência são relatados em micro-organismos capazes de sobreviver no ambiente [23]. Isso ocorre devido à diversidade encontrada decorrente do polimorfismo genético e, conseqüentemente, surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos utilizados na clínica [23]. Além disso, o entendimento desses fatores de virulência também é importante na diferenciação das espécies fúngicas [19]. Aminopeptidase I, glucanase, Mn- superóxido dismutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A liase (HMG-CoA), acetil-CoA hidrolase, proteína de ligação à progesterona e biossíntese de ramnolipídeos estão todos envolvidos com a evasão do sistema imune do hospedeiro e são expressas diferentemente em *S. brasiliensis* quando comparado com *S. schenckii* [19].

O gênero *Sporothrix*, na literatura, possui relatos de diferentes moléculas e mecanismos que agem como fatores de virulência [19], conforme descritos a seguir.

Dimorfismo fúngico

Dimorfismo é a habilidade que alguns fungos exibem [29] na dualidade fenotípica que ocorre a partir de um processo de diferenciação celular, que pode estar relacionado com a patogenicidade [19]. Em resposta a um estímulo térmico e outras condições ambientais [23], há a troca entre as fases leveduriforme e filamentosa de um fungo [17,23]. Quando encontrado no ambiente, *Sporothrix* spp. cresce na forma filamentosa (25 °C) e produz conídio que, quando transmitido aos humanos ou outro hospedeiro, é capaz de se converter na forma de levedura (37 °C), conhecida como a fase patogênica, responsável por instalar a infecção [23].

O dimorfismo está muito relacionado com a adaptação do fungo com mudanças que ocorrem no ambiente e, a forma leveduriforme, de aumentar sua virulência [23]. Uma das explicações para o dimorfismo está relacionada com a histidina quinase (SsDRK1) [19,20,23], proteína que regula a expressão de genes de virulência e patogenicidade *in vivo* [19].

Termotolerância

Esse fator de virulência está diretamente relacionado com o dimorfismo, o qual é essencial para a sobrevivência do fungo no hospedeiro [19]. Um isolado ambiental de *Sporothrix* spp. que não se adapta à temperatura corporal do hospedeiro, não é capaz de produzir infecção [19].

Melanina

Conhecida como “armadura do fungo”, a melanina é um importante fator de virulência para muitos fungos patogênicos [19,23]. O pigmento na célula fúngica aumenta a sobrevivência do micro-organismo no hospedeiro, uma vez que a célula se torna mais resistente a processos de defesa do hospedeiro, como a fagocitose, morte pelos macrófagos e neutrófilos [19,23,34]. Além disso, a melanização também reduz a suscetibilidade de degradação enzimática e protege o fungo contra toxicidade de metais pesados, luz ultravioleta, radiação nuclear, temperaturas extremas e radicais livres de oxigênio e nitrogênio [18,19,23], tendo ação antioxidante ao prevenir a morte da célula fúngica pelo peróxido de hidrogênio [26]. Na área clínica, a melanina fúngica é um problema ao reduzir a suscetibilidade do fungo patogênico contra antifúngicos [23,34], como anfotericina B [19].

As rotas de produção de melanina pelo *Sporothrix* spp. são 1,8-di-hidroxi-naftaleno e L-DOPA [19,23]. Porém, uma terceira rota foi observada nas espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*, conhecida como L-tirosina (piomelanina).

Vesículas

Várias vesículas associadas a proteínas já foram relatadas em *Sporothrix* spp. [19]. A glucanase extracelular é uma proteína que se encontra na parede celular fúngica transportada por vesículas, que induz lise de macrófagos e outras células do hospedeiro devido à remodelação de sua superfície [19].

Parede celular fúngica

Estrutura essencial para viabilidade e interação do micro-organismo com o ambiente, ao proteger a célula das drásticas mudanças ao meio externo [23,24], além de conter macromoléculas envolvidas na virulência de fungos patogênicos [20]. No tecido do hospedeiro, a parede celular fúngica protege o micro-organismo contra condições agressivas [23], a exemplo do ergosterol [24], presente na membrana celular do fungo que o protege contra morte oxidativa pelas células fagocíticas do hospedeiro [17,23,34].

A parede do gênero *Sporothrix* é composta por glicanos, galactomananas, ramnomanas, quitina, glicoproteínas, glicolipídeos e melanina [20,23,25]. Os glicoconjugados peptidoramnomanana (PRM) e peptidoramnogalactano, compostos por manose, ramnose e galactose, também estão presentes na parede celular de *Sporothrix* spp. [26]. A PRM é uma molécula de estudo, uma vez que esta é reconhecida por anticorpos IgG presentes no soro e proteínas da matriz celular do hospedeiro quando ocorre a infecção por *Sporothrix* spp. [26].

Outra molécula importante da parede celular fúngica é a superóxido dismutase [19,23]. Esta proteína contribui para o desenvolvimento e sobrevivência do patógeno em condições de estresse oxidativo, como quando fagocitado pelo macrófago [19,23].

Produção enzimática

Algumas proteases, como a proteinase I, possuem papel importante na interação do fungo *Sporothrix* spp. com as células do hospedeiro, sendo associada com a habilidade de invadir tecidos cutâneos [19,23]. Outras enzimas são relatadas na literatura para *Sporothrix* spp.: Urease e DNases também contribuem para o dano no tecido do

hospedeiro e sintomas clínicos [25]. No ambiente, a proteinase tem função nutricional [23]. Catalase, que está envolvida na proteção do fungo contra radicais livres; nitrorredutase, que confere resistência ao fungo contra óxido nítrico dentro dos fagócitos [23].

Adesinas

Importante fator de virulência na patogenicidade dos fungos [19], sendo essencial para a colonização e estabelecimento da infecção [23]. No caso do *Sporothrix* spp., as adesinas medeiam a ligação de leveduras na matriz da derme [19,25]. A principal adesina relatada para *Sporothrix* spp. é a glicoproteína de 70 kDa, conhecida como Gp 70 [18], a qual participa da adesão do fungo na derme e na matriz subendotelial do hospedeiro [23,25,26]. Essa proteína é fundamental na modulação da resposta imune do hospedeiro e é altamente imunogênica [18,19,26,44]. A alta expressão dessa molécula é associada com um perfil de menor virulência das cepas, o que resulta em uma resposta protetora desse antígeno ao hospedeiro [23,26]. A presença da Gp 70 já foi confirmada nas espécies *S. schenckii*, *S. brasiliensis* e *S. globosa* [44]. Outra glicoproteína estudada como fator de virulência é a 60 kDa, a qual estabelece função de adesão do fungo na matriz extracelular [34].

Sideróforos

A capacidade de acúmulo de ferro é crucial para a sobrevivência do fungo em diferentes condições [23]. *Sporothrix* spp. é capaz de produzir seus próprios sideróforos quando há baixa disponibilidade de ferro [23]. Essas estruturas auxiliam o fungo na captação de ferro no ambiente e no hospedeiro ao apresentarem ação de quelante [23]. Esse mecanismo pode estar envolvido na patogenicidade e sobrevivência do fungo quando este é submetido a condições de estresse no ambiente ou no hospedeiro [23].

Fatores de virulência estão relacionados com os diferentes níveis de patogenicidade encontradas nas espécies de *Sporothrix*: *S. brasiliensis* é a espécie mais

patogênica, seguida por *S. schenckii*, quando comparada com *S. albicans*, *S. globosa* e *S. mexicana* [15], isso porque *S. brasiliensis* expressa mais fatores de virulência, como urease e melanina [15,18], e são mais suscetíveis a causar doença disseminada [15]. O aumento da virulência de *S. brasiliensis* também está relacionado com a sua resistência contra estresse oxidativo no hospedeiro, o que explicaria sua maior carga fúngica, ser mais invasivo e resultar danos extensos nos tecidos do hospedeiro quando comparado com outras espécies do complexo [34]. Não obstante, células mononucleares do sangue periférico humano reconhece diferentemente *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, o que explicaria também a maior patogenicidade de *S. brasiliensis*: *S. schenckii* estimularia maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias e *S. brasiliensis* maiores níveis de IL-10 [15].

2.1.6 Manifestações Clínicas

A esporotricose, em humanos, pode-se apresentar como micose aguda e crônica [18] com variadas manifestações clínicas [23]. Ainda não é conhecido o período exato de incubação dessa infecção fúngica, mas oscila de alguns dias a alguns meses para o desenvolvimento de sintomas [28,46,51], geralmente, em média, três semanas [46,55].

Basicamente, a esporotricose é dividida em duas categorias [15]: forma clínica cutânea (linfocutânea, cutânea fixa e cutânea disseminada ou multifocal) e extracutânea [29,36,46,47].

Linfocutânea

Lesão mais comum de ser desenvolvida pela esporotricose, variando entre 70-80% dos casos de lesão cutânea [18,23,35,47,56]. Primeiramente, a pele e o sistema linfático que são acometidos [46,57] a partir do aparecimento de um nódulo papular pequeno e endurecido [46,55], que pode ulcerar (cancro esporotricótico) [28,46], no sítio da inoculação traumática, com progressivo aumento [46]. Não causa sintomas sistêmicos e, com o decorrer do tempo, há o aparecimento de múltiplas lesões com nódulos similares no decorrer dos vasos linfáticos (padrão esporotricóide) [23,28,35,43,46,51,55], com ou sem a presença de adenopatia satélite transitória [28,46].

As lesões secundárias que surgem pelos vasos linfáticos possuem morfologia variada, como pápulas eritematosas, nódulos ou, na fase crônica, placas com superfície lisa ou verrucosa, que podem amolecer ou ulcerar [24,29,46,51]. Na forma linfocutânea (Figura 9), as áreas mais afetadas, geralmente, são as extremidades [24,46], como as mãos, pés, pernas e face [28]. A maioria dos casos é assintomática [46,55,58], mas pode tornar-se dolorida, com prurido, além de ocorrer febre ou calafrios [35,40,46].



Figura 9. (A-H) Apresentação clínica da forma linfocutânea da esporotricose.

Fonte: adaptado de Conceição-Silva et al [18]; Gaviria-Giraldo et al [24]; Rasamoelina et al [28]; Govender et al [40]; Carrasco-Zuber et al [43]; Mahajan et al [46].

Cutânea fixa

Este tipo de esporotricose é típico das áreas endêmicas [43], e representa em torno de 20-30% dos casos de esporotricose [24,56]. A forma cutânea fixa (Figura 10) é caracterizada por ser localizada no sítio de inoculação [18,23,29,43,46,55], sem

envolvimento linfático [23,35,55]. A área da face é a mais afetada nessa forma clínica quando comparada com a linfocutânea [24,46], podendo ter a presença de lesões satélites [24]. O pescoço e o tronco também são regiões comuns de serem acometidas nesse tipo de manifestação da esporotricose [28].

Essas lesões são assintomáticas, eritematosas, com pápulas, papulopústulas, nódulos ou placas verrucosas [24,29,46], halo violáceo [29] e, ocasionalmente, presença de úlcera ou pequenos abscessos que não melhoram com o passar do tempo [46]. Hospedeiros ditos como resistentes ao agente etiológico da esporotricose, com lesões mínimas e boas respostas ao tratamento, geralmente desencadeiam a forma clínica cutânea fixa [46].



Figura 10. (A-C) Apresentação clínica da forma cutânea fixa da esporotricose.

Fonte: adaptado de Conceição-Silva et al [18]; Mahajan et al [46].

Cutânea disseminada ou multifocal

Manifestação rara de ocorrer, sendo a maioria dos pacientes imunocomprometidos [29]. Geralmente, o hospedeiro apresenta três ou mais lesões em diferentes sítios anatômicos [15,46,55] com múltiplas implantações traumáticas do fungo ou, com menos frequência, propagação hematogênica em indivíduos que, aparentemente, não possuem fatores de predisposição para imunossupressão [23,29,46].

Esta forma clínica é caracterizada por nódulos ulcerados e placas verrucosas, podendo afetar mucosas (boca, glândula do pênis, faringe), ossos, articulações [29] e, possivelmente, ocorrendo envolvimento osteoarticular [15,55]. Esporotricose disseminada (Figura 11) pode acometer outras áreas, como fígado, coração (endocardite),

genitália, seios nasais (sinusite) e rim, muitas vezes sendo identificado apenas na necropsia [29].



Figura 11. Apresentação clínica da forma cutânea disseminada da esporotricose associada ao alcoolismo.

Fonte: adaptado de Bonifaz et al [29].

Extracutânea

Dentre todas as lesões possíveis da esporotricose, a forma extracutânea, também conhecida como sistêmica, é a mais rara de ocorrer e está diretamente ligada com a imunossupressão [23,28,29,31,36,46,55,57] sendo mais frequente em pacientes alcoólatras, diabéticos, usuários de corticoesteroides ou imunossupressores, entre outros [46]. Para pacientes HIV positivos, a esporotricose é considerada uma micose emergente [55]. Basicamente, a esporotricose extracutânea ocorre por propagação hematogênica [16,46,55] a partir do sítio primário da inoculação traumática ou por doença pulmonária existente em pacientes imunocomprometidos [15,35,36,46].

As manifestações mais usuais para a forma extracutânea são sinusite, doença pulmonar, ocular, sistema nervoso central, meningite e endoftalmite [46,58,59]. Esporotricose ocular é raramente descrita, porém há relatos na literatura sobre

esporotricose causando dacriocistite aguda, com presença de fístula e podendo tornar-se crônica [60]. Para indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes, esporotricose osteoarticular é a manifestação mais comum [15,28,43,46,61] e, geralmente, começa como uma doença monoarticular sem acometimento sistêmico [46]. Nesses casos há dor, e pode ocorrer comprometimento funcional em casos não tratados [46].

Doença pulmonar a partir da inalação de conídios é incomum [16,23,28,43,46,62] e é caracterizada por tosse, febre baixa, perda de peso, fibrose, cavitação parecida com tuberculose [25,43,46,62] e, raramente, hemoptise maciça [46]. Pacientes imunodeprimidos, particularmente indivíduos com HIV, podem desenvolver esporotricose pulmonar metastática [43]. Além disso, há relatos de esporotricose com envolvimento no sistema nervoso central, com sintomas de meningite, confusão mental, dores de cabeça, febre, vômitos, meningoencefalite e hidrocefalia [29,46].

Pacientes brasileiros com esporotricose possuem um quadro clínico variado, como presença de eritema multiforme, lesões cutâneas disseminadas e formas atípicas [46]. Essas diferentes manifestações clínicas são atribuídas pelas formas de inoculação (como tamanho e profundidade), pela imunidade do hospedeiro, pela virulência do fungo e, apesar de ainda não bem compreendido, pela termotolerância do fungo [24,27,29,46].

2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico da esporotricose é realizado através da anamnese do paciente, sinais clínicos, exames histopatológicos e culturas positivas [57]. Outras ferramentas podem auxiliar nessa etapa, porém a mais relevante é o isolamento do agente etiológico a partir de espécimes clínicos [15] e na cultura fúngica [51].

Os sinais clínicos da esporotricose são variados, logo, é necessário um diagnóstico diferencial, principalmente para histoplasmose, fungemia [29], tuberculose cutânea, leishmaniose cutânea, nocardiose, cromoblastomicose, blastomicose, paracoccidiodomicose e micobactéria atípica [46].

Exame micológico direto

Exame micológico direto utiliza o hidróxido de potássio (KOH) em pus obtido de nódulos [43,46], porém a positividade nesse tipo de análise é baixa devido à baixa carga de elementos fúngicos (pequenas leveduras esféricas ou alongadas no formato de “charuto” [28,29]) na maioria das amostras clínicas [16], principalmente nas formas linfocutânea e cutânea fixa [20,29,43,56]. A observação de leveduras ocorre apenas em uma pequena porcentagem de casos (5-10%) e geralmente nas formas cutânea disseminada e na esporotricose pulmonar [29]. Hospedeiros imunocomprometidos podem representar uma maior sensibilidade no exame direto, especialmente pacientes HIV positivos com baixa contagem de células CD4, visto que a carga fúngica nesse grupo é alta [15].

