

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

INGRID LUDMILLA RODRIGUES DA CRUZ

**ESTUDO DE ISOLADOS SEQUENCIAIS DE *Sporothrix* spp. OBTIDOS DE
PACIENTES COM ESPOROTRICOSE DISSEMINADA DE EVOLUÇÃO CRÔNICA
E SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA**

Rio de Janeiro

2020

INGRID LUDMILLA RODRIGUES DA CRUZ

**ESTUDO DE ISOLADOS SEQUENCIAIS DE *Sporothrix* spp. OBTIDOS DE
PACIENTES COM ESPOROTRICOSE DISSEMINADA DE EVOLUÇÃO CRÔNICA
E SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para a obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientador: Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Coorientador: Dr. Dayvison Francis Saraiva Freitas

Rio de Janeiro

2020

INGRID LUDMILLA RODRIGUES DA CRUZ

**ESTUDO DE ISOLADOS SEQUENCIAIS DE *Sporothrix* spp. OBTIDOS DE
PACIENTES COM ESPOROTRICOSE DISSEMINADA DE EVOLUÇÃO CRÔNICA
E SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
do Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas, para a obtenção do grau de
Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Rosely Maria Zancopé Oliveira (Presidente)
Doutora em Microbiologia
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a Susana Frases Carvajal
Doutora em Microbiologia
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dr.^a Andrea d'Ávila Freitas
Doutora em Microbiologia Médica e Humana
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Fábio Brito dos Santos (Revisor e suplente)
Doutor em Ciências
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz

A Deus e a minha família, sem vocês eu nada seria, para vocês, todo amor que eu tiver nessa vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus. “Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente”.

À minha mãe, amor da minha vida, minha maior incentivadora, melhor amiga, meu ponto de equilíbrio, meu porto seguro e minha maior saudade. Não comemoramos minha entrada no mestrado, pois a Sr^a foi embora 4 meses antes, mas sigo por aqui tentando realizar o tanto de sonhos que sonhamos juntas. Nunca me acostumarei com a saudade. Bença, mãe, nos vemos em casa. Te amo para sempre!

Aos homens da minha vida, meu pai que tanto sonhou em ter uma filha advogada e a viu desistir no sétimo período para buscar seu próprio caminho, obrigada por acreditar em mim e por me ensinar a ser mais forte, ao meu irmão que mesmo com o seu jeito ranzinza sempre vibrou com as minhas vitórias. Deus não poderia ter me dado família melhor. Amo vocês.

Ao meu noivo/colega de trabalho/psicólogo, Fernando Almeida, obrigada por caminhar comigo, por cuidar de mim, por vibrar com minhas vitórias e me abraçar nas minhas derrotas. Obrigada por ser o meu lugar de paz quando o mundo está uma bagunça. Você é a forma física do amor de Deus por mim. Te amo.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Paes, obrigada por caminhar comigo desde a graduação, por confiar um projeto a mim, por toda a paciência, ensinamentos e puxões de orelha, você é peça importante e fundamental no meu crescimento pessoal e profissional. Sua paixão pela pesquisa me inspira.

Ao Dr. Dayvison Freitas, meu coorientador, por abraçar o projeto com tanto carinho e se disponibilizar a me ajudar, me escutar e me ensinar. Obrigada pela paciência, obrigada por tudo!

À Dra. Maria Helena, por toda ajuda ao longo dos anos, pela preocupação tanto no profissional quanto no pessoal, pelo carinho, pelos conselhos, paciência e humanidade.

À Prof.^a Rowena Coelho, pela paciência no fluxo, pelas boas risadas, pelos abraços quando precisei e por todo incentivo. Obrigada por tornar meu mestrado mais leve e suave.

Ao Dr. Fábio Brito, por me ajudar a enxergar novas possibilidades seja nos experimentos ou fora deles, pelos cafés da tarde e pela troca de experiências.

A minha grande amiga Anna Carolina, você é um presente de Deus na minha vida, daqueles com um embrulho meio “esquisito”, mas que a gente sorri e fica feliz quando recebe. Te agradeço pelas boas gargalhadas, pela preocupação e por estar sempre ao meu lado. Te amo, vê se não esquece, Mestre!

Aos queridos Caio e Iara, pelas loucuras dos seminários, dos experimentos e da bendita estatística. Foi bom embarcar nessa jornada com vocês.

À Gabi e Biazinha, minhas “irmãs mais novas”, pela implicância, pelas gargalhadas, pelo carinho e parceria que desenvolvemos ao longo do tempo. Vocês são minhas pequenas, que amo de graça. Obrigada por trazerem alegria aos meus dias e fazerem a diferença na minha caminhada.

Às minhas meninas (os) do Diagnóstico Micológico, Ana, Jéssica, Ju, Jonnys e Marquitos. Vocês tornaram meus dias mais divertidos e a estrada mais tranquila. Obrigada por cada ajuda, almoço, cada kg a mais que ganhamos juntos, rs, e cada conversa. Vocês moram no meu coração.

Aos queridos amigos e colegas de trabalho, Mauro Muniz, Cláudia Pizzini, Marcos de Abreu, Vanessa Brito, Andréa Engemann, Camila Jantoro, Larissa Miranda, Luã Cardoso, Lucas Machado e Rosângela Alves, por toda presteza e risadas, vocês são incríveis!!

Ao Laboratório de Toxinologia (IOC-Fiocruz), por me permitir usar o equipamento NanoVue.

À Dra. Luciana Trilles, Prof.^a Mônica e Prof.^a Rosani, pelo espaço e equipamentos disponibilizados durante todo o período do mestrado.

À querida e atenciosa Carla Pena, por nunca dizer não aos meus pedidos de ajuda.

Aos queridos Gilberto Reis e Mônica Martins, por todo empenho na confecção dos meios de cultivo e esterilização de materiais.

À querida Priscilla Tavares de Sá, por sua boa vontade e parceria na resolução de problemas.

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, pela oportunidade e pelos subsídios cedidos, para que eu pudesse ter acesso a um aprendizado de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela dedicação e auxílio a todos os cursos de Pós-Graduação.

Ao CNPq, por investir no meu sonho e de outros milhares de alunos.

À Faperj, por todo apoio prestado.

À Fiocruz, por me deixar participar de sua fantástica história científica desde a graduação.

Aos pacientes, que foram um dos pilares mais importantes do nosso estudo.

A todos que de alguma forma me ajudaram e me incentivaram na conclusão deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

“Tem vez que as coisas pesam mais do que a gente acha que pode aguentar. Nessa hora fique firme pois tudo isso logo vai passar. Você vai rir, sem perceber. Felicidade é só questão de ser. Quando chover, deixar molhar. Pra receber o sol quando voltar”

Marcelo Jeneci

CRUZ, Ingrid Ludmilla Rodrigues. **Estudo de isolados sequenciais de *Sporothrix* spp. obtidos de pacientes com esporotricose disseminada de evolução crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida**, 2020. 97 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, 2020.

RESUMO

Esporotricose é uma micose subcutânea que afeta humanos e outros mamíferos, causada por fungos do gênero *Sporothrix*. Em indivíduos imunocomprometidos, principalmente com síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), pode ser fatal. Já foi demonstrado que *Sporothrix brasiliensis*, principal espécie causadora de esporotricose no estado do Rio de Janeiro, é capaz de aumentar sua virulência *in vivo*. Entretanto, não se sabe com que frequência esse evento ocorre em pacientes com formas crônicas e refratárias de esporotricose. Também há poucos dados sobre como as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de antifúngicos frente a isolados de *S. brasiliensis* em pacientes com esporotricose refratária se comportam ao longo do tratamento. Desta forma, o objetivo desse estudo foi comparar isolados sequenciais de *Sporothrix* spp., a fim de detectar possíveis aumentos de virulência e aquisição de resistência a antifúngicos durante o curso crônico da doença, bem como correlacionar tais achados com dados clínicos dos pacientes. Este foi um estudo descritivo, com amostra de conveniência composta de pacientes com esporotricose e aids, da coorte do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Os isolados foram identificados por reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos de cada espécie. O crescimento dos isolados foi avaliado frente a fontes alternativas de carbono e comparado com o crescimento na presença de glicose. A suscetibilidade aos fármacos anfotericina B, itraconazol, posaconazol e terbinafina foi avaliada nas formas filamentosa e leveduriforme do fungo, seguindo protocolo preconizado pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Pesquisaram-se possíveis fatores de virulência fúngica: termotolerância, resistência ao estresse nitrosativo e oxidativo, produção de urease, fitase, aspártico-protease, hemolisinas e lipases. Foram incluídos cinco pacientes, dos quais foram isolados e analisados 16 isolados de *Sporothrix* spp. Todos os pacientes apresentaram aids avançada, com complicações relacionadas à esporotricose disseminada e a outras doenças oportunistas. Todos os isolados foram identificados como *S. brasiliensis* e tiveram um bom crescimento em glicose e N-acetil-D-glucosamina, mas não em lactato. Quanto à suscetibilidade antifúngica, todos os isolados de dois dos pacientes estudados eram do tipo não selvagem para terbinafina, entretanto foram considerados tipo selvagem para os demais antifúngicos testados. Não houve variação significativa entre as CIM nas duas morfologias, mas estas aumentaram ao longo do curso da doença em alguns isolados de pacientes tratados com anfotericina B. A termotolerância dos isolados foi considerada de moderada a alta e, embora não significativo, isolados de sítios corporais profundos apresentaram maior termotolerância. Todos os isolados foram capazes de produzir enzimas relacionadas à virulência, exceto fitase e fosfolipase, sendo a esterase mais produzida por isolados obtidos de lesões cutâneas. Em alguns pacientes foram observadas alterações em todos os fenótipos estudados durante o curso da doença. Não houve associação estatística dos fenótipos estudados com aspectos clínicos dos pacientes. Os resultados mostram que os fenótipos de *S. brasiliensis* podem impactar na evolução da esporotricose crônica, mas não em todos os pacientes. O status imunológico do hospedeiro parece ter papel preponderante no desfecho clínico.

Palavras-chave: Esporotricose. *Sporothrix*. Virulência. Suscetibilidade antifúngica. Síndrome da imunodeficiência adquirida.

CRUZ, Ingrid Ludmilla Rodrigues. **Study of sequential isolates of *Sporothrix* spp. obtained from patients with chronic disseminated sporotrichosis and acquired immunodeficiency syndrome**, 2020. 97 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, 2020.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis that affects humans and other mammals, caused by fungi of the genus *Sporothrix*. In immunocompromised individuals, especially those with acquired immunodeficiency syndrome (aids), it can be fatal. It has been demonstrated that *Sporothrix brasiliensis*, the main species causing sporotrichosis in the state of Rio de Janeiro, is able to increase its virulence *in vivo*. However, it is not known how often this event occurs in patients with chronic and refractory forms of sporotrichosis. Also, it is unknown if there is a stability in the minimum inhibitory concentrations (MIC) of antifungals against isolates of *S. brasiliensis* in patients with refractory sporotrichosis. Thus, the objective of this study was to compare sequential isolates of *Sporothrix* spp., in order to detect possible increases in virulence and acquisition of resistance to antifungals during the chronic course of the disease, as well as to correlate these findings with clinical data of patients. This was a descriptive study, with a convenience sample composed of patients with sporotrichosis and aids, from the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases cohort. The isolates were identified by polymerase chain reaction using specific primers for each species. The growth of the isolates was evaluated against alternative sources of carbon and compared with the growth in the presence of glucose. The susceptibility to the drugs amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and terbinafine was evaluated in the filamentous and yeast forms of the fungi, following the protocols recommended by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Possible fungal virulence factors were investigated: thermotolerance, resistance to nitrosative and oxidative stress, production of urease, phytase, aspartic protease, hemolysins, and lipases. Five patients were included, of whom 16 isolates of *Sporothrix* spp. were isolated and analyzed. All patients had advanced aids, with complications related to disseminated sporotrichosis and other opportunistic diseases. All isolates were identified as *S. brasiliensis* and presented good growth in glucose and N-acetyl-D-glucosamine, but not in lactate. As for antifungal susceptibility, all isolates from two of the patients studied were non-wild type for terbinafine, however they were considered wild type for the other antifungals tested. There was no significant variation between the MICs in the two morphologies, but there was an increase over the course of the disease in some isolates from patients treated with amphotericin B. The thermotolerance of the isolates was considered moderate to high and, although not significant, isolates from deep body sites presented higher thermotolerance. All isolates were able to produce virulence-related enzymes, except for phytase and phospholipase, and esterase was more produced by isolates obtained from skin lesions. In some patients, alterations were observed in all phenotypes studied during the course of the disease. There was no statistical association between the studied phenotypes and clinical aspects of the patients. The results show that the studied fungal phenotypes can impact the evolution of chronic sporotrichosis in some patients. The immune status of the host seems to have a major role in the clinical outcome.