Colorações do tipo Gram, Giemsa, ácido periódico de Schiff (PAS) e Grocott-Gomori podem ser utilizadas com sucesso nas formas clínicas disseminadas [20,28,29] e extracutânea [46]. No Gram, é possível visualizar a forma parasítica próxima de células polimorfonucleares ou multinucleadas [56]. No PAS, é possível analisar leveduras alongadas [56]. Ao invés de colorações, pode-se utilizar a técnica de imunofluorescência direta [29,56], uma ferramenta com alta sensibilidade para diagnósticos, mas em países subdesenvolvidos não é usada na rotina [56]. É importante salientar que o exame direto não permite a diferenciação das espécies de *Sporothrix* spp. [20].

Exame micológico cultural

O padrão ouro para diagnosticar esporotricose é baseado no exame cultural convencional dos espécimes clínicos a partir de lesões ativas, pus, secreções ou biópsias [16,36,38,46,56]. Por não ser considerado um colonizador natural, amostras clínicas positivas para *Sporothrix* spp. são consideradas diagnóstico [16]. As amostras são cultivadas em ágar Sabouraud (AS) com antibiótico [20,28,29,43], ágar sangue e ágar Brain Heart Infusion (BHI) [15], podendo ser realizado testes adicionais, tais como ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos [25] e caracterização fenotípica, que é compartilhada por várias espécies ambientais de *Sporothrix* spp. [20]. Na prática, *Sporothrix* spp. é identificado pelas características morfológicas das colônias, aparência microscópica (principalmente quando há alta carga fúngica [36]) e análise da presença de dimorfismo [46].

O cultivo das amostras em AS entre 25 a 28 °C geralmente é rápido, de 5 a 8 dias, porém são necessárias duas semanas [20] para a identificação do fungo e confirmação do diagnóstico [25,29,43,46] e, em alguns casos, pode ser necessária a observação por um mês antes do diagnóstico negativo e descarte da cultura [15,20,36]. Colônias características são, inicialmente, brancas amareladas, cremosas e brilhantes, e com o passar dos dias acabam ficando branco bege, com pigmento escuro no centro e radiada [28,43,56]. Microscopicamente, apresenta o desenvolvimento de hifas finas e ramificadas (1-2 µm) com conidióforos eretos com numerosos conídios unicelulares hialinos, dispostos no formato de flor de margarida [28,29,46,50,56]. Numerosos conídios sésses, amarronzados, globosos ou triangulares, são observados ao longo de hifas indiferenciadas [20].

A demonstração do dimorfismo é importante para confirmar o suposto agente etiológico [20,25], e pode ser analisada em ágar sangue, ágar chocolate ou ágar BHI à 37 °C para observação da forma leveduriforme [28,29,46,56], com células que variam de 2,5-5,0 x 3,5-6,5 µm de tamanho [28]. Para observação da forma filamentosa, pode-se incubar a cultura em temperatura ambiente [15].

Para diferenciação de espécies clinicamente relevantes, as características morfológicas são insuficientes [15,20]. O diagnóstico morfológico completo é finalizado pela técnica molecular dos espécimes clínicos ou das colônias cultivadas [28].

Biologia molecular

Ferramentas moleculares são necessárias para a identificação definitiva das espécies crípticas [15,20,40]. O diagnóstico molecular é uma etapa chave no manejo do tratamento do paciente e, no ponto de vista epidemiológico. Também auxilia no reconhecimento e controle de surtos decorrentes de espécies distintas de *Sporothrix* spp. [20,26].

A técnica de reação da cadeia de polimerase (PCR) pode ser utilizada em tecidos provenientes de biópsia para rápido diagnóstico [57] a partir da amplificação de regiões genéticas específicas, com o objetivo de identificar o patógeno [17,25,29,43,46,56]. Testes imunoenzimáticos, como ELISA e *Western blot*, apresentaram bastante acurácia e pouca reatividade cruzada para detectar variadas formas clínicas de esporotricose [36].

A abordagem molecular é um bom método de diagnóstico e prognóstico [29], e é útil para as formas clínicas cutâneas, sistêmicas e atípicas ou quando não há lesão visível para a identificação da presença do patógeno [56]. Uma maneira é a utilização do antígeno para esporotricose: SsCBF (*Sporothrix schenckii* Con A-Binding Fraction) se liga aos anticorpos IgG e podem ser detectados na pele, no soro e em outros fluidos com alta sensibilidade e especificidade (90 e 80%, respectivamente) [29,56]. Essa análise pode ser utilizada para monitoramento do tratamento da infecção, pois possui alta correlação com a clínica [56].

Exame histopatológico

É rara a identificação do fungo na análise histopatológica devido à baixa carga fúngica obtida de biópsias [56]. São realizadas duas biópsias de punção ou, dependendo do caso, é realizada uma só e dividida em duas partes: um fragmento é destinado para análise histopatológica e outro para o cultivo do fungo [56]. Como há dificuldade em ver as estruturas fúngicas no tecido, um mínimo de 20 cortes seriados de blocos de parafina é recomendado [56].

Colorações do tipo PAS e Gomori-Grocott são obrigatórias para análise histopatológica, e podem ser observados corpos asteroides (Figura 12) (15-35 μ m de diâmetro) [15,25,28,56], que são encontrados entre 40-85% dos casos de esporotricose crônica, principalmente na forma cutânea fixa [15,56], ou formas pleomórficas do fungo [25].

Para observar corpos asteroides, também conhecido como o fenômeno Splendore-Hoeppli [17,28,29,43,50,56], uma técnica foi descrita onde os exsudatos das lesões são colocados em uma superfície com solução salina e uma gota de solução de formaldeído 10% [56]. Após isso, é observado ao microscópio a presença de leveduras cercadas por material eosinofílico do hospedeiro [43,46,56]. Devido à alta sensibilidade (aproximadamente 93,75%), essa técnica permite o diagnóstico e o tratamento precoces [56]. Esse tipo de estrutura é mais visível em cortes histológicos, mas são raros pela dificuldade de observação [28]. Corpos asteroides extracelulares são mais característicos de esporotricose [43] e são mais fáceis de serem encontrados em casos de doença disseminada ou visceral [43].

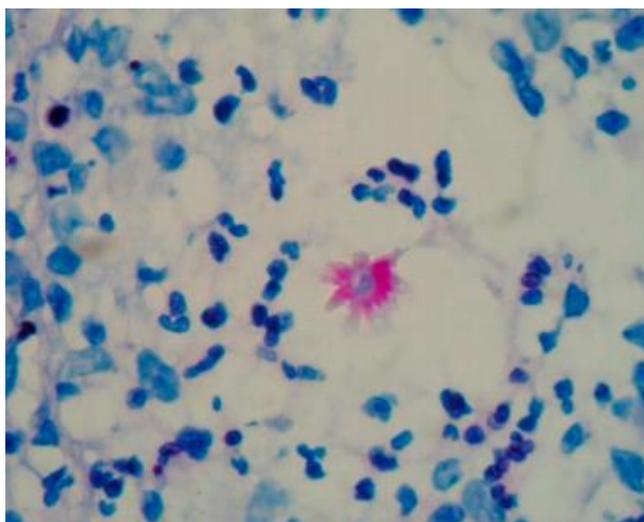


Figura 12. Corpo asteroide cercado por neutrófilos em um corte histopatológico corado com PAS.

Fonte: adaptado de Arenas et al [56].

Métodos sorológicos, imunológicos e teste esporotriquina

Métodos sorológicos com diferentes antígenos para detectar anticorpos circulantes são mais acurados no diagnóstico de esporotricose em humanos e espécimes clínicos [16,25,26,38], principalmente grupos especiais, como pacientes HIV positivos, pediátricos ou para aqueles que a infecção possui uma diversidade clínica como a artrite [26]. Especificidade e sensibilidade dos testes variam de acordo com a detecção do anticorpo, antígeno empregado e fase de crescimento do fungo (se micelial ou leveduriforme) [25]. Teste na pele da esporotriquina [16,17,25,28,46] é uma reação intradérmica que pode auxiliar no diagnóstico dos casos de esporotricose linfocutânea e cutânea fixa [29]. Outros métodos utilizados na detecção de anticorpos em pacientes infectados também foram descritos, com níveis diferentes de sensibilidade, especificidade e reações cruzadas [28].

Alguns testes imunológicos ainda não são aceitos em alguns lugares da União Europeia e nos Estados Unidos devido à falta de padronização [56]. Porém, em outros países, como o México, são ferramentas úteis para informar sobre o sistema imune do paciente, principalmente a imunidade celular, e para compor dados epidemiológicos [56]. Além disso, os testes imunológicos ajudam a compreender melhor a hipersensibilidade

contra o fungo, e podem ser utilizados em ambas as formas da esporotricose, cutânea e extracutânea [56]. Atualmente, o único teste imunológico comercialmente disponível para esporotricose é a técnica de aglutinação em látex [15].

Exames de imagem

Dependendo da forma clínica e do órgão acometido, os exames de imagem podem auxiliar no diagnóstico, como radiografia do peito em casos de manifestação da esporotricose pulmonar e osteoarticular [16,46].

2.1.8 Tratamento

A resolução espontânea da esporotricose é rara, sendo necessária a realização de um tratamento na maioria dos casos [24,25], o qual irá depender de vários fatores, como manifestações clínicas, sistema imune do hospedeiro e a espécie causadora da doença [19]. Devido às diferenças na suscetibilidade aos antifúngicos entre as espécies, o longo período de tratamento, o alto custo, os efeitos colaterais, entre outros, terapias alternativas, como termoterapia e excisão cirúrgica [63], são recomendadas para tratar infecções por *Sporothrix* spp. [19]. A terapia convencional para esporotricose pode ser visualizada na Tabela 1.

O itraconazol (ITZ) é o fármaco de escolha no tratamento da maioria dos pacientes com esporotricose [17,35,57,64], sendo utilizado para todas as formas da doença [36]. Para as formas linfocutânea e cutânea fixa, recomenda-se o uso de ITZ por 3 a 6 meses [15,24,29,43]. Em casos específicos, quando a imunossupressão ainda é mantida, um período maior de tratamento é necessário [15]. O ITZ é contraindicado para mulheres grávidas ou no período de lactação [38,43].

Solução saturada de iodeto de potássio (KI) também se mostra efetiva para formas de esporotricose não severas [15,50] com resposta imune celular adequada, com resultado positivo para o teste de esporotriquina [35], mas é fácil a indução de efeitos gastrointestinais [64]. Devido ao seu baixo custo, ainda é tratamento de escolha em alguns países que possuem recursos limitados [28,38,57], como Peru [38]. Antes da introdução

dos azólicos em 1990, KI era o tratamento de escolha para esporotricose [17]. É um fármaco barato e, na sua grande maioria, bem tolerado [28]. KI modula o sistema imune, porém seu mecanismo ainda não é bem explicado [43]. A cura da forma linfocutânea ao usar KI varia de 2 a 3 meses, e para esporotricose extracutânea KI não se mostra efetivo [28]. KI é contraindicado para mulheres grávidas ou no período de lactação [38,43].

A terbinafina (TRB) é utilizada se o tratamento com ITZ for contraindicado [15], sendo uma opção efetiva para esporotricose [35,57]. Para os casos de esporotricose cutânea é necessário realizar o tratamento por um período de 3 a 6 meses [43].

O fluconazol (FCZ) é utilizado apenas se o paciente não tolera os fármacos descritos anteriormente [24]. O período de tratamento com FCZ varia de 3 a 6 meses [43].

Anfotericina B (AMB) é utilizada em casos de esporotricose disseminada, sistêmica, pulmonária, osteoarticular [19] e meningite [36]. Nesses casos, o paciente inicia AMB até obter melhora clínica para, então, trocar o tratamento para ITZ [15,25,29]. No caso de mulheres grávidas (com 12 semanas ou mais de gestação) com esporotricose grave, como formas disseminadas, pulmonares e presença de imunossupressão, recomenda-se o uso de AMB [17,24,38].

Em relação às terapias alternativas, têm-se como opções a termoterapia e criocirurgia [35]. A termoterapia age a partir da aplicação de calor (42 a 43 °C) nas lesões, de uma a três vezes por dia, com um total de 40 a 60 minutos a sessão, por dois a três meses [43], até resolução das lesões [29]. A cirurgia envolve a remoção da lesão e apresenta importância em alguns casos, como nas formas osteoarticular [43]. Ambas as opções são consideradas como terapias complementares em situações específicas, como em casos de gravidez, interação medicamentosa, entre outros [35].

Estuda-se formulação de vacinas para prevenir infecções de esporotricose e controlar a carga fúngica [19,34]. Anticorpos monoclonais que reconhecem Gp 70 e Gp 60 no soro de pacientes são candidatos a vacinas para reduzir a transmissão dos agentes etiológicos da esporotricose [34]. A participação de proteínas presentes na parede celular de *Sporothrix* spp. pode gerar respostas imunes no hospedeiro, podendo ser uma alternativa para obtenção de efeito imunoprotetor [19].

Tabela 1. Tratamento para esporotricose recomendado pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América.

Manifestação clínica	Tratamento de escolha [dose]	Tratamento alternativo	Comentários
Esporotricose linfocutânea	ITZ [200 mg/dia]	ITZ [200 mg, b.i.d]; ou TRB [500 mg, b.i.d]; ou KI com aumento de dose; ou FCZ [400-800 mg/dia]; ou hipertermia local	Tratar por 2 a 4 semanas após resolução das lesões.
Osteoarticular	ITZ [200 mg, b.i.d]	AMB lipídica [3-5 mg/kg/dia]; ou AMB desoxicolato [0,7-1 mg/kg/dia]	Trocar para ITZ após obter resposta favorável com AMB; tratar por um período de, no mínimo, 12 meses.
Pulmonar	AMB lipídica [3-5 mg/kg/dia] e após ITZ [200 mg, b.i.d]; ou ITZ [200 mg, b.i.d]	AMB desoxicolato [0,7-1 mg/kg/dia] e após ITZ [200 mg, b.i.d]; ou remoção cirúrgica	Tratar doença severa com formulação AMB seguido de ITZ; tratar doença menos severa com ITZ; tratar por um período de, no mínimo, 12 meses.
Meningite	AMB lipídica [3-5 mg/kg/dia] e após ITZ [200 mg, b.i.d]	AMB desoxicolato [0,7-1 mg/kg/dia] e após ITZ [200 mg, b.i.d]	Duração de terapia com AMB ainda não estabelecida, mas recomenda-se, pelo menos, 4 a 6 semanas; tratar por um período total de

			12 meses; pode exigir supressão com ITZ a longo prazo.
Disseminada	AMB lipídica [3-5 mg/kg/dia] e após ITZ [200 mg, b.i.d]	AMB desoxicolato [0,7-1 mg/kg/dia] e após ITZ [200 mg, b.i.d]	Terapia com AMB deve ser utilizada até melhora do paciente; tratar por um período total de 12 meses; pode exigir supressão com ITZ a longo prazo.
Mulheres grávidas	AMB lipídica [3-5 mg/kg/dia] ou AMB desoxicolato [0,7-1 mg/kg/dia] para esporotricose severa; hipertermia local para doença cutânea		É preferível aguardar até após o parto para tratar formas de esporotricose não fatais.
Crianças	ITZ [6-10 mg/kg/dia; máximo de 400 mg/dia] para doença branda; AMB desoxicolato [0,7 mg/kg/dia] para doença severa	KI com aumento gradual da dose para doença branda	Tratar formas severas da esporotricose com formulação de AMB seguido de ITZ.

b.i.d, duas vezes por dia; ITZ, itraconazol; TRB, terbinafina; KI, solução saturada de iodeto de potássio; FCZ, fluconazol; AMB, anfotericina B.