Keywords: Sporotrichosis. *Sporothrix*. Virulence. Antifungal susceptibility test. Acquired immunodeficiency syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Região de pareamento dos iniciadores específicos para identificação molecular das espécies do gênero <i>Sporothrix</i> baseada no gene da Calmodulina.....	19
Figura 2 - Macromorfologia do gênero <i>Sporothrix</i>	21
Figura 3 - Micromorfologia do gênero <i>Sporothrix</i>	21
Figura 4 - Distribuição da esporotricose humana nos estados do Brasil.....	29
Figura 5 - Georreferenciamento da esporotricose no estado do Rio de Janeiro.....	31
Figura 6 - Formas clínicas da esporotricose.....	34
Figura 7 - Esporotricose em paciente com aids.....	42
Figura 8 - Esquema de diluição de fármacos antifúngicos.....	49
Figura 9 - Identificação molecular dos isolados estudados.....	58
Figura 10 - Distribuição dos valores de %IC indicativos da termotolerância.....	62
Figura 11 - Avaliação dos isolados de <i>Sporothrix brasiliensis</i> frente a radicais de nitrogênio quimicamente gerados e peróxido de hidrogênio.....	63
Figura 12 - Fotografias de isolados clínicos de <i>Sporothrix brasiliensis</i> apresentando halo devido à produção enzimática.....	64
Figura 13 - Produção de enzimas hidrolíticas por isolados clínicos de <i>Sporothrix brasiliensis</i> de pacientes com esporotricose crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida.....	65

Figura 14 - Crescimento de <i>Sporothrix brasiliensis</i> sob diferentes fontes de carbono.....	67
Figura 15 - Diferenças fenotípicas entre os 16 isolados clínicos dos pacientes com esporotricose e infecção por HIV.....	68
Figura 16 - Mapas de calor representando a correlação entre fenótipos fúngicos e aspectos clínicos dos pacientes.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de termotolerância dos isolados de <i>Sporothrix brasiliensis</i> após 7 dias de crescimento em ágar batata dextrose (PDA)	51
Tabela 2 - Classificação de atividade enzimática.....	55
Tabela 3 - Características clínico-epidemiológicas dos pacientes estudados.....	57
Tabela 4 - Características dos isolados incluídos no estudo e status imunológico de cada paciente no período de isolamento.....	59
Tabela 5 - Dados clínico-terapêuticos e concentração inibitória mínima de 16 isolados clínicos de <i>S. brasiliensis</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMB – Anfotericina B
- ATCC - *American Type Culture Collection* (Coleção de microrganismos norte-americana)
- BHI - *Brain Heart Infusion* (Infusão cérebro e coração)
- Bp – *Base Pair* (Pares de Base)
- CAL – Calmodulina
- CD4+ - Contagem de linfócitos TCD4+ por ml
- CELL-BLOCK - Citologia de impressão e bloco citológico
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CIM- Concentração Inibitória Mínima
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standard Institute*
- CV – Carga Viral
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- dNTP - Deoxi-Nucleotídeo Trifosfato
- DO – Densidade óptica
- EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido tetracético etilenodiamino)
- EF- *Elongation Factor* (Fator de Alongamento)
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- EUA – Estados Unidos da América
- EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana)
- GlcNAc - N-acetil-D-glucosamina
- Gp70 - 3-carboximuconato ciclase
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana
- % IC – Percentual de inibição de crescimento
- INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
- ITS - Internal Transcribed Spacer (Região de transcrição interna)
- ITZ - Itraconazol

Kb – Kilobase (quilobase)

KOH - Hidróxido de potássio

MALDI-TOF - *Matrix-assisted laser desorption/ionization* – Time of flight (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo)

MB - Megabases

MOPS - ácido 3-*N* morfolino propanossulfônico

NM – Nanômetro

PAS - Ácido periódico de Schiff

PCR - *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PDA - *Potato Dextrose Agar* (Agar batata dextrose)

PSZ – Posaconazol

RCA – Amplificação por círculo rolante

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição)

RPMI - Meio do Roswell Park Memorial Institute

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal

TBE - Tris borato-EDTA

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TRB – Terbinafina

UFC/ml - Unidade formadora de colônia por mililitro

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 HISTÓRICO	16
1.2 GÊNERO <i>Sporothrix</i>	17
1.2.1 Taxonomia e identificação	17
1.2.2 Morfologia	20
1.2.3 Parede celular	22
1.2.4 Material genético e polimorfismos	22
1.2.5 Ecologia e fisiologia	23
1.2.6 Fatores de virulência	24
1.3 ESPOROTRICOSE.....	28
1.3.1 Manifestações clínicas.....	32
1.3.2 Diagnóstico e tratamento.....	34
1.3.2.1 Exame micológico direto.....	34
1.3.2.2 Cultivo.....	35
1.3.2.3 Histopatologia	35
1.3.2.4 Sorologia	36
1.3.2.5 Teste de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos	36
1.3.2.6 Tratamento	37
1.4 HIV/AIDS	39
1.5 COINFECÇÃO <i>Sporothrix</i> spp./HIV	40
2 JUSTIFICATIVA.....	43
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 PACIENTES E DADOS CLÍNICOS	45
4.2 CEPAS DE REFERÊNCIA.....	45
4.3 ISOLADOS CLÍNICOS	46
4.4 REISOLAMENTO.....	46
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA	46
4.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	47
4.7 ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	48
4.8 PREPARO DAS MICROPLACAS	48
4.9 PREPARO DO INÓCULO E LEITURA DOS RESULTADOS	50
4.10 ANÁLISE DE POSSÍVEIS FATORES ENVOLVIDOS COM A VIRULÊNCIA	51
4.10.1 Teste de termotolerância.....	51
4.10.2 Resistência ao estresse nitrosativo.....	51
4.10.3 Resistência ao estresse oxidativo.....	52

4.10.4	Produção de urease	52
4.11	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM MEIO SÓLIDO	53
4.11.1	Preparo dos inóculos	53
4.11.2	Atividade da aspártico-protease	53
4.11.3	Atividade hemolítica	54
4.11.4	Atividade da fitase	54
4.11.5	Atividade da fosfolipase	54
4.11.6	Atividade de esterase	54
4.11.7	Interpretação dos resultados de atividade enzimática em meio sólido	55
4.12	PLASTICIDADE METABÓLICA	55
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS	57
5.1	PACIENTES E ISOLADOS CLÍNICOS	57
5.2	ISOLADOS INCLUÍDOS NO ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	59
5.3	ANÁLISE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	61
5.4	TERMOTOLERÂNCIA	63
5.5	RESISTÊNCIA AO ESTRESSE NITROSATIVO E OXIDATIVO	63
5.6	PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	65
5.7	CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	67
5.8	DIFERENÇAS FENOTÍPICAS DE ACORDO COM SÍTIO DE ISOLAMENTO	69
5.9	CORRELAÇÕES ENTRE FENÓTIPOS FÚNGICOS E ASPECTOS CLÍNICOS DOS PACIENTES	70
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	APÊNDICE A - Fluxograma da pesquisa de amostras viáveis para o estudo	95
	ANEXO A - Intervalo de concentração inibitória mínima e concentração efetiva mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de <i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019), <i>Candida krusei</i> (ATCC 6258) e <i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 204304) utilizadas nesse estudo	96
	ANEXO B – Intervalo da concentração inibitória mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 e <i>Candida krusei</i> ATCC 6258.	977

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

No ano de 1898, Benjamin Schenck, estudante de medicina da Universidade Johns Hopkins, em Baltimore, Estados Unidos da América (EUA), isolou o agente da esporotricose pela primeira vez, de um paciente de 36 anos que apresentava lesões na mão direita e no braço. Esse isolado foi enviado ao micologista Erwin Smith, que posteriormente concluiu que o fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum*. Em 1900, Hektoen e Perkins, também nos EUA (Chicago, Illinois), relataram um caso de esporotricose em um menino que se feriu com um martelo, apresentando lesões típicas da esporotricose em seu dedo, as quais apresentaram regressão espontânea (HEKTON; PERKINS, 1900; SCHENCK, 1898). Antes da descrição feita por Benjamin Schenck, Linck em 1809, Lutz e Splendore em 1889, já haviam relatado uma micose com aspectos semelhantes aos da esporotricose no Brasil. Todavia esses autores não conseguiram isolar o fungo, impossibilitando sua descrição (KWON-CHUNG; BENNET, 1992).

Mais tarde, em 1903, Sabouraud sugeriu o uso de iodeto de potássio para o tratamento da esporotricose, micose que era endêmica na França (KWON-CHUNG; BENNET, 1992). Ainda hoje, esse tratamento pode ser utilizado, pois permanece como uma terapia satisfatória em diversos casos de esporotricose (MACEDO et al., 2014).

No ano de 1907, Lutz e Splendore identificaram no Brasil o primeiro caso de infecção natural em ratos causada por *Sporothrix schenckii* (LUTZ; SPLENDORE, 1907). Passaram-se dois anos até que a possibilidade de infecção por *S. schenckii* em outros mamíferos, como o gato, fosse demonstrada experimentalmente (BEURMANN et al., 1909).

No ano de 1952, ocorreu o primeiro relato de caso de esporotricose humana relacionada a contato com gato (SINGER; MUNCE, 1952). Posteriormente, constatou-se que a transmissão do agente da esporotricose também pode ser zoonótica. O papel dos felinos nessa micose obteve grande relevância quando Read e Sperling, no ano de 1982, relataram um surto que envolvia cinco pessoas que tiveram contato com um gato infectado. Desde então, tornaram-se comuns relatos em diferentes regiões geográficas, onde donos de gatos e veterinários são apontados como um grupo de risco para aquisição de esporotricose (HIRANO et al., 2006; YEGNESWARAN et al., 2009).

No final da década de 90, a esporotricose começou a ter relevância no Brasil, quando felinos foram apontados como transmissores do agente desta micose (BARROS et al., 2011).

No estado do Rio de Janeiro, o aumento de esporotricose zoonótica foi relatado em 1998, e perdura até os dias de hoje, com níveis hiperendêmicos (BARROS et al., 2001; FALCÃO et al., 2020). Um estudo publicado no ano de 2012 buscou apontar geograficamente os locais com o maior número de casos de esporotricose no estado do Rio de Janeiro, entre eles estava o município do Rio de Janeiro que concentrou o maior número de casos, seguido por Duque de Caxias, São João de Meriti, Nova Iguaçu, Nilópolis, Belford Roxo e Mesquita (SILVA et al., 2012).

Os gatos infectados são as principais fontes de transmissão na hiperendemia instaurada no Rio de Janeiro, mesmo em alguns casos os felinos não apresentando lesões aparentes ou não provocando traumas. Entretanto, foi realizado o isolamento do fungo por meio de “swab” nasal em gatos assintomáticos, apontando assim a possibilidade de transmissão por via inalatória (BARROS et al., 2004). O aumento abrupto de casos chamou atenção para grupos vulneráveis, entre eles, os infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (FALCÃO et al., 2019; FALCÃO et al., 2020; FREITAS et al., 2014).

1.2 GÊNERO *Sporothrix*

1.2.1 Taxonomia e identificação

Sporothrix spp. pertence ao Reino Fungi e durante muitos anos foi taxonomicamente classificado da seguinte forma: Divisão Eumycota, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, Ordem Moniliales e Família Moniliaceae (LACAZ et al., 1998). No entanto, foi realizada uma revisão taxonômica deste fungo e ele passou a ser classificado como pertencendo à Divisão Ascomycota, Classe Pyrenomycetes, Ordem Ophiostomatales, Família Ophiostomataceae (GUARRO, 2012).

Alguns importantes critérios taxonômicos como a morfologia celular, forma de brotamento, tipo de ciclo sexual e os esporos continuam sendo importantes para a identificação fúngica, porém, identificar e classificar espécies é uma tarefa árdua e muitas vezes errônea quando baseada apenas em características fenotípicas (MEYER et al., 2008). Até o ano de 1962, o agente etiológico da esporotricose era classificado como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. Após uma análise mais detalhada de sua morfologia e fisiologia, ficaram claras suas diferenças em relação a outros fungos deste gênero, que não compreende agentes patogênicos ao homem nem a outros animais (CARMICHAEL, 1962). Em sua grande maioria, os fungos do gênero *Sporothrix* não são patogênicos, mas sim fungos ambientais associados principalmente a

plantas, solo e madeira em decomposição. Durante um longo período, *S. schenckii* foi apontada como a única espécie causadora da esporotricose (LACAZ, 2002). Porém, após a utilização de um grande número de isolados, de diferentes regiões geográficas, para uma análise filogenética baseada em sequenciamento parcial de genes constitutivos, mostrou-se uma elevada diferença molecular neste fungo (MARIMON et al., 2006). Um ano mais tarde, após vasto estudo genotípico e fenotípico, Marimon e colaboradores (2007) sugeriram que *S. schenckii* não deveria ser a única espécie causadora da esporotricose.

Atualmente sugere-se que existam 53 espécies pertencentes a esse gênero (RODRIGUES et al., 2020). Alguns fungos dimórficos desse gênero são apontados como causadores da esporotricose. Entre eles é possível citar: *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. luriei*, *S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis*, sendo os três primeiros clinicamente mais relevantes (OROFINO-COSTA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2016). Estudos indicam que a taxonomia do gênero *Sporothrix* esteja fundamentada em resultados fenotípicos e utilização de marcadores moleculares que possibilitem a diferenciação das espécies (MARIMON et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2012). Comumente são observadas variações fenotípicas das espécies fúngicas em níveis inter e intraespecíficos (MITCHELL; XU, 2003) tornando importante a utilização de variados subsídios a fim de aprimorar os resultados quanto à classificação de espécies. Entre essas ferramentas, é possível citar: sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA), ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF), hibridização DNA-DNA, entre outras.

A identificação das espécies de *Sporothrix* baseada em características fenotípicas apresenta limitações, uma vez que características iguais podem ser apresentadas por espécies filogeneticamente relacionadas, ao passo que técnicas moleculares podem classificar corretamente todas as 53 espécies do gênero. Para tal, são utilizados como alvos as regiões ITS1+5.8S+ITS2 e os genes da calmodulina (*CAL*), β -tubulina e fator de alongamento (EF). Além disso, as técnicas moleculares também fornecem dados fundamentais para estudos voltados para epidemiologia molecular, estrutura de populações, diversidade genética e recombinação genética (LOPES BEZERRA et al., 2018).

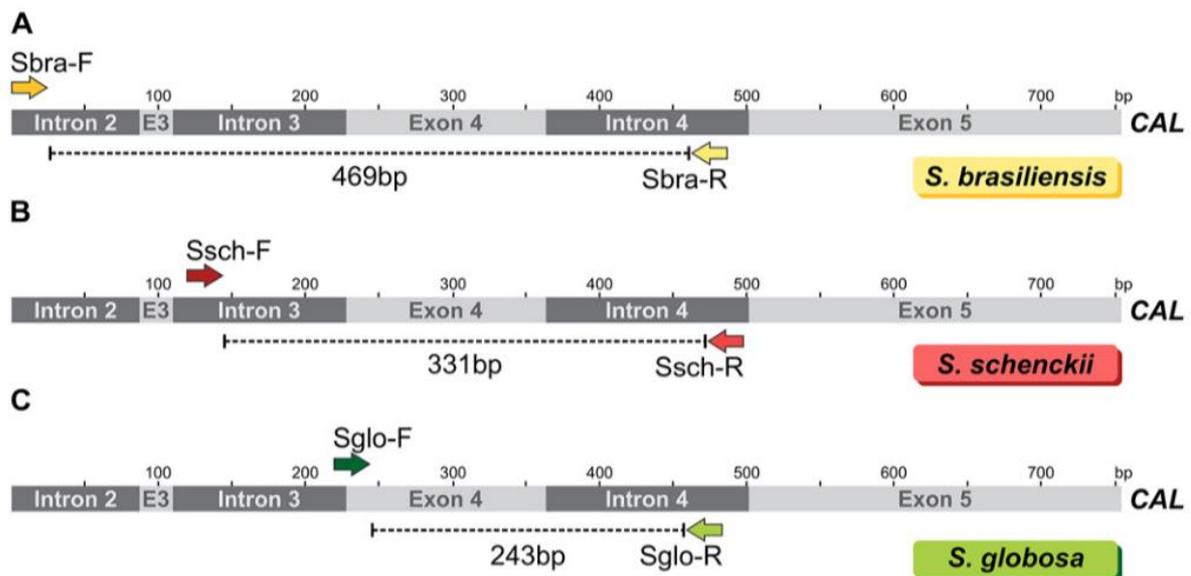
Existem variadas formas de identificação molecular citadas na literatura, que são utilizadas para a identificação de espécies, como por exemplo, reação em cadeia da polimerase e polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP) e amplificação por círculo rolante (RCA), o segundo é utilizado para identificação específica das espécies de *Sporothrix*, por meio do desenvolvimento de sondas tendo como alvo polimorfismos no gene codificador da calmodulina. Essa técnica propiciou a diferenciação da maioria das espécies

patogênicas de *Sporothrix*, *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* e *S. pallida* (RODRIGUES et al. 2015b).

As espécies apresentam variabilidade em diversas sequências genéticas e o sequenciamento parcial do gene da calmodulina (*CAL*), é amplamente utilizado para diferenciar as espécies de *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007).

No ano de 2015, Rodrigues e colaboradores abordaram o desenvolvimento de novos marcadores baseados no gene da calmodulina. Esta escolha foi realizada devido à existência de variadas regiões informativas ao longo de sua sequência, que evidenciam o seu valor no reconhecimento filogenético entre as espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix*. O estudo foi realizado por meio da PCR espécie-específica utilizando os primers (Ssch, Sbra, Sglo), onde a partir de amostras de culturas fúngicas e tecidos de modelos murinos, conseguiram diferenciar as espécies (**Figura 1**) de maior interesse para a clínica médica em um pequeno nível de detecção 10-100 fentogramas de DNA de *Sporothrix* spp., demonstrando assim, um excelente resultado quanto à sensibilidade, especificidade, além de fácil execução da técnica.

Figura 1: Região de pareamento dos iniciadores específicos para identificação molecular das espécies do gênero *Sporothrix* baseada no gene da Calmodulina



Legenda: Iniciadores específicos utilizados para identificação molecular das espécies do gênero *Sporothrix*, onde fragmentos variaram entre 144 e 469 pb. Os produtos de PCR com importância para o presente estudo foram: A - iniciadores de *Sporothrix brasiliensis*, Sbra-F e Sbra-R; B - Iniciadores de *Sporothrix schenckii*, Ssch-F e Ssch-R; C- Iniciadores de *Sporothrix globosa*, Sglo-F e Sglo-R.

Fonte: Rodrigues et al., 2015a (com modificações).

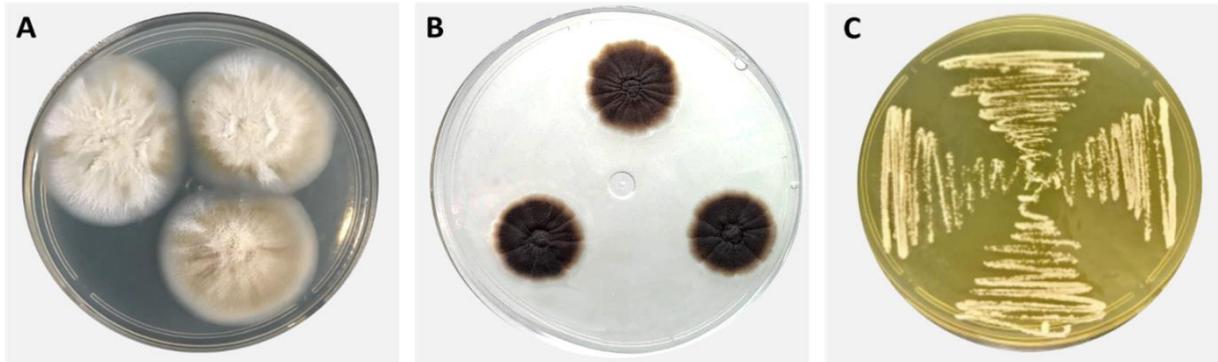
Outros métodos diagnósticos vêm sendo descritos na literatura com a finalidade de suprir as limitações de métodos empregados na rotina laboratorial. A técnica de T3B “fingerprinting” é um deles, descrita com o intuito de gerar diferentes padrões de bandas entre *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. schenckii* e *S. mexicana*. Após as análises, foi observada uma alta concordância entre os padrões de bandas gerados pela técnica de T3B “fingerprinting” e o sequenciamento parcial do gene da calmodulina. Além disso, foi relatado que o teste foi importante na identificação de 14 isolados que previamente não tinham sido identificados por métodos fenotípicos (DE OLIVEIRA et al., 2012).

Em 2015, foi relatado o desenvolvimento e otimização de um protocolo de MALDI-TOF para a identificação de espécies do gênero *Sporothrix*, que claramente distinguiu as espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. schenckii*, *S. luriei* e *S. pallida*, permitindo assim, a identificação de todos os isolados em nível de espécie, confirmado pelo sequenciamento parcial do gene da calmodulina (DE OLIVEIRA et al., 2015). Recentemente, foi desenvolvida uma PCR multiplex em tempo real, baseada no gene da calmodulina, que pode simultaneamente detectar a presença de DNA de *S. globosa*, *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. Os limites de detecção da técnica foram de 10 cópias de ácido nucleico para *S. globosa* e *S. schenckii* e 100 cópias para *S. brasiliensis*. Os autores concluíram que o ensaio multiplex foi rápido, eficaz, preciso e altamente sensível, permitindo a detecção de coinfeção e interpretação mais rápida dos resultados, além de sugerirem que, no futuro, esse teste possa ser comercializado como um kit de detecção dos agentes etiológicos da esporotricose (ZHANG et al., 2019).