Fonte: adaptado de Kauffman et al [65].

2.1.9 Ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos

Os estudos que realizaram o teste de atividade antifúngica baseado no protocolo para fungos filamentosos M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2008 [66] foram selecionados para análise do ensaio de suscetibilidade dos isolados de *Sporothrix* spp. a antifúngicos.

Realizar testes de suscetibilidade aos antifúngicos em *Sporothrix* spp. pode auxiliar na identificação de cepas multirresistentes aos antifúngicos, além de melhorar a capacidade de ajustes terapêuticos e redução de recorrência [67].

Como ainda não existem pontos de corte estabelecidos para *Sporothrix* spp., o documento M38-A2 [66] sugere que, para questões analíticas e comparativas, isolados que possuem uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou Concentração Efetiva Mínima (CEM) $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ são resistentes; $2 \mu\text{g/mL}$ são intermediários; $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ são suscetíveis para ITZ, AMB, voriconazol (VRZ), posaconazol (PSZ) e caspofungina (CAS). Importante lembrar que ainda não há estudos que correlacionem resultados CIM/CEM obtidos *in vitro* com o resultado na clínica *in vivo* [66].

Na Tabela 2 encontram-se os estudos incluídos na análise, com as respectivas espécies e antifúngicos testados, os tamanhos amostrais, as CIM ou CEM obtidas e o tipo de distribuição utilizada.

Tabela 2. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações efetivas mínimas (CEM) de antifúngicos contra espécies de *Sporothrix* spp. descritos nos 23 estudos encontrados na literatura até março de 2019 que utilizaram o protocolo para fungos filamentosos M38-A2 do CLSI.

Isolados	n	Distribuição	CIM / CEM (µg/mL)												Referência	
			TRB	VRZ	KI	PSZ	KTZ	ITZ	AMB	FCZ	MCZ	5-FC	CAS	ANI		MFG
<i>S. pallida / S. albicans</i>																
	1			8		4		>16		>256		>256	4	1	2	73
	1		0,25		7,8			0,13	>16	4						68
	1		0,25	8			4	>128								69
	1		0,125	4			4	32	1	128	8		32			70
<i>S. schenckii</i>																
	37	Mín-Máx	0,03-0,25	1-16			0,06-2	0,06-1	0,03-2	16-128	0,5-4		8-32			70
	2	Mín-Máx		>16			0,5-1	0,5->16	0,25	32-64			>16			71
	22	Mín-Máx	0,01-0,5				0,03-1	0,06-2	0,5-2	32->128						72
	39	Mín-Máx		4->16		0,06->16		0,25->16	1->16	>64		6->64	2->16			67
	4	Mín-Máx	0,03-0,12				0,5-1	1-8	4-8							74
	38	Mín-Máx	0,06-1	0,5-8		0,5-8		0,125-2	0,5-4	64->64			0,5-8	0,25-8	0,5-8	75
	1		1		250			2	1	>64						68
	5	Mín-Máx	0,13-1	16->16				0,25-2	1-8	64->64						76
	36	Mín-Máx	0,03-0,25	1-16			0,06-2	0,03-1								69
	10	Mín-Máx	0,03-0,25				0,125-1	0,06-1								77
	9	Mín-Máx		8->16				0,5->16	1-4	32->128	0,03-1	0,12->128			0,12-1	78
	1		0,25	>16		2	4	16	8	>64						79
	2	Mín-Máx	0,03-0,12				0,25-2	0,25-16		32-64						80

25	Mín-Máx					0,06-0,5	8-16		0,13-1	0,13-4	0,13-2	0,5-4	128-256		8-128		81	
13	Mín-Máx																82	
<i>S. brasiliensis</i>																		
1						0,25	8			0,5	0,25	0,5	64	2		16	70	
13	Mín-Máx					0,01-0,25				0,12-0,5	0,06-2	0,5-2	32->128				72	
22	Mín-Máx						2->16		0,5-2		0,25-4	1-8	>64		64->64	>16	67	
35	Mín-Máx					0,0156-4					0,25-8	0,125-8					83	
48	Mín-Máx						2-64			0,0312-2	0,125-2	0,125-4	62,5-500			0,25-32	84	
335	Mín-Máx					0,015-1			0,06-2	0,03-2	0,06-16	0,12-8					85	
25	Mín-Máx					0,03-0,12	2->16		0,5-1	0,5-2	1-2	0,5-4					86	
1						0,25	8			0,5	0,25						69	
2	Mín-Máx					0,03-0,06				0,5	1	1-2					74	
2	Mín-Máx					0,06			1	0,25-0,5	0,5	4					53	
32	Média					0,1	6,15		0,7		2,55	1,3					87	
8	Mín-Máx					0,13-0,5	8-16		0,25-2	0,13-2	0,25-2	0,5-4	128		64-128		82	
10	Mín-Máx						8->16			0,0625-1	0,25-2	0,25-1	64->64			>16	71	
<i>S. luriei</i>																		
1						0,25	2			4	32	0,5	64	8		32	70	
1						1	31,25				1	4	>64				68	
<i>S. globosa</i>																		
4	Mín-Máx						2-8		0,5-16		0,5->16	2->16	>64		>64	8->16	67	
2	Mín-Máx					0,25-0,5	0,5-4		0,5	2	1-8	2-8	128		16-128		82	
13	Mín-Máx										0,06-1						81	
16	Mín-Máx					0,06-1	31,25->500				0,5-1	0,13-4	0,5->64				68	
38	Mín-Máx						8->16				0,5-1	2	>128	0,03-0,5	0,5-4		0,12->16	78
1						0,25	16			2	8						69	

2	Mín-Máx	1-2	16		4-8	4-8		16	88	
4	Mín-Máx	1-2	4->16		1->16	4-8	32->64		76	
2	Mín-Máx		>16		0,5	1-2	0,5	16-32	>16	71
<i>S. mexicana</i>										
4	Mín-Máx		16->16		0,5-2	0,5-1	1-8	32->64	>16	71
13	Mín-Máx	0,01-0,5			0,03-1	0,03-2	0,5-4	32->128		72
3	Mín-Máx		1->16	1->16	2->16	8->16	>64	>64	8->16	67
1		8		62,5		4	8	>64		68
1		0,25	16		4	32				69
<i>S. brunneoviolacea</i>										
1		2		62,5		1	1	4		68
<i>S. humicola</i>										
1		2		31,25		0,06	8	>64		68
<i>S. inflata</i>										
1		0,06		31,25		1	0,25	>64		68
<i>S. variecibatus</i>										
1		0,06		31,25		1	1	4		68
<i>S. lignivora</i>										
1		1		62,5		>16	8	1		68
<i>S. dimorphospora</i>										
1		1		25,65		4	4	1		68

TRB, terbinafina; VRZ, voriconazol; KI, iodeto de potássio; PSZ, posaconazol; KTZ, cetoconazol; ITZ, itraconazol; AMB, anfotericina B; FCZ, fluconazol; MCZ, miconazol; 5-FC, flucitosina; CAS, caspofungina; ANI, anidulafungina; MFG, micafungina.

As CIM dos antifúngicos mais baixos sugerem melhor atividade em relação a cepa analisada [66]. Ao analisar os estudos incluídos e os dados obtidos na tabela 2, pode-se observar que:

- ITZ, AMB e FCZ foram os antifúngicos mais avaliados nos estudos. Das 12 espécies de *Sporothrix* spp. analisadas, todas foram avaliadas para esses antifúngicos;

- ITZ e AMB obtiveram amostras sensíveis, intermediárias e resistentes a eles. Oito e nove espécies de *Sporothrix* spp. mostraram resistência para ITZ e AMB, respectivamente: *S. albicans*, *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. lignivora* e *S. dimorphospora* e *S. luriei* (para ambos os fármacos); Apenas *S. humicola* mostrou-se resistente para AMB;

- Todas as amostras avaliadas para TRB mostraram CIM baixos, com apenas dois estudos com espécies resistentes a esse antifúngico: *S. mexicana* [68] e *S. brasiliensis* [83]. De todos os antifúngicos testados, TRB foi a que obteve melhores resultados para os isolados de *Sporothrix* spp.;

- Altas CIM para FCZ foram encontradas (8/12; CIM \geq 64 $\mu\text{g/mL}$);

- Voriconazol (VRZ) não foi analisado em todos os estudos, porém CIM \geq 4 $\mu\text{g/mL}$ foram encontradas quando esse foi analisado para *S. albicans*, *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*;

- Miconazol (MCZ) e KI foram pouco testados e não possuem sugestões de ponto de corte;

- Flucitosina (5-FC) foi pouco testada e possui baixa atividade para os isolados testados;

- Caspofungina (CAS) foi a equinocandina mais testada para *Sporothrix* spp. CAS não foi analisada em todas as espécies, mas foi observada resistência a este antifúngico nas que foram avaliadas;

- Anidulafungina (ANI) e micafungina (MFG) são da classe das equinocandinas e foram pouco avaliadas. Isolados testados a estes antifúngicos mostraram respostas variáveis de suscetibilidade.

2.2 Relação do ferro com fungos patogênicos

Ferro é um elemento essencial para todos os organismos vivos [89-94], sendo um componente-chave em muitos processos metabólicos [90,95], tais como transporte de

oxigênio, estoque de moléculas, catalisador de reações, entre outros [90,96-101]. Apesar de essencial, o ferro apresenta toxicidade [90,91] em sistemas biológicos e prejudicial quando presente em altas quantidades [90,101].

A competição pelo ferro entre hospedeiro e patógeno durante infecção é crítico para o micro-organismo obter sucesso no estabelecimento da infecção [100,102]. O sistema imune inato do hospedeiro diminui a disponibilidade de ferro livre a fim de limitar o crescimento do micro-organismo [94,100,102], estratégia defensiva conhecida como imunidade nutricional [98,100,103,104]. Estudo anterior realizado com *Aspergillus fumigatus* analisou a capacidade do fungo em remover ferro da transferrina sérica produzido durante a infecção [105]. Micro-organismos fúngicos já desenvolveram mecanismos capazes de obter ferro do hospedeiro ao empregar múltiplos sistemas especializados para adquirir este elemento de ambientes onde há limitação de ferro, como sideróforos, que são moléculas quelantes de ferro com alta afinidade, e/ou sistemas de assimilação redutora de ferro ligada à membrana [91].

Foi demonstrado em estudos que o ferro é essencial para o crescimento fúngico, sendo considerado um fator limitante para seu crescimento e desenvolvimento [92], além de ter um papel crítico na virulência do micro-organismo, principalmente pela sua resistência a espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas por células fagocíticas e capacidade de adaptação em condições de hipóxia geradas durante a infecção [105]. O uso de quelantes de ferro poderia ser utilizado como adjuvante em tratamento de infecções fúngicas como inibidor do crescimento conidial de micro-organismos [105].

2.3 Deferasirox

Deferasirox (DEF) foi aprovado nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (2005) e *European Medicine Agency* (2006) para tratamentos da sobrecarga crônica de ferro devido transfusões de sangue frequentes (≥ 2 anos de idade) ou pacientes com talassemia (≥ 10 anos de idade) [106-118]. É um quelante de ferro tridentado [111,113,119-121] (Figura 13) que se liga ao ferro numa proporção 2:1 (DEF:ferro) [111,113,119,121]. Isso permite uma maior afinidade ao ferro, ao se ligar seletivamente ao ferro plasmático [122,123], e menor afinidade para outros elementos, como cobre e zinco [119,122].

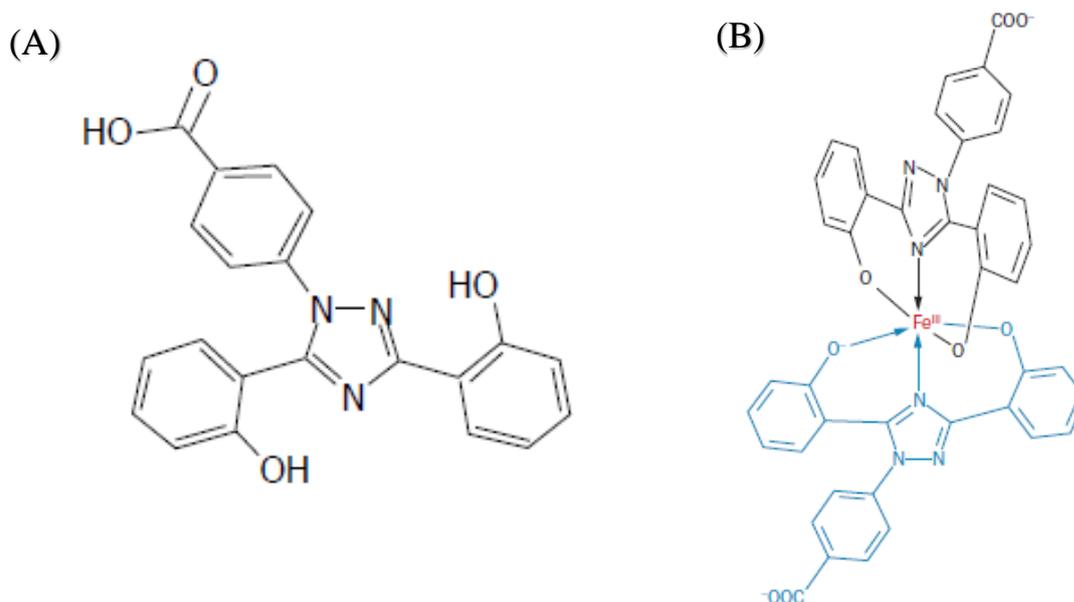


Figura 13. Estrutura química de deferasirox sozinho (A) e quando complexado com o ferro (B).

Fonte: adaptado de Díaz-García et al [111] e Kontoghiorghe et al [124].

A dose recomendada de DEF para sobrecarga de ferro vai depender da apresentação do fármaco: dose inicial de 20 mg/kg/dia e dose máxima de 40 mg/kg/dia (tablets dispersíveis) [106,121,124]; dose inicial de 14 mg/kg/dia e dose máxima de 28 mg/kg/dia (comprimido revestido) [106,113]. O tempo de meia vida é de 8 a 16 horas, o que permite sua administração uma vez ao dia [110,112-114,117,121,122,125,126], e sua excreção é fecal [106].

Os principais desafios no uso de DEF é seu custo (principalmente em doses maiores) e os efeitos adversos [121], sendo este último mais comum em pacientes idosos com predisposição a síndrome mielodisplásica, doença renal ou hepática e as queixas são dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, rash cutânea, complicações oftálmicas [106,109,119,123,127,128] além de nefrotoxicidade [111,113,125,127,129-131] e hepatotoxicidade [129,131]. No entanto, na grande maioria, DEF é bem tolerado e com efeitos adversos manejáveis [110].

A administração de DEF oral pode evitar dano tecidual, principalmente para o fígado e pâncreas [120]. Pacientes que utilizam DEF pode necessitar ajuste de dose em resposta à toxicidade renal e hepática [106]. DEF é contraindicado em pacientes com *clearance* de creatinina < 40 mL/min ou creatinina sérica maior que o dobro do limite normal de acordo com sua idade [131]. Também não é recomendada a utilização de DEF

por mulheres grávidas, já que estudos em animais evidenciaram toxicidade fetal, salvo casos em que os benefícios do uso de DEF supere os riscos potenciais ao feto [122].

Ao utilizar DEF, deve ser realizado monitoramento do paciente através dos exames: creatinina sérica, *clearance* creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e bilirrubina [106,129]. Esse monitoramento deve ser realizado no início do tratamento, a cada duas semanas no primeiro mês e, depois, mensalmente [106,129].