1.2.2 Morfologia

As espécies patogênicas humanas do gênero *Sporothrix* são dimórficas. Quando cultivadas a 25 °C ou no ambiente, assumem a forma filamentosa. Macroscopicamente, as colônias filamentosas em meios de cultura como Agar Batata Dextrose (PDA) podem possuir aspecto liso e enrugado, branco e creme logo no início (**Figura 2A**) e adquirir alteração na tonalidade para marrom ou negra com o passar dos dias (**Figura 2B**) (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; RIPPON, 1988), porém algumas isolados são capazes de formar colônias de coloração escura desde o início do crescimento (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011). As colônias das estruturas leveduriformes são vistas quando o fungo é cultivado a 35 °C e, quando analisadas macroscopicamente em meios de cultura específicos como Brain Heart Infusion (BHI), apresentam cor clara, normalmente creme e de consistência cremosa (**Figura 2C**).

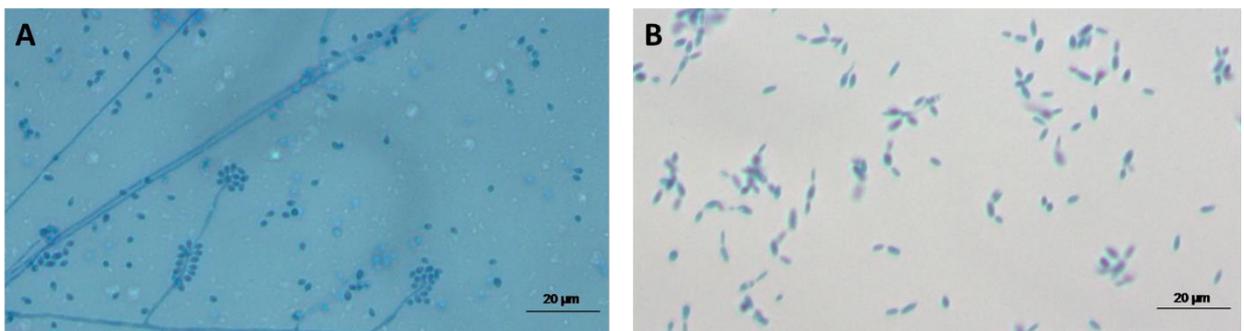
Figura 2: Macromorfologia do gênero *Sporothrix*.



Legenda: A - Cultura filamentosa em meio agar batata dextrose (PDA) incubada em estufa a 25 °C, com variação de hialina a marrom claro, com aspecto algodoso. B - Cultura filamentosa em meio PDA incubado em estufa a 25 °C, marrom e com aspecto enrugado. C - Cultura leveduriforme em meio agar infusão cérebro coração (BHI) incubada em estufa a 35 °C, de coloração clara e aspecto cremoso.

Microscopicamente, a forma filamentosa apresenta hifas hialinas septadas e ramificadas, finas, com conídios hialinos em arranjo simpodial e conídios demáceos com formatos que variam de acordo com a espécie (**Figura 3A**) (MARIMON et al., 2007; SINGHAI et al., 2012). As leveduras são, em geral, unibrotantes, podendo apresentar aspecto ovalado, fusiforme e com brotamento em forma de charuto conforme observado na **Figura 3B** (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011). Via de regra, *in vivo*, as espécies patogênicas de *Sporothrix* são evidenciadas em tecidos humanos ou animais vertebrados na forma de levedura. Em raros casos, hifas podem ser observadas nos espécimes clínicos (LARONE, 2002).

Figura 3: Micromorfologia do gênero *Sporothrix*.



Legenda: A - Aspecto microscópico de cultura filamentosa em meio agar batata dextrose (PDA) incubada em estufa a 25 °C, visualizada em microscópio óptico com lactofenol azul de algodão, evidenciando hifas hialinas, finas e conídios ovóides e soltos, algumas vezes agrupados conferindo-lhes o aspecto de “margarida” B - Amostra de cultura leveduriforme incubada a 35 °C, visualizada em microscópio óptico, corada com azul de algodão, evidenciando diversas estruturas leveduriformes com brotamento em forma de charuto.

In vitro, é possível observar a fase micelial ou leveduriforme utilizando meios de cultura específicos a 25 °C ou 37 °C (MENDONÇA et al., 1976). Alguns fatores podem auxiliar na termoconversão, entre eles a aeração, o pH, fontes de carbono, tensão de CO₂ e presença de

cátions divalentes. Sobretudo, a temperatura possui papel determinante no dimorfismo da espécie (ALSINA; RODRIGUEZ-DEL, 1984; VALLE et al., 1983).

1.2.3 Parede celular

Os fungos do gênero *Sporothrix* apresentam uma parede celular que envolve a membrana plasmática, tanto na forma de levedura quanto na forma de hifa. São aparentes as diferenças características na espessura da parede celular dos conídios, leveduras e hifas (SVOBODA; TRUJILLO-GONZALEZ, 1990).

Os fungos possuem uma parede celular que pode ser considerada complexa. Tem sido demonstrado que *S. schenckii* produz vesículas, o que favorece o transporte de moléculas através da parede celular, sendo uma importante fonte de liberação de fatores de virulência para o meio externo (ALBUQUERQUE et al., 2008; IKEDA et al., 2018). Sabe-se que a parede celular de *S. schenckii* é composta por β -glucanas e peptídeo-ramnomananas. Figueiredo e colaboradores demonstram em estudo utilizando modelo murino que isolados de *S. schenckii* com maior proporção de ramnose na parede celular costumam ser mais virulentos, apresentando uma menor taxa de sobrevivência (FIGUEIREDO et al., 2004).

1.2.4 Material genético e polimorfismos

Por muitos anos, os estudos de tipagem de *S. schenckii* foram baseados em análises de polimorfismo dos fragmentos gerados por endonucleases de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA), com a endonuclease *HaeIII*. Logo no início, foram citados 24 tipos de mtDNA (LIN et al., 1999). Posteriormente, os tipos 25-30 (MORA-CABRERA et al., 2001) e 31-32 (ISHIZAKI et al., 2009), foram inseridos.

No ano de 2014, foi publicada a comparação genômica dos dois maiores causadores de esporotricose humana e felina: *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, sendo o tamanho dos genomas de 32,4 Mb e 33,2 Mb, respectivamente. Com esse estudo, foi sugerido que pode haver novas oportunidades para estudos funcionais, a fim de se compreender a biologia destes fungos e a infecção por eles causada (TEIXEIRA et al., 2014; HUANG et al., 2016).

Apesar da importância da esporotricose como doença, com várias áreas endêmicas relatadas nos últimos anos, foram realizados poucos estudos tratando de polimorfismos genéticos e arquitetura genômica dos isolados do gênero *Sporothrix*. Algumas publicações sugerem que polimorfismos genéticos de *Sporothrix* spp. possam estar relacionados com a

virulência fúngica. Um estudo revelou que uma cepa de *S. schenckii*, isolada de um caso de esporotricose humana cutânea disseminada, apresentou uma deleção de 10 pares de bases da região ribossomal não transcrita, quando comparada com uma cepa controle obtida de um caso de esporotricose cutânea fixa (ZHANG et al., 2011).

Polimorfismos genéticos também são relatados com a suscetibilidade antifúngica do gênero *Sporothrix*. Um estudo baseado em sequências do gene da calmodulina e da região de transcrição interna (ITS - Internal Transcribed Spacer) de 22 isolados de *S. brasiliensis* e 39 de *S. schenckii* mostrou que *S. brasiliensis* possui uma baixa diversidade genética e uma pequena variação de suscetibilidade ao itraconazol e posaconazol. Por outro lado, os isolados de *S. schenckii* foram separadas em 10 haplótipos, que se correlacionaram com a alta variedade de concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos fármacos mais comumente usados no tratamento da esporotricose, são eles: itraconazol, posaconazol e terbinafina (RODRIGUES et al., 2014).

1.2.5 Ecologia e fisiologia

Sporothrix spp. é um fungo sapróbio de matéria orgânica viva ou em decomposição, e seu desenvolvimento se dá principalmente em áreas tropicais e subtropicais. É encontrado em musgos, feno, espinhos de rosas, entre outros materiais orgânicos, possuindo ampla distribuição geográfica e pode apresentar características distintas de sobrevivência (ALMEIDA-PAES et al., 2009; MESA-ARANGO et al., 2002; TÉLLEZ et al., 2014).

Esses substratos são indicados como importantes fontes de transmissão na cadeia epidemiológica deste fungo (KWON-CHUNG; BENNET, 1992; RIPPON, 1988). Para sobreviver em seu habitat natural, é necessário um conjunto de condições e recursos que o auxiliam, como a abundância de celulose, temperatura de crescimento de aproximadamente 31°C e um pH que encontra-se em uma faixa entre 3,5 e 9,4 (KWON-CHUNG; BENNET, 1992; NORIEGA et al., 1993; RAMIREZ-SOTO et al., 2018).

Observam-se, ainda, diferenças fisiológicas nas duas morfologias de *Sporothrix* spp., em que sua forma filamentosa pode crescer bem em pH em torno de 3,0 - 11,5, mas células de levedura só podem crescer dentro da faixa de pH 3,0 - 8,5 (GOSH et al., 2002). Outra característica fisiológica importante é a capacidade que o fungo possui de metabolizar ureia, além de realizar a aquisição redutora de ferro por enzimas secretadas extracelularmente e tolerância à cicloheximida a 0,25% (MARIMON et al., 2007).

1.2.6 Fatores de virulência

Fatores de virulência são recursos que permitem ao microrganismo a possibilidade de sobreviver e ampliar seu crescimento no hospedeiro. Ainda não há uma explicação concreta para a origem da virulência dos fungos do gênero *Sporothrix*. O mecanismo pelo qual eles adquirem e mantêm sua virulência não está bem esclarecido, uma vez que não precisam obrigatoriamente de um hospedeiro animal em seu ciclo de vida. Acredita-se que sua virulência possa estar relacionada às interações intermicrobianas que estabelecem em seu habitat. Já foi demonstrado em alguns estudos que as células de levedura de *S. schenckii* quando ingeridas pela ameba *Acanthamoeba castellanii* podem sobreviver dentro deste protozoário, matá-lo e usá-lo como nutriente (STEENBERGEN et al., 2004). Outros fungos dimórficos desenvolvem o mesmo comportamento de *S. schenckii* e possuem seus fatores de virulência bem descritos, o que ainda não ocorre em relação a todos os possíveis fatores de virulência relacionados ao gênero *Sporothrix* (GUIMARAES et al., 2016; GUIMARAES et al., 2019).

Ainda sobre virulência, atualmente modelos invertebrados têm sido cada vez mais utilizados para testes voltados à determinação e comparação da virulência fúngica. Sugere-se que esses modelos possuam certa semelhança imunológica com mamíferos, além de terem um excelente custo-benefício para a pesquisa (THOMAZ et al., 2015). O modelo lepidóptero *Galleria mellonella* tem sido usado para estudos com *S. brasiliensis*, *Paracoccidioides lutzii*, *Histoplasma capsulatum*, entre outros microrganismos (FREITAS et al., 2015a; THOMAZ et al., 2015). Outro modelo invertebrado que se mostra versátil e importante para a pesquisa experimental principalmente na área da neurobiologia é o *Caenorhabditis elegans*, pois possui características semelhantes às dos seres humanos, esse modelo já foi utilizado em estudos envolvendo *Paracoccidioides* sp. e *Histoplasma* sp, por exemplo (KATNER et al., 2019; MARTORELL et al., 2019, SINGULANI et al., 2018). Além dos modelos citados acima, é possível falar também sobre *Tenebrio molitor*, cada vez mais utilizado como modelo alternativo em diversos estudos de virulência fúngica, e micotoxinas produzidas por *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* entre outros (SOUZA et al., 2018). Já que a infecção experimental em insetos é possível de ser realizada, provavelmente a infecção natural possa ocorrer em insetos que vivam no mesmo habitat de *Sporothrix* spp., o que também pode ter impacto na virulência.