2.3.1 Deferasirox e fungos patogênicos

O ferro é essencial para a virulência de micro-organismos, como *Aspergillus* spp. e Mucorales [132,133], e a sobrecarga desse elemento pode predispor infecção fúngica [132,134]. A quelação de ferro pode ser promissora como adjuvante na terapia dessas infecções [105,132]. Alguns estudos já analisaram a utilização de DEF contra alguns micro-organismos.

Zigomicetos:

-DEF foi fungicida contra Zigomicetos, bem abaixo dos níveis séricos clinicamente alcançáveis [105,132];

-Realizou proteção em ratos contra a morte quando infectados por mucormicose [132];

-Sinergismo foi obtida pela combinação entre DEF + AMB lipídica + MFG com aumento consistente na sobrevivência dos camundongos e redução da carga fúngica nos tecidos [133];

-DEF possuiu atividade fungicida *in vitro* [135,136] contra 28 de 29 isolados clínicos de Mucorales; aumentou a resposta inflamatória do hospedeiro; quando combinado com AMB lipídico aumentou significativamente a sobrevivência dos camundongos e reduziu a carga fúngica tecidual [136];

-DEF protegeu significativamente *Drosophila melanogaster* WT infectado com *Rhizopus oryzae* quando comparado com as moscas controle [137].

Aspergilose:

-DEF + AMB lipídica foi eficaz no tratamento experimental em camundongo [132];

-Sinergismo foi obtido pela combinação entre DEF + AMB lipídica + MFG com aumento considerável na sobrevivência dos camundongos e redução da carga fúngica nos tecidos [133];

-DEF foi fungicida *in vitro* contra *A. fumigatus*; monoterapia com DEF prolongou a sobrevivência dos camundongos com aspergilose invasiva pulmonar; combinação DEF + AMB lipídica foi sinérgica, aumentou sobrevivência e reduziu a carga fúngica nos pulmões [138].

Outros:

-DEF inibiu crescimento de *Cryptococcus* spp. e *Saccharomyces* spp. mas não houve sinergismo consistente com diferentes antifúngicos: AMB, ITZ, CAS, FCZ, VRZ [139];

-CIM e concentração fungicida mínima (CFM) de DEF *in vitro* para isolados de *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Alternaria* spp. e *Bipolaris* spp. foram altas [140];

A padronização das condições do teste de DEF como adjuvante no tratamento de infecções fúngicas ainda são críticas para desenvolvimento e interpretação dos testes *in vitro* para essa nova classe terapêutica [141].

2.4 Estresse oxidativo

A habilidade do fungo em causar doença depende da sua capacidade de sobrevivência no hospedeiro [142], como a aderência às células, secretar enzimas extracelulares e resposta ao estresse oxidativo [143], sendo este último muito importante para a patogênese de muitas doenças fúngicas [144]. Esses mecanismos de patogenicidade são complexos, podendo ocorrer variabilidade intra- e interespecies dependendo da resposta imune do hospedeiro [142].

Sporothrix spp. passa por algumas barreiras para estabelecer a infecção, sendo a mais importante o sistema imune do hospedeiro [145]. Durante a fase oxidativa, ao interagir com o patógeno, os fagócitos do hospedeiro produzem EROs, componente essencial da resposta imune contra invasão de micro-organismos [142,143,145]. Em

suma, EROs são formados pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial pela redução parcial de O₂, gerando ânions superóxidos – que possuem atividade fungicida e fungistática - peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxil [145]. O sistema imune utiliza os EROs como uma maneira de eliminar o agente infeccioso ao causar danos irreversíveis em seus componentes celulares e, eventualmente, a morte celular [142,143].

A função da célula do sistema imune está intimamente ligada com a geração de EROs, o qual é fortemente influenciada pelo potencial redox do ambiente extracelular [142]. O equilíbrio entre as formas oxidantes e antioxidantes é importante e determinante na atividade da célula imune [142]. A forma antioxidante tem um papel crucial para proteger e preservar as células contra o estresse oxidativo [142]. Quando há um erro nesse balanço entre a forma oxidativa (onde há formação de componentes oxidantes) e antioxidante (sistema defensivo) ocorre estresse oxidativo, tendo, como resultado, um aumento nas EROs como tentativa de exterminar a infecção fúngica, porém o seu excesso pode causar dano tecidual, contribuindo para fisiopatologia da doença [144].

Alguns micro-organismos desenvolveram mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que os capacitam a detoxificar as EROs e evadir células fagocíticas. Ao analisar a resposta de algumas espécies de *Sporothrix* spp. ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, observou-se que *S. brasiliensis* é mais resistente quando comparado com *S. schenckii* (apresenta heterogeneidade nos perfis de virulência) [142,143,145], o que sugere diferentes estratégias de adaptação entre as espécies, expressão de proteínas, além da resposta humoral do hospedeiro, fenômenos os quais estão relacionados com a virulência [145]. Tais resultados corroboram com estudos que mostram que patógenos provenientes de plantas são menos resistentes ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio do que aqueles patógenos humanos [142]. *S. brasiliensis* está normalmente associado com surtos e zoonoses no Brasil devido a sua adaptação aos felinos, os quais são capazes de infectar os humanos [142]. Já *S. schenckii* está muito relacionado em causar infecção por inoculação traumática a partir de plantas, solo e vegetais contaminados por esse fungo [143].

Espécies do complexo *Sporothrix* desempenham diferentes estratégias adaptativas que influenciam a rota de infecção [142]. Essas diferenças também podem afetar a patogenicidade resultante de cada espécie no hospedeiro [142]. A espécie mais virulenta e patogênica é *S. brasiliensis*, seguido de *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. pallida* [142].

3. MARCO CONCEITUAL

O conceito da pesquisa foi averiguar a relação de *Sporothrix* spp. com o elemento ferro, delineando um perfil de suscetibilidade a fim de analisar como este se comporta nas diferentes concentrações desse metal. Além disso, analisar como o quelante de ferro DEF atua em conjunto com o antifúngico ITZ, fármaco de escolha para esporotricose, mas que possui relatos de resistência na literatura. Na Figura 14 está representado o conceito de pesquisa deste estudo, apresentando a problemática existente - resistência ao antifúngico ITZ para esporotricose – assim como os testes desenvolvidos. Tal cenário impulsiona a novas buscas de tratamento alternativos, como a combinação de fármacos existentes na indústria farmacêutica. O presente estudo visa justamente fazer uma análise *in vitro* entre DEF e ITZ com isolados clínicos de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, através da técnica de microdiluição, determinando as CIM desses fármacos isoladamente e os Índices de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) para determinar qual tipo de interação prevalece. Outras análises foram realizadas para analisar o comportamento de *Sporothrix* spp. quando exposto ao ferro: afinidade de *Sporothrix* spp. ao ferro; resposta de *Sporothrix* spp. ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio e taxa de crescimento/viabilidade com 2,3-bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) quando cultivados em diferentes concentrações de ferro.

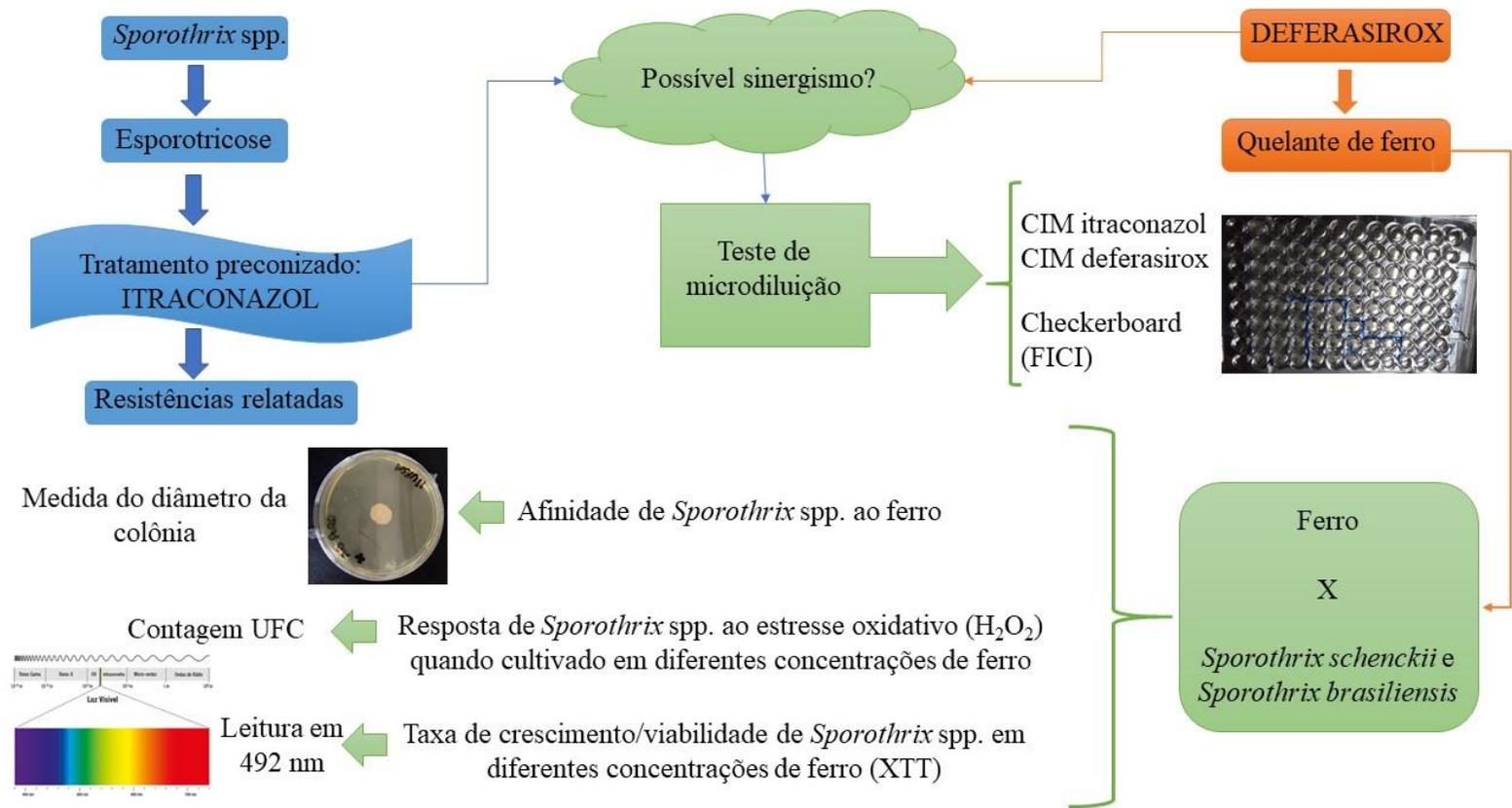


Figura 14. Mapa conceitual da dissertação de mestrado sobre *Sporothrix* spp. e sua relação com o ferro e estudo de sinergismo entre deferasirox e itraconazol. FICI (índice de concentração inibitória fracionada); CIM (concentração inibitória mínima); UFC (unidade formadora de colônia).

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento deste trabalho justifica-se pelo fato que não há relatos da suscetibilidade de *Sporothrix* spp. frente à combinação de DEF e ITZ. O DEF pode vir a ser um aliado no tratamento da esporotricose, visto que é um quelante de ferro, nutriente necessário para desenvolvimento de alguns micro-organismos, como já verificado para outros fungos patogênicos, como os pertencentes ao grupo Mucorales.

4 OBJETIVOS

5.1 Primários

Avaliar a suscetibilidade de *Sporothrix* spp. frente à combinação de DEF e ITZ.

5.2 Secundários

- a) Avaliar o crescimento de *Sporothrix* spp. em placas de ágar batata dextrose, contendo diferentes concentrações de ferro;
- b) Avaliar a resposta de *Sporothrix* spp. quando submetido ao estresse oxidativo ao ser cultivado em meios de cultura com diferentes concentrações de ferro;
- c) Determinar a taxa de crescimento de *Sporothrix* spp. frente a diferentes concentrações de ferro, através do ensaio de redução com XTT;
- d) Determinar as CIM de DEF e ITZ e os FICI, através da técnica de microdiluição.

6. REFERÊNCIAS

1. Crothers SL, White SD, Ihrke PJ, Affolter VK. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). *Vet. Dermatol.* 2009;20:249-59.
2. Stopiglia CDO. Caracterização de isolados do complexo *Sporothrix schenckii* provenientes de diferentes estados brasileiros. Porto Alegre, Brasil, 2013;192p. (Tese PhD. Programa de Pós-Graduação de Medicina: Ciências Médicas, UFRGS).
3. Vásquez-Del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* 2012;30:437-43.
4. Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med. Mycol.* 2011;49: 225-236.
5. Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrillon MR, Mendes SDC, Heidrich D, Valente P, Scroferneker ML. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Med. Mycol.* 2014;52:56-64.
6. Silva-Vergara ML, Maneira FRZ, Oliveira RM, Santos CTB, Etchebehere M, Adad SJ. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. *Med. Mycol.* 2005;43:187-90.
7. Borba-Santos LP, Gagini T, Ishida K, Souza W, Rozental S. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with *in vitro* low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. *J. Med. Microbiol.* 2015;64:415-422.
8. Krakhecke AG, Afonso E, Ferreira JC, Candido RC. *In vitro* susceptibility testing of *Microsporium gypseum* isolates from health cattle and soil samples against itraconazole, terbinafine, fluoconazole and topical veterinarian drugs. *Mycopathologia*, 2005;159:377-380.
9. Meinerz ARM, Nascente PS, Schuch LFD, Cleff MB, Santin P, Brum CS, Nobre MO, Meireles MCA, Mello JRB. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007;40:60-2.
10. Kumar SN, Siji JV, Nambisa NB, Mohandas C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012;28:3143-150.

11. Jackson C, Agboke A, Nwoke V. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. *J. Med. Plants Res.* 2009;3:666-9.
12. Ibrahim AS, Gebermariam T, Fu Y, Lin L, Husseiny MI, French SW. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J. Clin. Invest.* 2007;117:2649–57.
13. Lewis RE, Pongas GN, Albert N, Bem-Ami R, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Activity of deferasirox in Mucorales: Influences of species and exogenous iron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55:411–3.
14. Zanette RA, Bitencourt PER, Kontoyiannis DP, Kighera RA, Flores MM, Kommers GD, Silva PS, Ludwig A, Moretto MB, Alves SH, Santurio JM. Complex interaction of deferasirox and *Pythium insidiosum*: Iron-dependent attenuation of growth *in vitro* and immunotherapy-like enhancement of immune responses *in vivo*. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0118932.
15. Queiroz-Telles F, Buccheri R, Benard G. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. *J. Fungi.* 2019;5:8.
16. Mango ALD, Zanetti G, Penha D, Barreto MM, Marchiori E. Endemic pulmonary fungal diseases in immunocompetent patients: an emphasis on thoracic imaging. *Expert Rev. Respir. Med.* 2019;13:263-77.
17. Sizar O, Talati R. Sporotrichosis (*Sporothrix schenckii*). *StatPearls.* Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532255/>>. Acessado dia 01/09/2019.
18. Conceição-Silva F, Morgado FN. Immunopathogenesis of human sporotrichosis: What we already know. *J. Fungi.* 2018;4:89.
19. Carnero LCG, Pérez NEL, Hernández SEG, Álvarez JAM. Immunity and treatment of sporotrichosis. *J. Fungi.* 2018;4:100.
20. Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, Nino-Veja G, Rodrigues AM, Camargo ZP, Hoog GS. Sporotrichosis between 1898 and 2017: the evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Med. Mycol.* 2018;126-43.
21. Schenck B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. *John Hopkins Hosp.* 1898;9:286-90.
22. Moussa TAA, Kadasa NMS, Zahrani HSA, Ahmed SA, Feng P, van den Ende AHGG, Zhang Y, Kano R, Li F, Li S, Song Y, Dong B, Rossato L, Dolatabadi S,

- Hoog GS. Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. *J. Med. Microbiol.* 2017;66:560-69.
23. Téllez MD, Batista-Duarte A, Portuondo D, Quinello C, Bonne-Hernández R, Carlos IZ. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. *Microbiology.* 2014;160:2352-65.
24. Gaviria-Giraldo CM, Cardona-Castro N. Esporotricosis y cromoblastomycosis: revisión de la literatura. *Rev. CES Med.* 2017;31:77-91.
25. Aung AK, Spelman DW, Thompson PJ. Pulmonary sporotrichosis: an evolving clinical paradigm. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2015;36:756-66.
26. Mora-Montes HM, Dantas AS, Trujillo-Esquivel E, Baptista ARS, Lopes-Bezerra LM. Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(6):fov065.
27. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med. Mycol.* 2015;53:3-14.
28. Rasamoelina T, Raharolahy O, Rakotozaandrindrainy N, Ranaivo I, Andrianarison M, Rakotonirina B, Maubon D, Rakotomalala FA, Andrianarivelo MR, Andriantsimahavandy A, Rabenja FR, Ramarozatovo LS, Cornet M. Chromoblastomycosis and sporotrichosis, two endemic but neglected fungal infections in Madagascar. *J. Mycol. Med.* 2017;27:312-24.
29. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. *J. Fungi.* 2017;3:6.
30. Lutz A, Splendore A. About a mycosis observed in men and rats. *Rev. Med. São Paulo.* 1907;21:433-50.
31. Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Lazéra MS, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:3251-6.
32. Gremião IDF, Menezes RC, Schubach TMP, Figueiredo ABF, Cavalcanti MCH, Pereira SA. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med. Mycol.* 2014;00:1-7.
33. Rodrigues AM, Hoog GS, Camargo ZP. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. *PLoS Pathog.* 2016;12(7):e1005638.
34. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006077.

35. Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. Nodular lymphangitis (Sporotrichoid lymphocutaneous infections). Clues to differential diagnosis. *J. Fungi*. 2018;4:56.
36. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect. Dis*. 2017;17(11):e367-e377.
37. Alba-Fierro C, Pérez-Torres A, Toriello C, Romo-Lozano Y, López-Romero E, Ruiz-Baca E. Molecular Components of the *Sporothrix schenckii* Complex that Induce Immune Response. *Curr. Microbiol*. 2016;73:292-300.
38. Macalupú SZ. Esporotricosis y paracoccidioidomicosis in Perú: experiencias em prevección y control. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica*. 2014;31:352-7.
39. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol*. 2007;45:3198-206.
40. Govender NP, Maphanga TG, Zulu TG, Patel J, Walaza S, Jacobs C, Ebonwu JI, Ntuli S, Naicker SD, Thomas J. An outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2015;9(9):e0004096.
41. Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med. Mycol*. 2008;46:621-5.
42. Siew HH. The current status of feline sporotrichosis in Malaysia. *Med. Mycol. J*. 2017;58:e-107-e113.
43. Carrasco-Zuber JE, Navarrete-Dechent C, Bonifaz A, Fich F, Vial-Letelier V, Berroeta-Mauriziano D. Cutaneous involvement in the deep mycoses: a literature review. Part I – Subcutaneous Mycoses. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107:806-815.
44. García-Carnero LC, Pérez-García LA, Martínez-Álvarez JÁ, Reyes-Martínez JE, Mora-Montes HM. Current trends to control fungal pathogens: exploiting our knowledge in the host-pathogen interaction. *Infect. Drug Resist*. 2018;11:903-13.
45. Soto MCR. Sporotrichosis: The story of an endemic region in Perú over 28 years (1985 to 2012). *PLoS one*. 2015;10(6):e0127924.
46. Mahajan VK. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. *Dermatol. Res. Pract*. 2014;2014:272376.
47. Chen M, Xu Y, Hong N, Yang Y, Lei W, Du L, Zhao J, Lei X, Xiong L, Cai L, Xu H, Pan W, Liao W. Epidemiology of fungal infections in China. *Front. Med*. 2018;12:58-75.

48. Moreira JAS, Freitas DFS, Lamas CC. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. *Infection*. 2015;43:267-76.
49. Soto MCR, Malaga G. Subcutaneous mycoses in Peru: a systematic review and meta-analysis for the burden of disease. *Int. J. Dermatol.* 2017;56:1037-45.
50. Mahmoudi S, Zaini F. Sporotrichosis in Iran: a mini review of reported cases in patients suspected to cutaneous leishmaniasis. *Curr. Med. Mycol.* 2015;1:39-45.
51. Clebak KT, Malone MA. Skin Infections. *Prim. Care*. 2018;45:433-54.
52. McGuinness SL, Boyd R, Kidd S, McLeod C, Krause VL, Ralph AP. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, Northern Territory, Australia. *BMC Infect. Dis.* 2016;16:16.
53. Viana PG, Figueiredo ABF, Gremião IDF, Miranda LHM, Antonio IMS, Boechat JS, Machado ACS, Oliveira MME, Pereira SA. Successful treatment of canine sporotrichosis with terbinafine: Case reports and literature review. *Mycopathologia*. 2018;183:471-78.
54. Soto MCR. Sporotrichosis among children of a hyperendemic area in Peru: an 8-year retrospective study. *Int. J. Dermatol.* 2017;56:868-72.
55. Flores AF, Lima MS, Guzman RA. Morphological Findings of Deep Cutaneous Fungal Infections. *Am. J. Dermatopathol.* 2014;36:531-56.
56. Arenas R, Sánchez-Cardenas CD, Ramirez-Hobak L, Arriaga LFR, Memije EV. Sporotrichosis: From KOH to Molecular Biology. *J. Fungi*. 2018;4:62.
57. Nor NM, Baseri MM. Skin and subcutaneous infections in south-east Asia. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2015;28:133-8.
58. Soto MCR. Differences in clinical ocular outcomes between exogenous and endogenous endophthalmitis caused by *Sporothrix*: a systematic review of published literature. *Br. J. Ophthalmol.* 2018;102:977-82.
59. Soto MCR, Bonifaz A, Sánchez AT. Endophthalmitis in patients co-infected by HIV and sporotrichosis: a systematic review of published case reports. *Eye (Lond)*. 2018;32:1678-1680.
60. Freitas DFS, Lima IAR, Curi CL, Jordão L, Zancopé-Oliveira RM, Valle ACF, Galhardo MCG, Curi ALL. Acute dacryocystitis: another clinical manifestation of sporotrichosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2014;109:262-4.
61. Lederer HT, Sullivan E, Crum-Cianflone NF. Sporotrichosis as an unusual case of osteomyelitis: A case report and review of the literature. *Med. Mycol. Case Rep.* 2016;11:31-5.

62. Rojas FD, Fernández MS, Lucchelli JM, Lombardi D, Malet J, Vetrivano ME, Cattana ME, Sosa MA, Giusiano G. Cavitory Pulmonary Sporotrichosis: Case Report and Literature Review. *Mycopathologia*. 2017;182:1119-23.
63. Waller SB, Madrid IM, Faria RO, Cleff MB, Mello JRB, Meireles MCA. Anti-*Sporothrix* spp. activity of medicinal plants. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2016;52:221-37.
64. Chen S, Sun KY, Feng XW, Ran X, Lama J, Ran YP. Efficacy and safety of itraconazole use in infants. *World J. Pediatr.* 2016;12:399-407.
65. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2007;45:1255-65.
66. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard—second edition. Wayne, PA: CLSI; 2008 Document M38-A2.
67. Rodrigues AM, de Hoog, GS, Pires DC, Brilhante RSN, Sidrim JJC, Gadelha MF, Colombo AL, Camargo ZP. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:219.
68. Zhao M, Zhou X, Liu T, Yang Z. Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex. *Biomed. & Biotechnol.* 2015;16:940-47.
69. Oliveira DC, Loreto ES, Mario DAN, Lopes PGM, Neves LV, Rocha MP, Santurio JM, Alves SH. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2015;57:289-94.
70. Oliveira DC, Lopes PGM, Spader TB, Mahl CD, Tronco-Alves GR, Lara VM, Santurio JM, Alves SH. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* Complex identified in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:3047-49.
71. Brilhante RSN, Aguiar FRM, Silva MLQ, Oliveira JS, Camargo ZP, Rodrigues AM, Pereira VS, Serpa R, Castelo-Branco DSCM, Correia EEM, Pereira-Neto WA, Cordeiro RA, Rocha MFG, Sidrim JJC. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. *Med. Mycol.* 2017;0:1-10.
72. Stopiglia CDO, Heidrich D, Vieira FJ, Marchese DP, Sorrentino JM, Scroferneker ML. Comparison between two culture media for *in vitro* evaluation of antifungal

- susceptibility of the *Sporothrix schenckii* complex. An. Bras. Dermatol. 2012;87:561-5.
73. Morrison AS, Lockhart SR, Bromley JG, Kim JY, Burd EM. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. Med. Mycol. Case Rep. 2013;2:88-90.
74. Paes RA, Carvalho MHGF, Santos FB, Silva FA, Oliveira MME, Oliveira RMZ. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. PLoS ONE. 2016; 11 (3):e0152796.
75. Rojas OC, Bonifaz A, Campos C, Treviño-Rangel RJ, González-Álvarez R, González GM. Molecular identification, antifungal susceptibility, and geographic origin of clinical strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Mexico. J. Fungi. 2018;4:86.
76. Mahmoudi S, Zaini F, Kordbacheh P, Safara M, Heidari M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. Med. Mycol. 2016;54:593-99.
77. Alves SH, Boettcher CS, Oliveira DC, Tronco-Alves GR, Sgaria MA, Thadeu P, Oliveira LT, Santurio JM. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2010;43:523-25.
78. Suzuki R, Yikelamu A, Tanaka R, Igawa K, Yokozeki H, Yaguchi T. Studies in phylogeny, development of rapid identification on methods, antifungal susceptibility, and growth rates of clinical strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Japan. Med. Mycol. J. 2016;57:47-57.
79. Vettorato R, Heidrich D, Fraga F, Ribeiro AC, Pagani DM, Timotheo C, Amaro TG, Vettorato G, Scroferneker ML. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: Case report. Med. Mycol. Case Rep. 2018;19:18-20.
80. Heidrich D, Stopiglia CDO, Senter L, Vettorato G, Valente P, Scroferneker ML. Sucesso terapêutico da terbinafina em um caso de esporotricose. Na. Bras. Dermatol. 2011;86:182-5.
81. Flórez-Muñoz SV, Alzate JF, Mesa-Arango AC. Molecular identification and antifungal susceptibility of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* complex in Medellin, Colombia. Mycopathologia. 2019;184:53-63.

82. Córdoba S, Isla G, Szusz W, Vivot W, Hevia A, Davel G, Canteros CE. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii sensu lato* isolated in Argentina. *Mycoses*. 2018;61:441-8.
83. Sanchotene KO, Brandolt TM, Klafke GB, Poester VR, Xavier MO. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: comparison of yeasts and mycelial phases. *Med. Mycol.* 2016;0:1-8.
84. Brilhante RSN, Rodrigues AM, Sidrim JJC, Rocha MFG, Pereira SA, Gremião IDF, Schubach TMP, Camargo ZP. *In vitro* susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. *Med. Mycol.* 2015;0:1-5.
85. Paes RA, Santos FB, Carvalho MHGF, Machado ACS, Oliveira MME, Pereira AS, Galhardo MCG, Oliveira RMZ. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2017;112:376-81.
86. Paes RA, Oliveira MME, Freitas DFS, Valle ACF, Galhardo MCG, Oliveira RMZ. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to *in vivo* resistance. *Med. Mycol.* 2016;0:1-11.
87. Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, Fernandes GF, Castro R, Camargo ZP, Nucci M, Bezerra LML, Ishida K, Rozental S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med. Mycol.* 2014;0:1-11.
88. Zhang Y, Hagen F, Wan Z, Liu Y, Liu Y, Wang Q, de Hoog GS, Li R, Zhang J. Two cases of sporotrichosis of the right upper extremity in right-handed patients with diabetes mellitus. *Rev. Iberoam. Micol.* 2016;33:38-42.
89. Matsuo R, Mizobuchi S, Nakashima M, Miki K, Ayusawa D, Fukii M. Central roles of iron in the regulation of oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 2017;63:895-907.
90. Zhang X, Peng Y, Li X, Ma G, Chen X. Screening of iron-enriched fungus from natural environment and evaluation of organically bound iron bioavailability in rats. *Food Sci. Technol.* 2015;35:58-65.
91. Forester NT, Lane GA, Steringa M, Lamont IL, Johnson LJ. Contrasting roles of fungal siderophores in maintaining iron homeostasis in *Epichloë festucae*. *Fungal Genet. Biol.* 2018;111:60-72.

92. Comensoli L, Bindschedler S, Junier P, Joseph E. Iron and fungal physiology: a review of biotechnological opportunities. *Adv. Appl. Microbiol.* 2017;98:31-60.
93. Khan A, Singh P, Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiol. Res.* 2018;212-213:103-11.
94. Carver PL. The battle for iron between humans and microbes. *Curr. Med. Chem.* 2018;25:85-96.
95. Oladipo OG, Awotoye OO, Olayinka A, Bezuidenhout CC, Maboeta MS. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Braz. J. Microbiol.* 2018;49:29-37.
96. Martínez-Pastor MT, Perea-García A, Puig S. Mechanisms of iron sensing and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017;33:75.
97. Blatzer M, Latgé JP. Metal-homeostasis in the pathobiology of the opportunistic human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017;40:152-9.
98. Gerwien F, Skrahina V, Kasper L, Hube B, Brunke S. Metals in fungal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 2018;42:10.1093/femsre/fux050.
99. Tristão GB, Assunção LP, Santos LPA, Borges CL, Silva-Bailão MG, Soares CMA, Cavallaro G, Bailão AM. Predicting copper-, iron-, and zinc-binding proteins in pathogenic species of the *Paracoccidioides* genus. *Front. Microbiol.* 2015;5:761.
100. Balhara M, Chaudhary R, Ruhil S, Singh B, Dahiya N, Parmar VS, Jaiwal PK, Chhillar AK. Siderophores; iron scavengers: the novel & promising targets for pathogen specific antifungal therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2016;20:1477-89.
101. Jirakkakul J, Cheevadhanarak S, Punya J, Chutrakul C, Senachak J, Buajarern T, Tanticharoen M, Amnuaykanjanasin A. Tenellin acts as an iron chelator to prevent iron-generated reactive oxygen species toxicity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015;362:1-8.
102. Matthaiou EI, Sass G, Stevens DA, Hsu JL. Iron: na essential nutriente for *Aspergillus fumigatus* and a fulcrum for pathogenesis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2018;31:506-11.
103. Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, Baldin C, Drakos E, Soliman SSM, Shetty AC, McCracken C, Akoumianaki T, Stylianou K, Ioannou P, Pontikoglou

- C, Papadaki HA, Tzardi M, Belle V, Etienne E, Beauvais A, Samonis G, Kantoyiannis DP, Andreakos E, Bruno VM, Ibrahim AS, Chamilos G. Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nat. Commun.* 2018;9:3333.
104. Crawford A, Wilson D. Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res.* 2015;15:fov071.
105. Nazik H, Penner JC, Ferreira JÁ, Haagensen JAJ, Cohen K, Spormann AM, Martinez M, Chen V, Clemons KV, Stevens DA. Effects of iron chelators on the formation and development of *Aspergillus fumigatus* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59:6514-20.
106. Shah NR. Advances in iron chelation therapy: transitioning to a new oral formulation. *Drugs Context.* 2017;6:212502.
107. Schwarz P, Cornely OA, Dannaoui E. Antifungal combinations in Mucorales: A microbiological perspective. *Mycoses.* 2019;62:746:60.
108. Blanco-Reina E, Muñoz-García A, Cárdenas-Aranzana MJ, Ocaña-Riola R, Del Prado-Llargo JR. Assessment of off-label prescribing: profile, evidence and Evolution. *Farm. Hosp.* 2017;41:458-69.
109. Shammo JM, Komrokji RS. Clinical consequences of iron overload in patients with myelodysplastic syndromes: the case for iron chelation therapy. *Expert. Rev. Hematol.* 2018;11:577-86.
110. Manduzio P. Deferasirox in a refractory anemia after other treatment options: case report and literature review. *Clin. Case Rep.* 2015;3:361-7.
111. Díaz-García JD, Gallegos-Villalobos A, Gonzalez-Espinoza L, Sanchez-Niño MD, Villarrubia J, Ortiz A. Deferasirox nephrotoxicity – the knows and unknowns. *Nat. Rev. Nephrol.* 2014;10:574-86.
112. Clinton C, Gazda HT. Diamond-Blackfan Anemia. *GeneReviews* [Internet]. 2019; Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7047/>.
113. Chalmers AW, Shammo JM. Evaluation of a new tablet formulation of deferasirox to reduce chronic iron overload after long-term blood transfusion. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2016;12:201-8.
114. Motta I, Scaramellini N, Cappellini MD. Investigational drugs in phase I and phase II clinical trials for thalassemia. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2017;26:793-802.