A **termotolerância** é um fator associado à virulência, para cada hospedeiro estudado. Os fungos do gênero *Sporothrix* possuem a capacidade de tolerar e, muitas vezes, crescer na temperatura corpórea dos hospedeiros endotérmicos (37 °C). Isolados com capacidade de

crescimento a 37 °C são em geral capazes de realizar algum tipo de disseminação pelo organismo hospedeiro, enquanto que isolados com capacidade de crescimento restrita a 35 °C costumam causar lesões localizadas (KWON-CHUNG; BENNET, 1992; MESA-ARANGO et al., 2002; TACHIBANA et al., 1998). Um fato que corrobora tal afirmação é que *S. globosa* tem baixa termotolerância, com inibição de seu crescimento quando incubado a 37 °C, ao contrário das espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. luriei* e *S. mexicana*. Por esse motivo, é considerada uma espécie de baixa virulência em relação às demais patogênicas, já que quando inoculada em camundongos não provoca a morte dos animais, apresentando baixo nível de carga parasitária e apenas inflamação local, o que não difere com o tamanho do inóculo utilizado (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009). Entretanto, quando se trata da infecção em humanos causada por essa espécie, faz-se necessário tratamento (MOUSSA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2010).

Classicamente, as **hemolisinas** foram denominadas como exotoxinas responsáveis por lisar células nucleadas e glóbulos vermelhos. Atualmente, sugere-se que as hemolisinas são toxinas que formam poros que são capazes de interagir com ligantes específicos na superfície de algumas células-alvo. As hemolisinas já foram estudadas em espécies de bactérias, mamíferos e até mesmo em plantas (NAYAKA et al., 2012; ZOHR et al., 2017). O primeiro relato de atividade hemolítica em fungos filamentosos ocorreu no ano de 1939 durante uma análise das espécies *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*, em que micélios cultivados apresentaram atividade hemolítica (HENRICI, 1939).

Ao longo dos anos, diversas hemolisinas fúngicas têm sido apontadas como possíveis fatores de virulência (REMENTERIA et al., 2005; VESPER, 2004). Estudos relatam que *A. fumigatus* produz uma hemolisina intitulada de asp-hemolisina que facilita o curso da aspergilose e pode estar presente em outras infecções oportunistas (BATTOOL et al., 2013). Em outros estudos relacionados a hemolisinas fúngicas, é relatado que variadas espécies de *Candida* demonstram hemólise quando cultivadas em meio específico, indicando, assim, que esse pode ser um importante fator de virulência na infecção no hospedeiro (LUO et al., 2001; MANNNS et al., 1994). Essas enzimas estão associadas à aquisição de ferro, o qual possui extrema importância no estabelecimento do processo infeccioso, portanto a captação desse elemento possui grande valia para a sobrevivência do microrganismo (MANNNS et al., 1994; NEVITT; THIELE, 2011). Em alguns microrganismos, como *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, o mecanismo de hemólise e seus detalhes estruturais são bem caracterizados, em contraste, ainda há muito o que

se estudar em relação a outras espécies fúngicas (NAYAKA et al., 2012; ZOHR et al., 2017), em especial no gênero *Sporothrix*.

Em diversos microrganismos, a **urease** é apontada como uma enzima que possibilita o uso da ureia como fonte de nitrogênio. Sugere-se também, que a urease desenvolve uma função protetora para plantas, uma atividade tóxica para insetos e até mesmo agregação plaquetária para alguns mamíferos. Em variados estudos, é possível ver a gama de papéis exercidos pela urease na natureza (CARLINI et al., 2016; FOLLMER, 2008). A urease é considerada um importante fator de virulência para muitos microrganismos, entre eles as bactérias *Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis*, com a liberação de amônia resultando no aumento parcial do pH ácido do trato gastrointestinal (DUBREUIL et al., 2002), e do trato urinário, respectivamente (MOBLEY et al., 1995), deixando os tecidos do hospedeiro em condições mais propícias para uma melhor reprodução bacteriana. A literatura demonstra a importância da urease como fator de virulência em várias espécies de fungos patogênicos. Acredita-se que no fungo dimórfico *Coccidioides* spp., a urease apresenta importante atividade de alcalinização, a qual é fundamental para seu dimorfismo, pois a sobrevivência do fungo seria mais complexa e inviável em meio ácido (MOBLEY et al., 1995). A urease também é apontada como fator de virulência em *Trichophyton rubrum* (HIRUMA et al., 2013), *Paracoccidioides brasiliensis* e *C. neoformans* (ROCHA et al., 2009), sendo importante fator de virulência na criptococose do sistema nervoso central (COX et al., 2000).

Dentre outros fatores que contribuem com a virulência, estão as **fosfolipases** que agem na degradação dos fosfolipídios que compõem a membrana celular e, juntamente com as proteases, podem facilitar o processo de invasão tecidual do hospedeiro durante o processo de infecção (GHANNOUM, 2000; KANTARCIOGLU; RÜCHEL et al., 1992; YÜCEL, 2002).

Já as **lipases extracelulares** são consideradas importante fator de virulência em numerosas espécies de fungos. Entre suas possíveis funções estão a digestão de lipídios para obtenção de nutrientes, adesão às células e tecidos do hospedeiro e ativação de reações inflamatórias (PARK; DO; JUNG, 2013; SCHALLER et al., 2005; STEHR et al., 2004).

As **esterases** estão relacionadas à digestão de lipídios facilitando a aquisição de nutrientes, adesão a células e tecidos do hospedeiro, e processos que podem afetar as células do sistema imunológico, prejudicando assim, a defesa do hospedeiro (SCHALLER et al., 2005).

Uma das características importantes para diferenciação entre as lipases e as esterases é que a primeira possui a capacidade de catalisar a hidrólise de ligações éster com triacilgliceróis com mais de 10 carbonos, ou seja, de cadeia longa, já a segunda catalisa a hidrólise de triacilgliceróis constituídos por ácidos graxos de cadeia curta. A característica e especificidade

de cada uma destas enzimas está diretamente ligada à hidrofobicidade, já que as lipases possuem atração por substratos insolúveis, enquanto as esterases estão relacionadas inteiramente a ligações éster em substratos solúveis em água (CHAHINIAN; SARDA, 2009).

Quanto às proteínas, pode-se dizer que são consideradas macromoléculas abundantes, uma única célula pode conter diferentes tipos de proteínas (NELSON; COX, 2014). As proteínas podem assumir variadas funções quando dentro das células, entre algumas delas: funções de defesa, ajudando a inativar algumas substâncias prejudiciais ao organismo; função de transporte, carreando substâncias específicas nas células e função de armazenamento, atuando como depósito de aminoácidos (QUIRÓS; LANGER; LÓPEZ-OTÍN, 2015). As proteases são enzimas com potencial para catalisar a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas, gerando assim, proteínas íntegras e/ou funcionais, aminoácidos livres e cadeias peptídicas menores, sendo determinantes em fungos patogênicos (ELAVARASHI et al., 2017; SANTOS, 2011).

As **proteases** são secretadas por diversos microrganismos a fim de degradar as proteínas e seus produtos, utilizando posteriormente o produto de hidrólise como fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento celular (ZANPHORLIN et al., 2015).

As **aspártico-proteases** são enzimas que possuem alta capacidade proteolítica e conseguem se estabilizar em pH ácido (RAO et al., 1998). Essas enzimas possibilitam a evasão da resposta imune inata e a degradação de proteínas relacionadas à defesa imunológica, como citocinas e anticorpos, possibilitando dessa forma uma maior chance de escape por parte do fungo da primeira linha de defesa do hospedeiro. Essas enzimas possuem um importante e bem descrito papel na virulência de espécies do gênero *Candida*, além de sua atividade ser descrita em outros fungos, como *S. brasiliensis* (STANISZEWSKA; MAŁGORZATA; ZBIGNIEW, 2016).

A **catalase** está amplamente relacionada à proteção da célula contra o estresse oxidativo imposto por fagócitos e ocasionado por espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre elas, destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NAKAMURA et al., 2012). A catalase é capaz de converter H_2O_2 , letal para o fungo, em água e oxigênio, possibilitando assim que o fungo se mantenha viável após a resposta imune do hospedeiro, desencadeando assim o processo de multiplicação do mesmo (ROMÁN et al., 2016). Em estudo realizado por Mario e colaboradores (2017), foi abordado que órgãos de animais infectados por *S. brasiliensis* obtiveram uma diminuição da produção de catalase, o que pode acarretar o aumento do peróxido de hidrogênio, que é altamente tóxico para a célula.

Outro fator associado à virulência, ainda pouco explorado em fungos patogênicos, é a **plasticidade metabólica**, em que o fungo possui a capacidade de utilizar variadas fontes de carbono e nitrogênio para seu desenvolvimento e sobrevivência, adaptando-se à escassez nutricional que ocorre durante o curso de uma infecção. Estudos apontam que *C. albicans* possui a capacidade de colonizar indivíduos imunocompetentes e suas células conseguem se adaptar agilmente às fontes de carbono disponíveis no hospedeiro. O lactato e a glicose são algumas dessas fontes, disponíveis tanto no sangue quanto em secreções vaginais. Acredita-se que em alguns casos a utilização dessas fontes possa contribuir para o aumento da virulência do patógeno, como por exemplo, burlar o sistema imunológico (BALLOU et al., 2016; BARELLE et al., 2006). Além das fontes de carbono citadas acima, *C. albicans* tem a capacidade de assimilar açúcares como GlcNAc, algo que é incomum a outros fungos. Essa assimilação pode modificar o pH extracelular alterando a forma de brotamento para forma de pseudo-hifas e hifas, além de induzir a neutralização do pH propiciando a sobrevivência de *C. albicans* após a fagocitose (BISWAS et al., 2007; MIRAMÓN; LORENZ, 2017; SUDBERY, 2011; VESELY et al., 2017).

1.3 ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma micose subcutânea de distribuição mundial, causada por algumas espécies do gênero *Sporothrix*, ela já foi relatada em diversas países do mundo, alguns exemplos são: África do Sul, Austrália, Japão, China, Índia, EUA, Guatemala, México, Malásia entre outros (CHAKRABARTI et al., 2015; MARIMON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2020; ZHANG et al., 2015).