115. Liu JL, Fan YG, Yang ZS, Wang ZY, Guo C. Iron and Alzheimer's Disease: from pathogenesis to therapeutic implications. *Front. Neurosci.* 2018;12:632.
116. Allali S, de Montalembert M, Brousse V, Chalumeau M, Karim Z. Management of iron overload in hemoglobinopathies. *Transfus. Clin. Biol.* 2017;24:223-6.
117. Kattamis A, Aydinok Y, Taher A. Optimising management of deferasirox therapy for patients with transfusion-dependent thalassaemia and lower-risk myelodysplastic syndromes. *Eur. J. Haematol.* 2018;101:272-82.
118. Ricchi P, Marsella M. Profile of deferasirox for the treatment of patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drugs Des. Devel. Ther.* 2015;9:6475-82.
119. Mobarra N, Shanaki M, Ehteram H, Nasiri H, Sahmani M, Saeidi M, Goudarzi M, Pourkarim H, Azad M. A review on iron chelators in treatment of iron overload syndromes. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* 2016;10:239-47.
120. Miyajima H, Hosoi Y. Aceruloplasminemia. *GeneReviews* [Internet]. 2018; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1493/>.
121. Lee TA, von Riedemann S, Tricta F. Cost-utility of chelators in transfusion-dependent β -thalassemia major patients: a review of the pharmacoeconomic literature. *Expert. Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* 2014;14:651-60.
122. Diamantidis MD, Neokleous N, Agapidou A, Vetsiou E, Manafas A, Fotiou P, Vlachaki E. Iron chelation therapy of transfusion-dependent β -thalassemia during pregnancy in the era of novel drugs: is deferasirox toxic?. *Int. J. Hematol.* 2016;103:537-44.
123. Nolte F, Angelucci E, Breccia M, Gattermann N, Santini V, Vey N, Hofmann WK. Updated recommendations on the management of gastrointestinal disturbances during iron chelation therapy with Deferasirox in transfusion dependent patients with myelodysplastic syndrome - Emphasis on optimized dosing schedules and new formulations. *Leuk. Res.* 2015;39:1028-33.
124. Kontoghiorghes CN, Andreou N, Constantinou K, Kontoghiorghes GJ. World health dilemmas: Orphan and rare diseases, orphan drugs and orphan patients. *World J. Methodol.* 2014;4:163-88.
125. Hall AM, Bass P, Unwin RJ. Drug-induced renal Fanconi syndrome. *Q. J. Med.* 2014;107:261-9.
126. Fortin PM, Fisher SA, Madgwick KV, Trivella M, Hopewell S, Doree C, Estcourt LJ. Interventions for improving adherence to iron chelation therapy in people with

- sickle cell disease or thalassaemia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018;5:CD012349.pub2.
127. Moukalled NM, Bou-Fakhredin R, Taher AT. Deferasirox: over a decade of experience in Thalassaemia. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2018;10(1):e2018066.
 128. Olivieri NF, Sabouhanian A, Gallie BL. Single-center retrospective study of the effectiveness and toxicity of the oral iron chelating drugs deferiprone and deferasirox. *PLoS One.* 2019;14(2):e0211942.
 129. Lyle L, Hirose A. Iron Overload in Myelodysplastic Syndromes: Pathophysiology, Consequences, Diagnosis, and Treatment. *J. Adv. Pract. Oncol.* 2018;9:392-405.
 130. Botzenhardt S, Li N, Chan EW, Sing CW, Wong IC, Neubert A. Safety profiles of iron chelators in young patients with haemoglobinopathies. *Eur. J. Haematol.* 2017;98:198-217.
 131. Zeidan AM, Griffiths EA. To chelate or not to chelate in MDS: That is the question! *Blood Rev.* 2018;32:368-77.
 132. Chen SC, Playford EG, Sorrell TC. Antifungal therapy in invasive fungal infections. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010;10:522-30.
 133. Ibrahim AS, Gebremariam T, Luo G, Fu Y, French SW, Edwards JE Jr., Spellberg B. Combination Therapy of Murine Mucormycosis or Aspergillosis with Iron Chelation, Polyenes, and Echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55:1768-70.
 134. Busca A, Limerutti G, Locatelli F, Barbui A, De Rosa FG, Falda M. The reversed halo sign as the initial radiographic sign of pulmonary zygomycosis. *Infection.* 2012;40:77-80.
 135. Álvarez F, Fernández-Ruiz M, Aguado JM. Hierro e infección fúngica invasiva. *Rev. Iberoam. Micol.* 2013;30:217-225.
 136. Ibrahim AS, Gebermarian T, Fu Y, Lin L, Hussein MI, French SW, Schwartz J, Skory CD, Edwards JE Jr., Spellberg BJ. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J. Clin. Invest.* 2007;117:2649-57.
 137. Chamilos G, Lewis RE, Hu J, Xiao L, Zal T, Gilliet M, Halder G, Kontoyiannis DP. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105:9367-72.

138. Ibrahim AS, Gebremariam T, French SW, Edwards JE Jr., Spellberg B. The iron chelator deferasirox enhances liposomal amphotericin B efficacy in treating murine invasive pulmonary aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65:289-92.
139. Lai YW, Campbell LT, Wilkins MR, Pang CN, Chen S, Carter DA. Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2016;48:388-94.
140. Kontoyiannis DP. Deferasirox lacks *in vitro* activity against *Fusarium* and *Scedosporium* species and black molds. *Virulence.* 2011;2:257-8.
141. Lewis RE, Pongas GN, Albert N, Ben-Ami R, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Activity of deferasirox in Mucorales: influences of species and exogenous iron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55:411-3.
142. Mario DN, Schaffer LF, Peroza LR, de Jesus FPK, Denardi LB, Fachinetto R, Alves SH. *Sporothrix brasiliensis* produces the highest levels of oxidative stress in a murine model among the species of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2017;50:554-7.
143. Ortega I, Felipe MSS, Vasconcelos ATR, Bezerra LML, Dantas AS. Peroxide sensing and signaling in the *Sporothrix schenckii* complex: an in silico analysis to uncover putative mechanisms regulating the Hog1 and AP-1 like signaling pathways. *Med. Mycol.* 2015;58:51-9.
144. Castro VSP, da Silva AS, Thomé GR, Wolkmer P, Castro JLC, Costa MM, Graça DL, Oliveira DC, Alves SH, Schetinger MRC, Lopes STA, Stefani LM, Azevedo MI, Baldissera MD, Andrade CM. Oxidative stress in rats experimentally infected by *Sporothrix schenckii*. *Microb. Pathog.* 2017;107:1-5.
145. Baca ER, Sánchez HL, Barraza BC, Naranjo UE, Romero EL, Rodríguez AL, Cruz MC. Identification of proteins in *Sporothrix schenckii sensu stricto* in response to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Rev. Iberoam. Micol.* 2019;36:17-23.

Artigo 1: formatado para submissão à Revista Mycoses (FI = 3,065).

Influence of iron on growth and on susceptibility to itraconazole in *Sporothrix* spp.

***Sporothrix* spp.: influence of iron**

Alessandra Helena da Silva Hellwig¹, Iasmin da Silva Rios², Amanda Carvalho Ribeiro², Helenita Klein de Abreu¹, Régis Adriel Zanette³, Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}.

¹Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 - CEP: 90035-003, Porto Alegre - RS, Brasil.

²Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500 - CEP 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil.

³Postgraduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500 - CEP 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil.

Corresponding author: Maria Lúcia Scroferneker, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, sala 325, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33083934 Fax. (+55) 51-33083121 (e-mail: scrofern@ufrgs.br).

Acknowledgments: The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

Statement of Author Contributions:

Scroferneker ML and Zanette RA: Conception and planning of the study; Elaboration and writing of the manuscript; Effective participation in research orientation;

Hellwig AHS: Elaboration and writing of the manuscript; Obtaining, analyzing and interpreting the data;

Rios IS, Ribeiro AC and Abreu HK: Obtaining, analyzing and interpreting the data;

Conflict of Interest Statement: The authors declare have no conflict of interests.

ABSTRACT

Background: Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by fungi of the genus *Sporothrix* spp. Itraconazole is the drug of choice for human and animal sporotrichosis, but there are reports of resistance or recurrence. Some pathogens use iron for their development and the iron chelator deferasirox has demonstrated activity against pathogenic fungi. **Aims:** Evaluate the *in vitro* growth and susceptibility to oxidative stress of *Sporothrix* spp. exposed to different iron levels and the susceptibility of *Sporothrix* spp. to itraconazole alone and in combination with deferasirox. **Materials and methods:** Ten isolates of each *S. schenckii* and *S. brasiliensis* species were used. The affinity of the strains for iron was evaluated by measuring the radial growth in potato dextrose agar plates containing different iron levels. Strains were further subjected to 40 mM H₂O₂ to evaluate oxidative stress response. Growth of the strains to iron-restricted or iron-overload medium was also assessed in RPMI 1640 broth using the XTT colorimetric assay. The susceptibility of fungal isolates to itraconazole and deferasirox was evaluated using *in vitro* microdilution technique. **Results:** Iron availability affected *S. schenckii* and *S. brasiliensis* growth and viability to oxidative stress. The combination of deferasirox with itraconazole *in vitro* resulted in indifference for most isolates. **Conclusions:** Iron is required for the development of *Sporothrix* spp., being *S. brasiliensis* more sensitive to different iron concentrations than *S. schenckii*. This study adds important information on iron metabolism in *Sporothrix* spp. and may pave the way for further studies.

Keywords: Sporotrichosis; subcutaneous mycosis; deferasirox; itraconazole; iron.

INTRODUCTION

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by *Sporothrix schenckii* species complex, which affects humans and animals. *S. schenckii* is the main causative agent, although in Brazil *S. brasiliensis* has spurred as the most prevalent species^{1,2}. Sporotrichosis occurs most often in regions of tropical, subtropical, and temperate climates³. The endemic areas include Latin America, South Africa, and Japan^{2,4}, and, in Southern Brazil, it is considered the most common subcutaneous mycosis².

The drug of choice for the treatment of cutaneous and lymphocutaneous forms in humans is the azole fungistatic itraconazole, an ergosterol biosynthesis inhibitor⁵. However, there are reports of isolates resistant to this treatment, which leads to therapeutic failures and disease remission⁶.

Given that some pathogens need iron for their development, as this is an essential nutrient, its deficiency may negatively impact the biological functions of the microorganism^{7,8}. The iron chelator deferasirox have been successfully tested against pathogenic fungi, such as Mucorales^{7,8}. In addition to the iron chelation, deferasirox has immunomodulatory properties that are still poorly understood^{7,9}. Following this line of reasoning and the growing need for new treatments for sporotrichosis, the aims of this study were to evaluate the growth of *Sporothrix* spp. in medium containing different iron levels and the in vitro susceptibility of the strains against deferasirox alone and in combination with itraconazole.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Ten clinical isolates of each *S. schenckii* and 10 *S. brasiliensis* species obtained from the fungal culture collection of Laboratory of Pathogenic Fungi, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, were evaluated. All samples were previously identified by molecular biology². The strains were cultivated in potato dextrose agar (PDA) (Acumedia, USA) at 30 °C. After 7 days, conidial suspensions were prepared by scraping across the surface of the fungal colonies with sterile plastic loops and sterile phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, or sterile saline solution 0.85% (growth assay). The suspensions were filtered through filter paper to separate hyphae and conidia. Inoculum suspensions were adjusted by using a Neubauer chamber.

Evaluation of the growth of Sporothrix spp. in medium containing different iron levels

Inoculum suspensions were standardized at the concentration of 10^6 conidia/ml and inoculated 10 μ L at the center of Petri plates containing PDA, PDA plus iron (FeCl_3) at the concentrations of 0.0625% and 0.125%; and PDA containing 1 mM ascorbic acid (AA; Merck Pro Analysis, Germany) and 1 mM ferrozine (FZ; Sigma, USA) to eliminate traces of iron present in the medium⁷. The plates were incubated in triplicates at 30 °C for 21 days to measure the diameter of the colonies.

Oxidative stress testing

The strains were cultivated in the four different media previously described. After seven days, aliquots containing an inoculum suspension of 2×10^5 conidia/mL were exposed or not (viability control) to 40 mM H_2O_2 and incubated for 1 h at 37 °C^{10,11}. Samples were then centrifugated at 14000 rpm for seven min. Supernatant was discarded and the pellet was diluted 1:10. For colony count, 100 μ L were spread onto Sabouraud dextrose agar plates in triplicate and incubated for seven days at 30 °C.

Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of deferasirox and itraconazole

The MIC of the drugs deferasirox (Toronto Research Chemicals, Canada) and itraconazole (Cayman Chemical, USA), alone or in combination, were determined using the checkerboard method. Dilutions were prepared in RPMI 1640 and ranged from 16 to 0.125 μ g/mL for itraconazole and 128 to 1 μ g/mL for deferasirox. Initial inoculum concentration was standardized at a range 0.4 - 5×10^4 conidia/mL, according to the M38-A2 protocol of the Clinical Laboratory Standards Institute¹². Plates were incubated for 10 days at 30 °C and growth evaluated visually. The MIC was defined as the minimum drug concentration that caused 100% inhibition of fungal growth. All experiments were performed in triplicate.

The interpretation of the results was evaluated quantitatively through the calculation of the fractional inhibitory concentration index (FICI), using the following

formula: $FICI = (MIC_A^{ITZ+DEF}/MIC_A^{ITZ}) + (MIC_B^{ITZ+DEF}/MIC_B^{DEF})$. A FICI of ≤ 0.5 was defined as synergistic; a FICI of >0.5 but ≤ 4.0 was defined as indifferent; and a FICI of >4.0 was defined as antagonistic¹³.