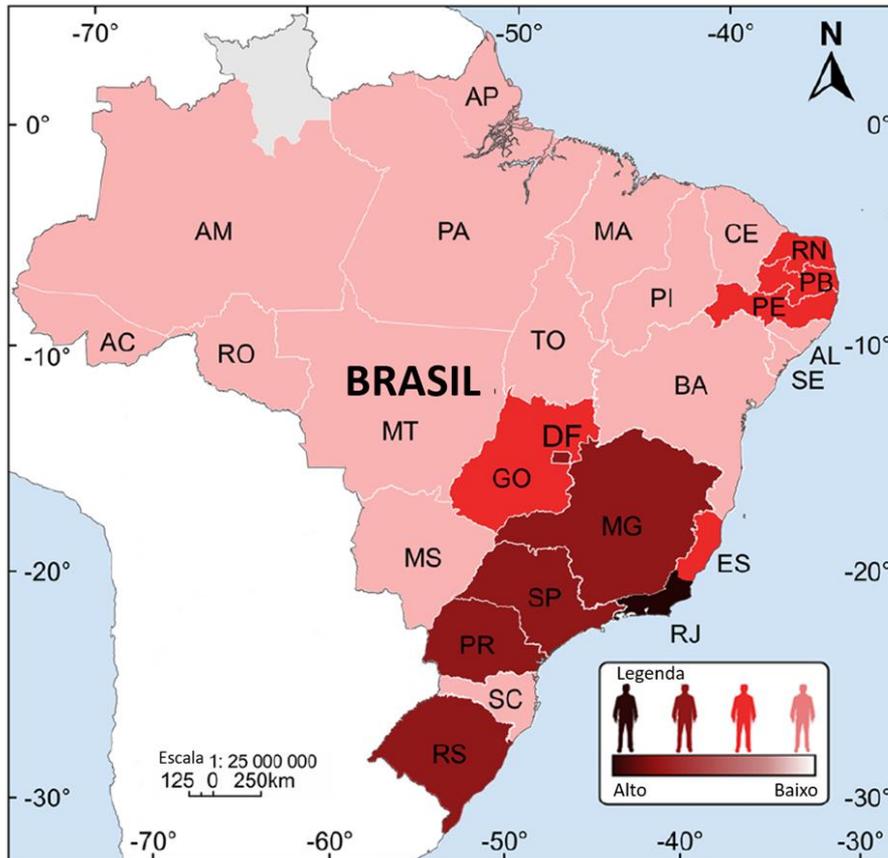
O histórico da esporotricose vem mudando constantemente, desde o modo de transmissão até a sua distribuição geográfica. Fatores ambientais, urbanização e evolução no diagnóstico explicam, em parte, as alterações do perfil da doença (BARROS et al., 2011). Ambos os sexos podem ser acometidos na esporotricose. Na maioria dos casos, a esporotricose é uma infecção sem maiores complicações, sendo restrita à pele, ao tecido subcutâneo e aos vasos linfáticos adjacentes (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; RIPPON, 1988).

A esporotricose já foi conhecida como “doença dos jardineiros”, dado o grande número deste grupo de trabalhadores infectados pelo fungo (ENGLES et al., 2007). Em grande parte dos casos a infecção é consequência da inoculação do fungo por espinhos, arranhões e pequenos ferimentos, porém a história de trauma nem sempre está presente (BARROS et al., 2004;

CHOAPPA; OYARZOA; SILVA, 2014; CRUZ et al., 2012; DIXON et al., 1991; GOVENDER et al., 2015; HAJJEH et al., 1997; MCGUINNESS et al., 2016; MENDOZA et al., 2007; PAPPAS et al., 2000; REED; SPERLING, 1982). Ao longo dos anos, diversas atividades foram associadas à esporotricose, como por exemplo, jardinagem, caça e mineração (RIPPON, 1988). Alguns estudos relatam, também, que a transmissão pode estar associada a gatos, cães, tatus, ratos, esquilos e aves (BARROS et al., 2001; FICHMAN et al., 2018; KAUFFMAN, 1999; LUTZ; SPLENDORE, 1907; LYON et al., 2003; MADRID et al., 2012; TANG et al., 2012;).

Autores entendem que, devido à grande quantidade de leveduras nas lesões, os gatos são os únicos animais com potencial de transmissão zoonótica de esporotricose, descritos até o momento, devido ao seu comportamento social, que pode envolver arranhadura e mordedura, diferente dos cães em geral (SCHUBACH et al., 2003; TABOADA, 2000). Mesmo quando em alguns casos os cães são afetados, eles não parecem ter potencial zoonótico diferenciado (SCHUBACH et al., 2006). No Brasil, os casos de esporotricose possuem uma ampla distribuição, alcançando grande parte de seus estados. A doença tem sua maior endemicidade nas regiões Sul e Sudeste, as quais detêm o maior número de casos, entretanto a região Nordeste vem apresentando um significativo crescimento de casos da doença nos últimos anos (**Figura 4**).

Figura 4: Distribuição da esporotricose humana nos estados do Brasil.



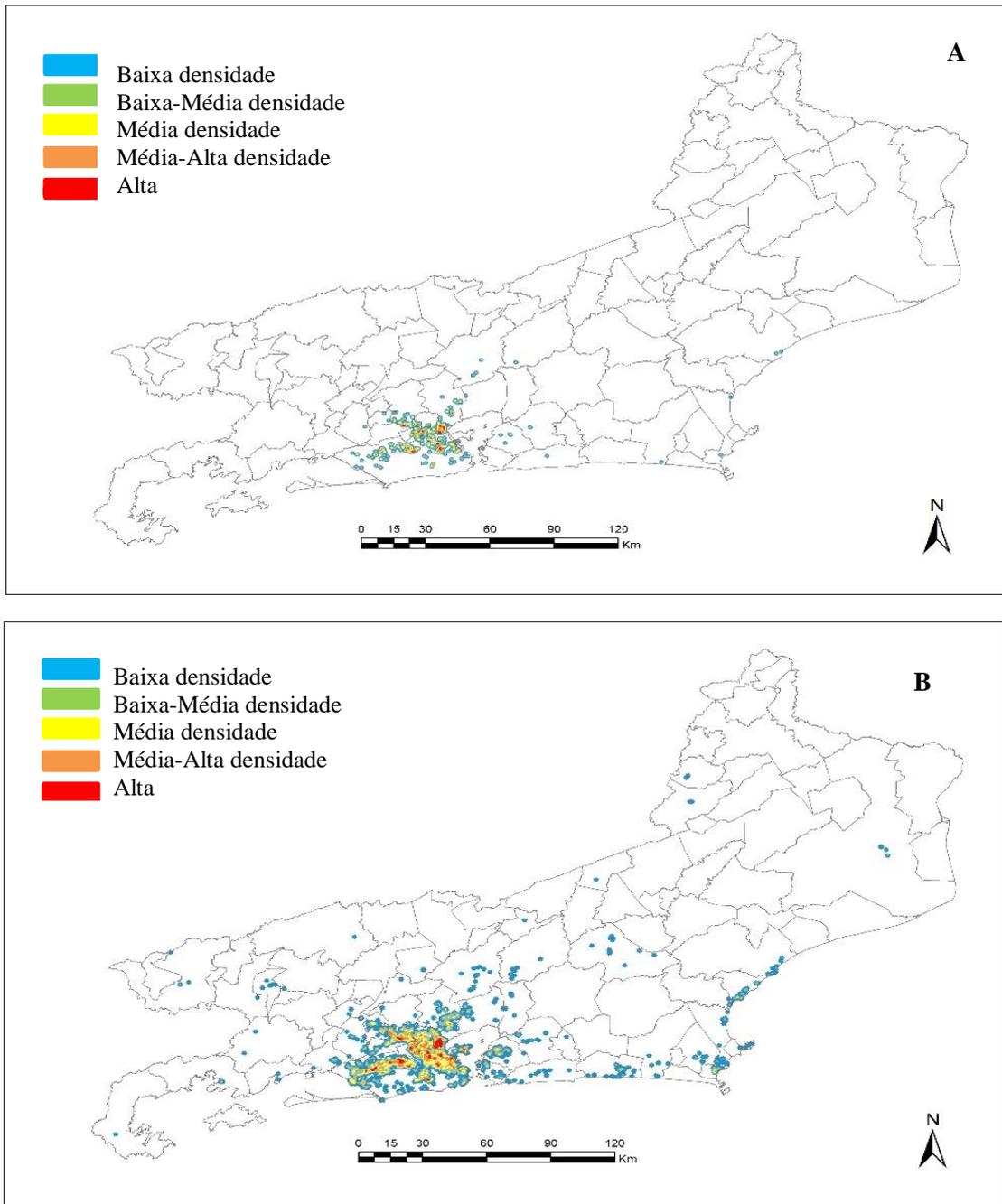
Legenda: Mapa indicando os locais com a maior concentração de casos de esporotricose no Brasil, seguindo uma variação de tons, sendo a coloração bordô indicativa do maior número de casos e o a coloração cor de rosa indicativa do menor número de casos.

Fonte: Rodrigues, 2020.

Na hiperendemia que ocorre no estado do Rio de Janeiro e nos outros estados do Sul e Sudeste, além de grande parte do Nordeste e Centro-Oeste do país, a principal forma de transmissão da doença se dá através de arranhadura e mordedura de gatos domésticos naturalmente infectados (BOECHAT et al., 2018; GREMIÃO et al., 2017; REIS et al., 2015; RODRIGUES et al., 2020).

Falcão (2018) realizou uma análise da distribuição e aumento de casos de esporotricose no estado do Rio de Janeiro, no período de 2008 a 2015. Em seus resultados, é possível observar a expansão da doença durante esses anos (**Figura 5**).

Figura 5: Georreferenciamento da esporotricose no estado do Rio de Janeiro.



Legenda: A) Distribuição espacial dos casos de esporotricose no ano de 2008; B) Distribuição espacial dos casos de esporotricose acumulados nos anos de 2008-15.

Fonte: FALCÃO, 2018.

Embora tenha se iniciado no estado do Rio de Janeiro no final dos anos 90, e seja a maior epidemia por transmissão zoonótica de esporotricose já registrada, considerada atualmente uma hiperendemia, a esporotricose tornou-se uma doença de notificação compulsória estadual apenas em 2013 (GREMIÃO et al., 2017; RESOLUÇÃO SES N°674 de 12/07/2013).

1.3.1 Manifestações clínicas

A esporotricose comumente se inicia com pequenas lesões a partir do sítio de inoculação traumática do agente, sob a forma de pápulas ou pústulas, que aumentam de tamanho originando nódulos e placas. Pode-se dividir a esporotricose humana em formas clínicas distintas (RAMOS-E-SILVA et al., 2007), que serão mostradas a seguir:

Forma cutânea fixa: representa cerca de 20% dos casos dessa doença, sendo considerada o segundo tipo mais comum de esporotricose. A lesão limita-se apenas ao local da inoculação sem o envolvimento dos vasos linfáticos. O paciente infectado apresenta lesões ulcerosas, úlcero-crostosas, placas verrucosas ou infiltradas. Em crianças, é mais comum a presença de lesões satélites de pequeno porte (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011). Os braços e pernas são os locais mais comuns de lesões, sendo que em crianças lesões são encontradas com frequência na área da face (SONG et al., 2011). Em geral, os pacientes acometidos pela forma cutânea fixa não apresentam sintomas sistêmicos. Entretanto, as lesões podem evoluir para um curso crônico caso o paciente não siga um tratamento adequado, ou mesmo pode ocorrer uma involução espontânea da lesão (**Figura 6A**) (BARROS et al., 2011; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011).

Forma linfocutânea: é a forma mais comum e de fácil diagnóstico clínico, ocorrendo na maioria dos casos (75%). Após duas ou três semanas da inoculação do fungo ocorre o aparecimento de uma lesão primária no local do inóculo (normalmente nas extremidades superiores). Esta lesão pode ser ulcerada com uma base infiltrada ou papulosa, nodular, nódulo-ulcerativa, placa úlcero-gomosa ou vegetativa. Posteriormente à lesão inicial, cria-se uma cadeia de nódulos indolores, ou pouco dolorosos, ao longo do trajeto dos vasos linfáticos, que podem amolecer e ulcerar, com drenagem de pouco exsudato. Geralmente, não são observadas alterações na pele entre os nódulos linfáticos (RIPPON, 1988). Eritema e infecção secundária podem estar presentes, mas a dor é geralmente leve (**Figura 6B**) (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2002; 2005; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011).

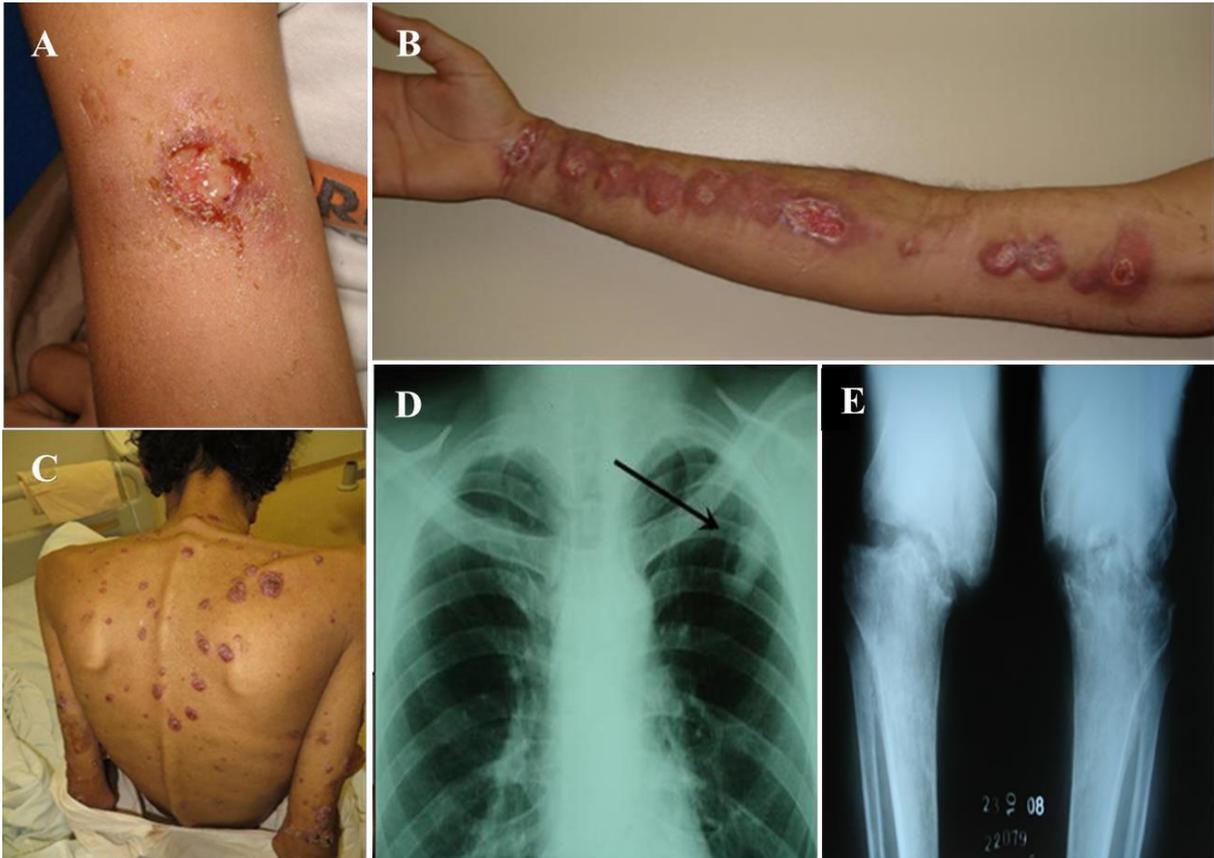
Forma cutânea disseminada: caracteriza-se por lesões nodulares, gomosas ou ulceradas disseminadas. A disseminação hematogênica ocorre após inoculação na pele. No início, apresentam-se lesões subcutâneas amolecidas podendo ulcerar depois de semanas ou meses (gomas). Mesmo sendo uma forma rara, ela tem sido relatada em pacientes com infecção pelo HIV como a primeira manifestação da aids (AL-TAWFIQ; WOOLS, 1998; FREITAS et al., 2012; MOREIRA; FREITAS; LAMAS, 2015) e em pacientes que passam por longas terapias com esteroides. Em até 16% dos casos, a esporotricose cutânea disseminada pode se

apresentar em pacientes imunocompetentes que adquirem a doença por meio da arranhadura de gatos em múltiplos locais (**Figura 6C**) (BARROS et al., 2003; FREITAS et al., 2010).

Forma extracutânea: ocorre apenas em uma pequena quantidade dos casos de esporotricose, sendo a de diagnóstico mais difícil. Ocorre por inoculação direta em uma mucosa, inalação de conídios, disseminação hematogênica do fungo, dentre outras formas.

Os sintomas são inerentes ao órgão afetado, causando febre e comprometimento geral em alguns casos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011). Nos quadros oculares, por exemplo, enquanto o acometimento da câmara anterior do olho costuma ser atribuído a inóculos diretos não traumáticos na mucosa, as formas intraoculares de envolvimento posterior, como na coroidite, são atribuídas à disseminação hematogênica do fungo, a partir de inalação ou de foco cutâneo, em geral associadas à imunossupressão (ARINELLI et al., 2019; BIANCARDI et al., 2017; OROFINO-COSTA et al., 2017). As formas pulmonares (**Figura 6D**) e neural costumam acometer pacientes imunossuprimidos por doenças como aids, diabetes, câncer, entre outras (FREITAS et al., 2014; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; RIPPON, 1988). Na esporotricose óssea (**Figura 6E**), a inoculação pode ser direta no osso, ou pode ocorrer disseminação por contiguidade a partir do sítio cutâneo, ou mesmo hematogênica, fazendo com que o fungo chegue até o osso. Esta forma da esporotricose pode apresentar quadros graves, principalmente em pacientes imunossuprimidos, com alta morbidade e possíveis sequelas (FREITAS et al., 2015a).

Figura 6: Formas clínicas da esporotricose.



Legenda: A) Forma cutânea fixa - Lesão ulcerada, pouco exsudativa, no braço de um menino de 10 anos; B) Forma linfocutânea - Múltiplas lesões nódulo-ulceradas seguindo trajeto linfático no membro superior de um homem adulto, a partir da lesão primária no punho; C) Forma cutânea disseminada - Múltiplas lesões papulosas, nodulares, nódulo-ulceradas, crostosas e infiltradas, dispostas por todo o tegumento de um paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida (visualiza-se dorso do tronco e membros superiores); D) Formas extracutâneas - Cavitação no ápice do pulmão esquerdo (seta); E) Osteoartrite destrutiva de joelhos, bilateralmente. Fonte: FREITAS et al., 2012; FREITAS, 2014; FREITAS et al., 2015a.

1.3.2 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da esporotricose é obtido pelas correlações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, incluindo cultura e caracterização molecular e sorológica. O diagnóstico diferencial é de extrema importância, pois lesões como as de leishmaniose tegumentar e cromoblastomicose, entre outras, podem possuir aspecto semelhante às causadas pela esporotricose (LOPES BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

1.3.2.1 Exame micológico direto

Inicialmente é realizado o exame direto da amostra clínica, com hidróxido de potássio (KOH) a 10%. Entretanto, o diagnóstico da esporotricose humana por meio de exame direto é raro, devido à escassez de leveduras nas amostras coletadas. Quando encontradas, as leveduras

possuem formato alongado (em forma de charuto) e ovalado (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011). Em felinos, o exame direto é mais sensível, devido à grande carga fúngica presente nos tecidos, demonstrando sensibilidade de quase 85% em comparação com a cultura (OROFINO-COSTA et al., 2017).

1.3.2.2 Cultivo

É considerado padrão-ouro do diagnóstico e é realizado em meios de cultura Agar-Sabouraud contendo cloranfenicol e/ou Agar Seletivo Mycosel, contendo cicloheximida, a 25 °C. Após o período de crescimento, em geral de 7 a 15 dias, é feita a transferência da colônia sugestiva de *Sporothrix* spp. para meio Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI), com incubação por mais 7 dias a 37 °C até a termoconversão de micélio para levedura, com consequente identificação morfológica do agente (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011). O isolamento de *Sporothrix* spp. habitualmente ocorre entre 4-6 dias, tratando-se de lesões cutâneas, e 10-19 dias, para lesões extracutâneas; podendo ocorrer variação neste tempo (OROFINO-COSTA et al., 2017).

1.3.2.3 Histopatologia

A detecção de *Sporothrix* spp. pelo exame histopatológico é controversa, alguns pesquisadores sugerem que devido à escassez de elementos fúngicos a sensibilidade desse teste em seres humanos é reduzida, gerando assim resultados negativos. Entretanto, existem diversos relatos de presença de corpos asteroides, sendo sua detecção dependente da análise de cortes histológicos seriados (BARROS et al., 2011).

Para a realização da técnica utilizam-se colorações como hematoxilina e eosina (H&E), ácido periódico de Schiff (PAS) e impregnação pela prata-metenamina de Grocott-Gomori (GMS) para visualização de *Sporothrix* spp. Geralmente, o tecido visualizado possui reação inflamatória granulomatosa supurativa na derme e tecido subcutâneo. Durante o exame histopatológico é necessário considerar o histórico do paciente e a reação tecidual apresentada no material analisado, pois ambos podem auxiliar em um possível diagnóstico (BARROS et al., 2011). Quintela e colaboradores (2011) correlacionaram a duração da lesão à presença do fungo. Alterações histopatológicas relacionadas a lesões mais antigas ou a uma resposta imune específica e mais desenvolvida, estavam diretamente associadas à ausência do fungo. Em contraste, o fungo foi observado nos casos em que as alterações encontradas sugeriram lesão

recente associada à atividade inflamatória ou ao desenvolvimento da imunidade específica em curso.

Já os felinos possuem lesões bastante exsudativas, com carga fúngica elevada, sendo ideais para utilização de técnicas como a punção aspirativa de nódulos ou abscessos, citologia esfoliativa, citologia de impressão e bloco citológico (Cell-Block) (CLINKENBEARD, 1991; GONSALES et al., 2019; PEREIRA et al., 2011).

1.3.2.4 Sorologia

A partir do momento em que antígenos específicos foram caracterizados e padronizados para o diagnóstico da esporotricose, tornou-se possível a utilização de testes imunoenzimáticos como “ELISA” e “Western Blot” pois ambos possuem alta sensibilidade e podem proporcionar um diagnóstico mais rápido. Além disso, são testes úteis não só para o rastreamento da infecção, mas também para o tratamento e monitoramento de possíveis recaídas (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2005; OROFINO-COSTA et al., 2017). Com base na literatura, é possível inferir que ensaios sorológicos são ferramentas laboratoriais importantes para um diagnóstico diferencial ou complementar de variadas formas da esporotricose, incluindo casos em que existe a suspeita da infecção, mas as apresentações clínicas são inespecíficas (ALMEIDA-PAES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2019; SCOTT; MUCHMORE, 1988). Estes testes, entretanto, estão pouco disponíveis comercialmente, com uso quase restrito a centros de pesquisa, até o momento.

1.3.2.5 Teste de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos

O teste de suscetibilidade pode ser empregado quando se acredita que o causador da infecção pertence a uma classe capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos utilizados rotineiramente. Esse método é indicado sempre que algum organismo não tem sua sensibilidade predita de maneira confiável por meio de sua identificação, ou quando a terapêutica aplicada ao paciente não alcança um resultado satisfatório. Os testes podem ser realizados em difusão de disco padrão ou microdiluição, de acordo com documento de referência preconizado pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) ou ainda pelo método descrito pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015; CLSI, 2008; NCCLS, 2003)

Para realização dos testes citados acima, são utilizados pontos de corte epidemiológicos, que possuem como principal função a diferenciação de isolados do tipo selvagem e não

selvagem, auxiliando assim a conduta médica diante de isolados não selvagens, que possuem um potencial refratário ao tratamento. Valores de pontos de corte epidemiológicos (ECVs) foram determinados para algumas espécies de *Sporothrix* pelo método de microdiluição em caldo. Entretanto, ainda não há um ponto de corte para todas as espécies deste gênero (ESPINEL-INGROFF et al., 2017).