Determination of the growth rate of Sporothrix spp. in the XTT reduction assay

We determined the time course of deferasirox-induced hyphal damage with the use of the 2, 3- bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT; Santa Cruz Biotechnology, USA) colorimetric formazan reduction assay. Triplicate Eppendorf tubes containing 10^5 conidia/mL of *S. schenckii* ATCC 201679 or *S. brasiliensis* ATCC 201681 were diluted in 1 mL RPMI 1640 containing 0.0625% FeCl₃, or 0.125% FeCl₃, deferasirox at the MIC concentration (32 μ g/ml for *S. schenckii* ATCC 201679 and 64 μ g/ml for *S. brasiliensis* ATCC 201681), or both deferasirox and 0.0625% FeCl₃. A tube containing RPMI only was used as control. Tubes were incubated at 35 °C with shaking⁹, and at 0-, 24-, 48-, 72- and 96-h time points tubes were removed from incubation and centrifugated at 14000 rpm for 5 min. The medium was aspirated, and 1 ml of PBS containing 1 mg of XTT plus 0.17 mg of menadione (Sigma, USA) were added to each tube¹⁴. The optical density curves were measured at 492 nm with use of a plate reader (Anthos Zenyth 200; Biochrom). Wells without conidia served as blank controls.

Statistical analysis

The variables were compared among groups by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test (evaluation of growth in different concentrations of iron) or Bonferroni's test (oxidative stress), $\alpha = 0.05$.

RESULTS

Iron availability affects Sporothrix spp. growth

Both iron-restricted (PDA + AA + FZ) and iron-overload culture media significantly impaired *Sporothrix* spp. growth ($p < 0.001$) (Fig. 1). Indeed, the effect was

more pronounced for *S. brasiliensis* isolates, where no growth was observed in medium containing 0.125% FeCl₃.

The XTT assay showed that, at the MIC concentration, the iron chelator deferasirox fully inhibited *S. schenckii* (Fig. 2A) and *S. brasiliensis* (Fig. 2B) growth. This inhibition was reversed by the concomitant addition of 0.0625% FeCl₃. The highest growth rate of *S. schenckii* was observed for the group supplemented with 0.125% iron. Interestingly, for *S. brasiliensis*, the highest growth rate was observed for the group supplemented with 0.0625% iron plus deferasirox at the MIC concentration.

Addition of iron to culture medium make S. schenckii and S. brasiliensis more prone to oxidative stress

S. schenckii and *S. brasiliensis* had a similar response against oxidative stress when grown at different iron concentrations. Intraspecies comparison among the different iron level groups showed that both *S. schenckii* (Fig. 3A) and *S. brasiliensis* (Fig. 3B), when cultivated in the presence of 0.0625% and 0.125% iron added do PDA plates and further exposed to oxidative stress, showed a significantly lower ($P < 0.001$) colony forming unit (CFU) count when compared to their respective controls.

Interspecies comparison showed that, in normal conditions, i.e., when not submitted to oxidative stress (control groups), higher CFU counts ($P < 0.05$) were obtained for *S. schenckii* when compared to *S. brasiliensis* in the iron-restricted medium (PDA + AA + FZ) and in the iron-overload medium (0.125% FeCl₃) (Fig. 3C). Nonetheless, no significant difference in CFU counts was observed when *S. schenckii* and *S. brasiliensis* isolates were exposed to oxidative stress (Fig. 3D).

Deferasirox and itraconazole have no interaction in vitro for most isolates of Sporothrix spp.

Six strains were excluded in the susceptibility analysis due to their difficult to grow in RPMI 1640. MIC values of itraconazole against *S. schenckii* and *S. brasiliensis* ranged from 0.25 to 2 µg/mL (geometric mean [GM] of 0.9) and 0.5 to 1 µg/mL (GM of 0.7), respectively, whereas deferasirox MIC values ranged from 4 to 32 µg/mL (GM of 13.1) and from 16 to 64 µg/mL (GM of 43.1), respectively. The combination of the drugs resulted in indifference for most of the isolates, with synergism observed for only three

isolates, all belonging to *S. schenckii* (Table 1). Conversely, antagonistic interaction was not observed.

DISCUSSION

Iron is an essential element required by all microbial pathogens for growth and virulence¹⁵. Iron chelators have been studied as therapeutic adjuvants in infections caused by Mucorales and *Aspergillus* spp.^{8,15,16}. This is the first study to evaluate the growth of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* isolates in iron-restricted and iron-overload culture media, the effect of iron levels in the response of *Sporothrix* conidia to oxidative stress, and the in vitro activity of the iron chelator deferasirox, alone and in combination with itraconazole, against *S. schenckii* and *S. brasiliensis* isolates.

Studies have shown that iron is essential for fungal growth and is considered a limiting factor for its development¹⁷. This was observed in our study, where there was a greater radial growth of *S. schenckii* colony when supplemented with 0.0625% of iron when compared to the colony developed in the iron-restricted medium (PDA + AA + FZ). Nonetheless, the highest development of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* isolates occurred in plates containing only PDA. One hypothesis to this phenomenon may be due to the existence of iron in the PDA medium itself, conferring the ideal iron concentration for the development of the strain. High amounts of iron are known to become toxic to the biological system¹⁸. By supplementing the PDA medium with iron, the concentration of this element may have reached a level no longer well-tolerated by the strains, impairing their development. This was especially observed in *S. brasiliensis*, where colony development in PDA supplemented with 0.0625% iron did not differ to iron-restricted medium (PDA + AA + FZ). Moreover, PDA supplemented with 0.125% iron fully abrogated *S. brasiliensis* growth, where a small growth was still observed in *S. schenckii*.

Furthermore, in the XTT colorimetric assay, it was also possible to evaluate the growth of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* strains at different iron concentrations, confirming the essentiality of this element for fungal development. Importantly, the RPMI 1640 broth also contains traces of iron¹⁹, but apparently, less than PDA, which is likely to explain the difference in the results when compared with the previous experiment. In the XTT colorimetric assay, *S. schenckii* was more viable when

supplemented with 0.125% FeCl₃. Interestingly, *S. brasiliensis* proved to be more viable when supplemented with 0.0625% FeCl₃ and 64 µg/ml deferasirox, probably reaching the optimum concentration of iron by combining FeCl₃, deferasirox, and traces of iron in the medium. As *S. brasiliensis* was more sensitive to variation in iron concentrations, the optimum concentration of this metal for its development seems to be very restricted.

Besides its importance for growth, iron also plays a crucial role in the virulence of microorganisms, such as resistance to reactive oxygen species (ROS) produced by phagocytic cells during infection¹⁶. Matsuo et al²⁰ analyzed the growth of *Saccharomyces cerevisiae* yeast when cultivated at different iron concentrations and submitted to oxidative stress. The authors found increased growth of the yeast under oxidative stress when the medium was supplemented with iron and decreased growth when medium was not supplemented with iron, suggesting that iron would increase resistance to ROS in an oxidative stress process. When cultivating *S. schenckii* and *S. brasiliensis* in different iron concentrations and submitting them to oxidative stress with hydrogen peroxide, we observed a divergent result to Matsuo et al²⁰: both species showed increased susceptibility to oxidative stress when grown in medium supplemented with iron. This finding is in line with common sense, where iron would be involved in the generation of ROS through the Fenton Reaction by generating hydroxyl radicals, which would result in oxidative damage to cells²¹. Mario et al²² analyzed the behavior of *Sporothrix* spp. when under oxidative stress *in vivo* and observed higher resistance of *S. brasiliensis* when compared to *S. schenckii*, but our study did not obtain statistically significant difference between the two species when subjected to oxidative stress *in vitro*. These differences in results may be due to differences between *in vivo* and *in vitro* experiments, since the humoral response of the animal infected by different species of *Sporothrix* spp. may have a different response and therefore have a differentiated profile of secreted proteins that would be involved in the fungal resistance to ROS²³.

As iron showed to be essential for the development of *Sporothrix* spp., we evaluated the *in vitro* activity of the iron chelator deferasirox alone and in combination with itraconazole against *S. schenckii* and *S. brasiliensis*. Deferasirox MIC for *S. schenckii* and *S. brasiliensis* exceeded serum levels of deferasirox reported in pharmacokinetic studies reported in healthy volunteers²⁴. The attenuation of deferasirox activity by FeCl₃ observed in the XTT colorimetric assay highlights that the fungistatic action of the iron chelator is mediated by iron deprivation. When deferasirox was

combined with itraconazole, only three isolates had FICI \leq 0.5, which defines a synergistic combination, all belonging to *S. schenckii*. For *S. brasiliensis*, this combination was indifferent. No antagonism was found. The activity and the mechanism of action of deferasirox have been studied against other pathogenic organisms⁷⁻⁹, but information on the combination of deferasirox and itraconazole is scarce. Lai et al²⁵ studied the combination of a set of iron chelators combined with antifungals for *Cryptococcus* spp., among them deferasirox and itraconazole, obtaining predominantly indifferent or antagonistic results to this combination. The mechanisms behind these interactions are still unknown.

CONCLUSION

In this study, we showed the biological importance that iron has for *S. schenckii* and *S. brasiliensis* by promoting their development, and that *S. brasiliensis* is more sensitive to changes in iron concentrations in comparison to *S. schenckii*. Nonetheless, excess of iron impaired growth and increased susceptibility of the isolates to oxidative stress. In addition, the iron chelator deferasirox was fungistatic for *S. schenckii* and *S. brasiliensis* isolates, but indifference or synergism was found when used in combination with itraconazole in vitro. Further studies are needed to analyze the role of iron and deferasirox as a therapeutic adjunct to *Sporothrix* spp.

REFERENCES

1. Crothers SL, White SD, Ihrke PJ, Affolter VK. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). *Vet. Dermatol.* 2009;20:249-59.
2. Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrillon MR, Mendes SDC, Heidrich D, Valente P, Scroferneker ML. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Med. Mycol.* 2014;52:56-64.
3. Vásquez-Del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* 2012;30:437-43.

4. Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med. Mycol.* 2011;49: 225-236.
5. Borba-Santos LP, Gagini T, Ishida K, Souza W, Rozental S. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with *in vitro* low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. *J. Med. Microbiol.* 2015;64:415–422.
6. Meinerz ARM, Nascente PS, Schuch LFD, Cleff MB, Santin P, Brum CS, Nobre MO, Meireles MCA, Mello JRB. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007;40:60-2.
7. Ibrahim AS, Gebermariam T, Fu Y, Lin L, Husseiny MI, French SW. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J. Clin. Invest.* 2007;117:2649–57.
8. Lewis RE, Pongas GN, Albert N, Bem-Ami R, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Activity of deferasirox in Mucorales: Influences of species and exogenous iron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55:411–3.
9. Zanette RA, Bitencourt PER, Kontoyiannis DP, Kighera RA, Flores MM, Kommers GD, Silva PS, Ludwig A, Moretto MB, Alves SH, Santurio JM. Complex interaction of deferasirox and *Pythium insidiosum*: Iron-dependent attenuation of growth *in vitro* and immunotherapy-like enhancement of immune responses *in vivo*. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0118932.
10. Heidrich D, Corbellini VA, Mendes SDC, Fernandes EK, Lazzarotto L, Ribeiro AC, Zanette RA, Scroferneker ML. Melanin: Quantification and protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents. *Med. Mycol.* 2019;57:260-63.
11. Sutton S. Accuracy in plate counts. *J. Validation Technol.* 2011;17:42-6.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard—second edition. Wayne, PA: CLSI; 2008 Document M38-A2.
13. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2002;44:363-6.
14. Ben-Ami R, Lewis RE, Tarrand J, Leventakos K, Kontoyiannis DP. Antifungal Activity of Colistin against *Mucorales* Species *In Vitro* and in a Murine Model

- of *Rhizopus oryzae* Pulmonary Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54:484-90.
15. Ibrahim AS, Gebremariam T, French SW, Edwards JE Jr., Spellberg B. The iron chelator deferasirox enhances liposomal amphotericin B efficacy in treating murine invasive pulmonary aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65:289-92.
 16. Nazik H, Penner JC, Ferreira JÁ, Haagensen JAJ, Cohen K, Spormann AM, Martinez M, Chen V, Clemons KV, Stevens DA. Effects of iron chelators on the formation and development of *Aspergillus fumigatus* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59:6514-20.
 17. Comensoli L, Bindschedler S, Junier P, Joseph E. Iron and fungal physiology: a review of biotechnological opportunities. *Adv. Appl. Microbiol.* 2017;98:31-60.
 18. Zhang X, Peng Y, Li X, Ma G, Chen X. Screening of iron-enriched fungus from natural environment and evaluation of organically bound iron bioavailability in rats. *Food Sci. Technol.* 2015;35:58-65.
 19. Kontoyiannis DP. Deferasirox lacks *in vitro* activity against *Fusarium* and *Scedosporium* species and black molds. *Virulence.* 2011;2:257-8.
 20. Matsuo R, Mizobuchi S, Nakashima M, Miki K, Ayusawa D, Fukii M. Central roles of iron in the regulation of oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 2017;63:895-907.
 21. Chakravarti A, Camp K, McNabb DS, Pinto I. The iron-dependent regulation of the *Candida albicans* oxidative stress response by the CCAAT-binding factor. *PLoS ONE*;2017;12(1):e0170649.
 22. Mario DN, Schaffer LF, Peroza LR, de Jesus FPK, Denardi LB, Fachinetto R, Alves SH. *Sporothrix brasiliensis* produces the highest levels of oxidative stress in a murine model among the species of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2017;50:554-7.
 23. Baca ER, Sánchez HL, Barraza BC, Naranjo UE, Romero EL, Rodríguez AL, Cruz MC. Identification of proteins in *Sporothrix schenckii sensu stricto* in response to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Rev. Iberoam. Micol.* 2019;36:17-23.
 24. Piga A, Galanello R, Forni GL, Cappellini MD, Origa R, Zappu A, Donato G, Bordone E, Lavagetto A, Zanaboni L, Sechaud R, Hewson N, Ford JM, Optiz H, Alberti D. Randomized phase II trial of deferasirox (Exjade®, ICL670), a once-

daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in thalassemia patients with transfusional iron overload. *Haematologica*. 2006;91:873-80.

25. Lai YW, Campbell LT, Wilkins MR, Pang CN, Chen S, Carter DA. Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2016;48:388-94.

TABLE

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of deferasirox (DEF) and itraconazole (ITZ), alone and in combination, and their fractional inhibitory concentration index (FICI), against *Sporothrix* spp.

Strains (n = 14)	MIC				FICI (Interpret.)
	Alone		Combination		
	DEF	ITZ	DEF	ITZ	
<i>S. schenckii</i> ATCC 201679	32	1	16	1	1.5 (I)
<i>S. schenckii</i> 11 UFSM	16	2	16	1	1.5 (I)
<i>S. schenckii</i> 329	4	2	4	0.25	1.1 (I)
<i>S. schenckii</i> 424	32	1	4	0.25	0.4 (S)
<i>S. schenckii</i> 02 UFSM	8	0.25	<1	<0.125	0.3 (S)
<i>S. schenckii</i> 07 UFSM	8	1	4	1	1.5 (I)
<i>S. schenckii</i> 09 UFSM	16	0.5	<1	<0.125	0.2 (S)
<i>S. brasiliensis</i> ATCC 201681	64	0.5	64	1	3 (I)
<i>S. brasiliensis</i> 8309	64	0.5	32	1	2.5 (I)
<i>S. brasiliensis</i> 13	64	0.5	64	1	3 (I)
<i>S. brasiliensis</i> CV	32	1	16	1	1.5 (I)
<i>S. brasiliensis</i> JAT6MG	32	1	32	1	2 (I)
<i>S. brasiliensis</i> 15572	64	0.5	32	1	2.5 (I)
<i>S. brasiliensis</i> 16042 UFMG	16	1	16	1	2 (I)

S, synergism; I, Indifference; Interpret., interpretation.

FIGURES

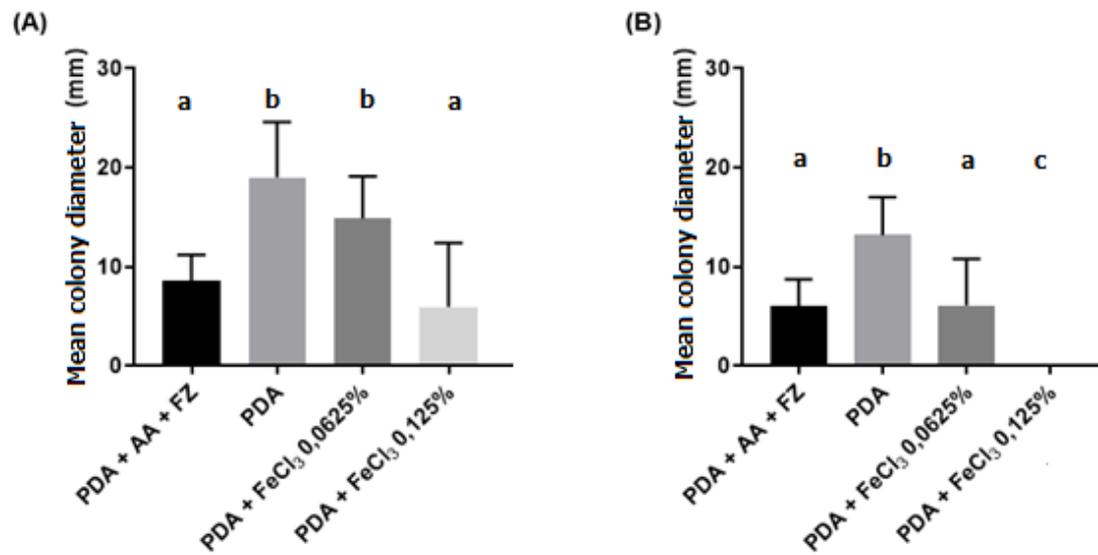


Figure 1. Bar plots showing the difference in growth of the species *Sporothrix schenckii* (A) and *S. brasiliensis* (B) between groups. Statistical analysis of these values was performed by ANOVA ($p < 0.0001$), with Tukey post-test with a significance level of 5%. Different concentrations of iron that follow the same letter do not differ significantly from each other. PDA, potato dextrose agar; AA, ascorbic acid; FZ, ferrozine.

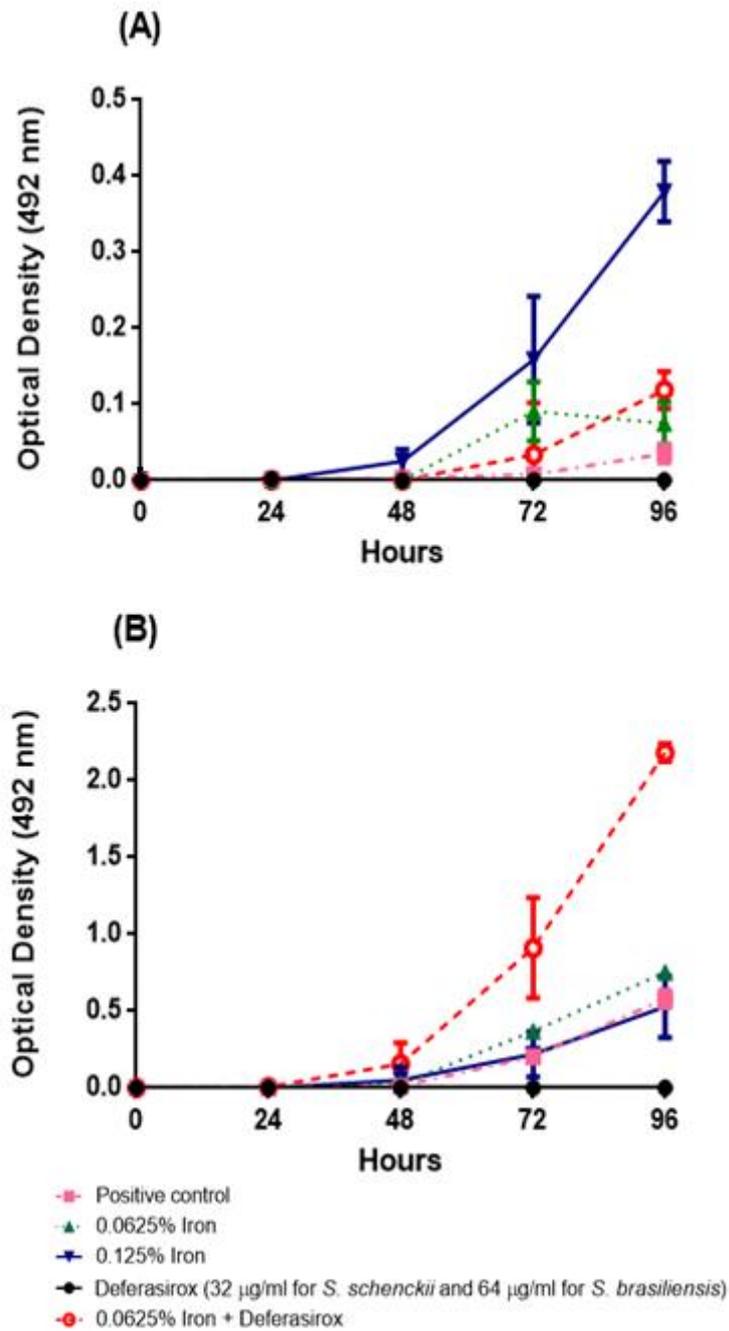


Figure 2. XTT reduction assay. *S. schenckii* (A) and *S. brasiliensis* (B) were grown in RPMI 1640 in the presence of deferasirox (32 $\mu\text{g/ml}$ for *S. schenckii* and 64 $\mu\text{g/ml}$ for *S. brasiliensis*), 0.0625% and 0.125% of iron (FeCl_3) or 0.0625% of iron plus deferasirox. Values represent the means \pm SD of triplicates.

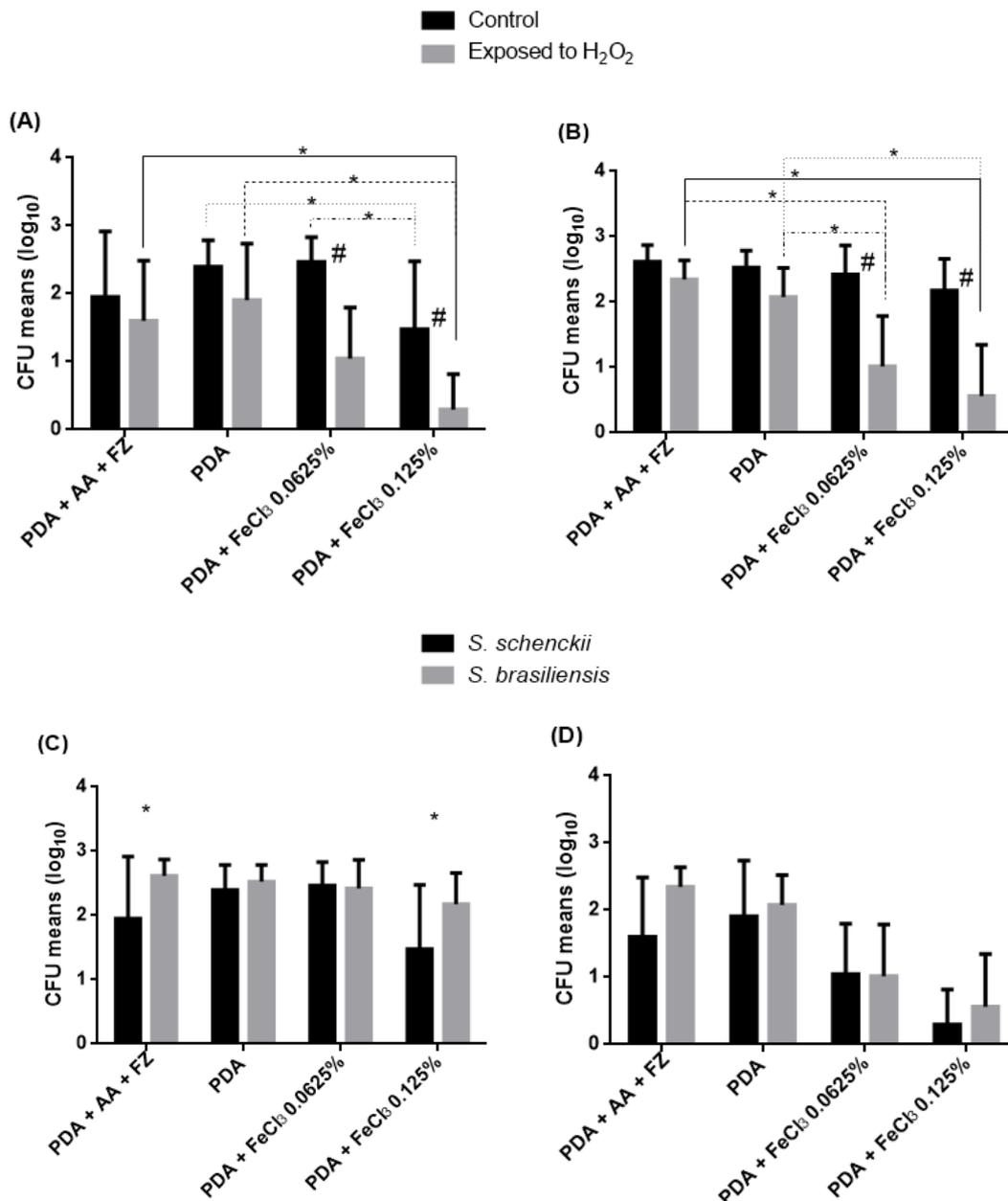


Figure 3. Effect of iron levels on colony forming unit (CFU) of *Sporothrix* species when exposed or not to H₂O₂. Bar plots A and B highlight differences on CFU counts among the groups within *S. schenckii* and *S. brasiliensis* isolates, respectively (* $P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey test). # $P < 0.001$, in comparison to respective control (ANOVA followed by Bonferroni test). Bar plots C and D highlight differences on CFU counts between *S. schenckii* and *S. brasiliensis* when not exposed (C) or exposed to H₂O₂ (D) (* $P < 0.05$, ANOVA followed by Bonferroni test). PDA, potato dextrose agar; AA, ascorbic acid; FZ, ferrozine.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi analisada a importância que o elemento ferro possui para as espécies de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, tanto para o seu desenvolvimento quanto para a influência desse elemento no estresse oxidativo. Além disso, analisou-se a interação que o quelante de ferro deferasirox possui sozinho e em combinação com itraconazol para isolados de *Sporothrix* spp.

Foi possível observar que o crescimento e a viabilidade de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* é maior quando há disponibilidade de ferro quando comparado com ambientes sem presença deste elemento. Entretanto, através das diferentes composições dos meios de cultura com diferentes quantidades de ferro, é difícil obter dados regulares entre os experimentos, o que reforça a necessidade de padronização entre os testes quanto à análise de ferro e deferasirox. Quando realizado o crescimento das cepas de *Sporothrix* spp. em placas de ágar batata dextrose contendo diferentes concentrações de ferro, *S. schenckii* se desenvolveu melhor no meio contendo 0,0625% de ferro quando comparado com o meio sem ferro. Já *S. brasiliensis* não atingiu um crescimento significativo quando suplementado com 0,0625% de ferro e nenhum desenvolvimento com 0,125% de ferro quando comparado ao meio sem ferro, o que mostra uma maior sensibilidade dessa espécie nas diferentes concentrações de ferro. Quando analisadas em ensaio colorimétrico com XTT, células de *S. schenckii* estavam mais viáveis quando RPMI 1640 foi suplementado com 0,125% de ferro, assim como células de *S. brasiliensis* quando suplementado com 0,0625% de ferro com 64 µg/mL de deferasirox. Tais diferenças de resultados entre os testes é possivelmente devido às diferentes composições existentes de ferro que são inerentes aos meios de cultura de ágar batata dextrose e RPMI 1640. No entanto, os testes mostram a importância do ferro no desenvolvimento do fungo e, no ensaio colorimétrico de XTT, como a atividade de deferasirox é atenuada pelo ferro.

Ao analisar como as cepas de *Sporothrix* spp. se comportam ao estresse oxidativo quando cultivadas em diferentes concentrações de ferro, foi possível observar que a suplementação com o ferro não confere resistência a *S. schenckii* e *S. brasiliensis* quando essas são submetidas ao estresse oxidativo. Isso corrobora com a reação de Fenton, o qual explica que o ferro estaria envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio quando submetido ao estresse oxidativo ao desenvolver radicais hidroxil, o que resultaria em um dano oxidativo às células.

Além disso, foi possível observar a atividade fungistática de deferasirox às cepas *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, com concentrações inibitórias mínimas que variaram entre 4-32 µg/mL e 16-64 µg/mL, respectivamente. Porém, quando combinado com o antifúngico itraconazol, 78,6% (11/14) dos isolados apresentaram-se indiferentes, porém o mecanismo dessa interação ainda é desconhecido. Nenhum antagonismo foi encontrado. Este foi o primeiro trabalho que analisou como *Sporothrix* spp. se comporta frente a diferentes concentrações de ferro e como o quelante de ferro deferasirox age nesses isolados quando sozinho e em combinação com itraconazol. Porém, mais estudos são necessários para analisar o papel do ferro e deferasirox em *Sporothrix* spp. visto que padronizações nos testes são necessárias, uma vez que utilização de diferentes meios de cultivo, com diferentes composições, podem influenciar na análise e no resultado ao conter concentrações desconhecidas de ferro.

PERSPECTIVAS

Em relação ao presente estudo, observou-se que alguns materiais e dados podem ser (re)utilizados em outros projetos. Elencamos as seguintes perspectivas:

- Desenvolver o mesmo tipo de análise para outras doenças fúngicas negligenciáveis, como agentes da cromoblastomicose;
- Avaliar o efeito sinérgico de outros antifúngicos disponíveis e de outros fármacos pela técnica de *checkerboard* em isolados de *Sporothrix* spp.;
- Avaliar a influência dos fatores de virulência, como a melanina, como inibidores da ação de DEF;
- Analisar atividade fungicida de DEF frente aos isolados de *Sporothrix* spp.
- Avaliar e quantificar a produção de catalase em isolados de *Sporothrix* spp. quando submetidos ao estresse oxidativo;
- Estudar se o desenvolvimento de isolados de *Sporothrix* spp. quando na presença ou ausência de ferro aumenta sua virulência através do cultivo da infecção em mosca-das-frutas;
- Análise da produção de sideróforos entre as espécies de *Sporothrix* spp.

Novas vertentes de estudo e pesquisa foram inseridas no laboratório, como testes *checkerboard*. Parcerias importantes com outros grupos de pesquisa também foram consolidadas com esse trabalho, já com projetos e continuidade de estudos em construção.

ANEXOS

Comprovante de submissão à Revista Mycoses

Influence of iron on growth and on susceptibility to itraconazole in *Sporothrix* spp.

(artigo 1)

From: MYCedoffice@wiley.com

To: scrofern@ufrgs.br

CC: alessandra_hell12@hotmail.com, yasmim.rios22@gmail.com, amandacarvalho@icloud.com, helenita.abreu@gmail.com, regis.zanette@ufrgs.br, scrofern@ufrgs.br

Subject: Mycoses - Manuscript ID MYC-OA-2019-370

Body: 27-Dec-2019

Dear Professor Scroferneker:

Your manuscript entitled "Influence of iron on growth and on susceptibility to itraconazole in *Sporothrix* spp." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Mycoses.

Your manuscript ID is MYC-OA-2019-370.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your institution, street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/myc> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/myc>.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript. Otherwise, no further action is required on your part.

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Thank you for submitting your manuscript to Mycoses.

Sincerely,
Vanessa Moir and Aishwarya Thyagarajan
Editorial Assistant
Mycoses - Editorial Office
MYCedoffice@wiley.com

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>. In case you don't want to be contacted by this publication again, please send an email to MYCedoffice@wiley.com.

Date Sent: 27-Dec-2019