1.3.2.6 Tratamento

Antifúngicos são medicamentos utilizados para impedir o crescimento do patógeno fúngico ou causar sua destruição no hospedeiro. Esses fármacos podem ser administrados por via tópica ou sistêmica, dependendo da necessidade do paciente e seu uso pode ser curativo ou preventivo. O diagnóstico precoce, a identificação do fungo causador da infecção e uso do antifúngico correto são alguns fatores determinantes para a evolução do paciente mediante à exposição ao fármaco (RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELA, 2009). O tratamento da esporotricose pode ser realizado com itraconazol, solução saturada de iodeto de potássio ou terbinafina, todos por via oral e com bons resultados nas formas cutâneas localizadas. Itraconazol oral em doses maiores é a escolha para as formas disseminadas, sendo a anfotericina B, por via parenteral, utilizada em casos mais graves da doença (BARROS et al., 2011).

Os polienos, os azólicos e as alilaminas são antifúngicos com mecanismo de ação voltado para o ergosterol e sua biossíntese. A anfotericina B pertence à classe dos polienos, que são macromoléculas que podem se ligar ao ergosterol, principal esterol da membrana citoplasmática do fungo, modificando sua permeabilidade e desestabilizando a integridade dessa membrana, consequentemente causando a ruptura da célula fúngica. A anfotericina B possui amplo espectro, sendo considerada um fármaco de eleição para casos com maior gravidade. Entretanto, sua administração precisa ser cautelosa, pois apresenta efeito cardiotóxico e nefrotóxico, tornando-se essencial a avaliação da função renal e dos níveis séricos de potássio do paciente (COWEN et al., 2002; OROFINO-COSTA et al., 2017 RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELA, 2009).

A terbinafina faz parte do grupo de alilaminas e, assim como os polienos, também possui capacidade fungicida, com moléculas que interferem diretamente na síntese de ergosterol por meio da inibição da enzima esqualeno epoxidase, o que causa um acúmulo do substrato dessa enzima e consequentemente leva à ruptura da membrana celular do fungo. A literatura demonstra que a terbinafina é uma excelente opção em pacientes com contraindicações ao uso de itraconazol (COWEN et al., 2002; OROFINO-COSTA et al., 2017).

O itraconazol é um triazólico pertencente à família de azólicos. O que difere os triazólicos dos demais fármacos dessa família é o fato de possuírem três átomos de nitrogênio na molécula. Esta classe geralmente não apresenta toxicidade grave. Esses compostos exercem ação específica sobre o citocromo P-450 dos fungos, evitando a desmetilação do lanosterol, induzindo alteração estrutural da membrana fúngica, inibindo assim o crescimento do patógeno graças à sua capacidade fungistática (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; COWEN et al., 2002; MARTINEZ, 2006).

A solução saturada de iodeto de potássio foi o primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento da esporotricose, se relata seu uso desde o início do século passado e sua eficácia é bem conhecida, assim como seu baixo custo também. Esse fármaco é recomendado para pacientes imunocompetentes e pode ser indicado principalmente para crianças e idosos, já que possui uma forma líquida, podendo ser misturado em sucos ou iogurtes para melhor aceitação do paladar. Sua contraindicação inclui pacientes com problemas renais, problemas tireoidianos, grávidas e lactantes.

Cada fármaco é administrado de acordo com a manifestação clínica do paciente:

Formas cutâneas localizadas: O itraconazol geralmente é o fármaco de escolha, porém em alguns casos a terbinafina e a solução saturada de iodeto de potássio podem ser utilizadas (FRANCESCONI et al., 2011; KAUFFMAN et al., 2007). Um estudo publicado em 2014 demonstrou que mesmo com a redução da dose de iodeto de potássio, administrado aos pacientes na rotina clínica, a eficácia do tratamento permaneceu satisfatória (MACEDO et al., 2014). Caso o paciente esteja impossibilitado de receber o tratamento farmacológico padrão, como na gravidez por exemplo, existem outras alternativas a serem consideradas, como aplicação diária de calor local na lesão (BARROS et al., 2011a; FERREIRA et al., 2012; KAUFFMAN et al., 2007; OROFINO-COSTA et al., 2017), ou a realização de criocirurgia com nitrogênio líquido em jato, que também pode ser utilizada em pacientes que possuem uma lenta resposta ao tratamento convencional (FERREIRA et al., 2011; FICHMAN et al., 2019).

Formas disseminadas: Por serem formas potencialmente mais graves, a anfotericina B torna-se o fármaco de escolha, sem desconsiderar o uso do itraconazol. Em caso de acometimento do sistema nervoso central, também é possível utilizar uma associação de fármacos como anfotericina B e posaconazol (FREITAS et al., 2015a; KAUFFMAN et al., 2007) (**Figura 7**).

1.4 HIV/AIDS

No ser humano, o HIV desenvolve-se causando imunodeficiência celular por meio da diminuição progressiva de linfócitos T CD4⁺ (contagem de linfócitos T CD4⁺ < 200 células/ μ l), afetando assim, a quantidade e qualidade de células centrais da imunidade. A sucessão desses eventos resulta em uma incapacidade na formação de uma resposta imunológica satisfatória, o que acarreta ao indivíduo a suscetibilidade a infecções e outras comorbidades. A imunidade humoral também é prejudicada durante esse amplo processo, que habitualmente mais tarde se traduzirá no desenvolvimento da aids.

A aids teve seu primeiro relato em 1981, quando inúmeros homens que fazem sexo com homens foram acometidos por infecções desconhecidas e comorbidades raras (CDC, 1981; GREENE, 2007). Um retrovírus, desconhecido até então, foi identificado como agente causador de uma doença infecciosa de grande letalidade (BARRE-SINOUSSE et al., 1983; GALLO et al., 1984; POPOVIC et al., 1984). Desde o primeiro relato do HIV, são realizados estudos para esclarecer possíveis razões para o seu surgimento repentino, sua rápida propagação e patogenicidade. No ano de 1986, algumas hipóteses começaram a surgir, quando um vírus semelhante foi apontado como causador da aids em pacientes na África Ocidental (CLAVEL et al., 1986). Esse novo vírus relatado foi classificado como HIV, todavia, na época, não foi relacionado diretamente com o HIV e encontrava-se ligado intimamente com o vírus símio que causa imunodeficiência em macacos (CHAKRABARTI et al., 1987; GUYADER et al., 1987). Subsequentemente, outros vírus semelhantes ao HIV foram apontados como causadores da imunodeficiência símia, denominados de Vírus da Imunodeficiência Símia, em primatas africanos de diversas linhagens (HUET et al., 1990). Embora a origem do vírus não seja totalmente conhecida, essas informações serviram para evidenciar que a aids em humanos e primatas pode ter surgido como um resultado de infecções cruzadas entre primatas de variadas espécies (SHARP et al., 1994).

A aids em seres humanos pode ser causada pelo HIV, que pode ser transmitido por contato sexual, percutâneo e transmissão vertical (COHEN et al., 2011; HLADIK; MCEL RATH, 2008); todavia, de acordo com a literatura, a transmissão sexual é a principal forma, podendo chegar a 80% dos casos entre adultos expostos (COHEN et al., 2011; HLADIK; MCEL RATH, 2008). Estatísticas globais apontam que, até o final do primeiro semestre de 2019, uma média de 37,9 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com o HIV, entre elas 36,2 milhões de adultos e 1,7 milhão de crianças (menores de 15 anos) o estudo ainda relata

que em média 32 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas ao HIV desde o início da pandemia da aids (UNAIDS, 2019).

No Brasil, a infecção pelo HIV e a aids fazem parte da Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças (Portaria de Consolidação MS/GM nº 4, de 28 de setembro de 2017), sendo a aids de notificação compulsória desde 1986 e o HIV desde 2014; sendo assim, quando os casos são diagnosticados é necessário que sejam reportados às autoridades de saúde. Em 2018, foram diagnosticados 43.941 novos casos de HIV e 37.161 casos de aids, totalizando, 966.058 casos de aids detectados no país no período de 1980 a junho de 2019. Desde o princípio da epidemia de aids nos anos 80 até 31 de dezembro de 2018, 338.905 óbitos foram notificados no Brasil, tendo o HIV/aids como causa básica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Embora o avanço da tecnologia e de terapias específicas tenha diminuído a mortalidade relacionada à aids, o tratamento não é acessível financeiramente em todos os países. O programa brasileiro de assistência às pessoas vivendo com HIV/aids é referência mundial, e existe distribuição governamental gratuita do tratamento desde a década de 90. Atualmente, não existe um tratamento curativo e as perspectivas em relação a uma vacina eficaz são incertas, dessa forma, a aids representa um problema de saúde pública há décadas (BAROUCH, 2008; RICHMAN et al., 2009; UNAIDS, 2019).

1.5 COINFECÇÃO *Sporothrix* spp./HIV

Desde o início da pandemia do HIV, já em 1985, foi evidenciado o caráter oportunista que *S. schenckii* poderia assumir nos pacientes com esse vírus (AL-TAWFIQ; WOOLS, 1998; KEISER; WHITTLE, 1991), todavia não há riqueza de informações em relação à coinfeção *Sporothrix* spp./HIV na literatura. Entretanto, com base em revisão sistemática, acredita-se que a coinfeção seja responsável por formas mais graves e disseminadas da esporotricose (MOREIRA; FREITAS; LAMAS, 2015). A incidência da esporotricose em pacientes com HIV tem aumentado de forma substancial na atual hiperendemia do Rio de Janeiro e acredita-se que esse aumento acompanhe o crescente número de casos da própria esporotricose (FREITAS et al., 2014).

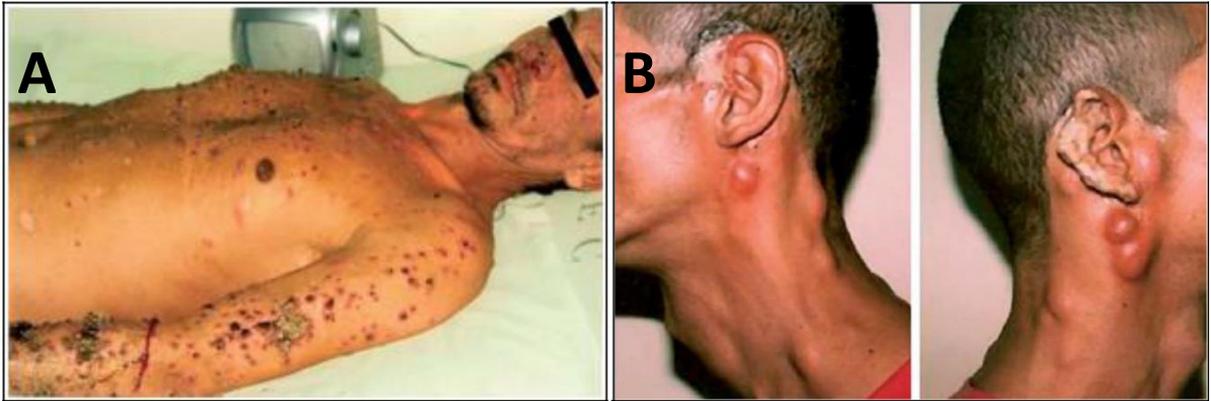
Um estudo englobando uma amostra histórica do INI (1987-2013), no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) com 48 pacientes com esporotricose e coinfeção por HIV e 3.570 pacientes com esporotricose, demonstrou que o HIV modifica claramente a história natural da esporotricose e está associado a um amplo espectro desta micose, com uma incidência muito maior de casos disseminados graves, número

de hospitalizações e mortes. Além das formas clássicas, acometimento de mucosas, meningoencefalite subaguda e hidrocefalia, assim como acometimento osteoarticular foram observados. É notável que 47,9% dos pacientes tenham sido diagnosticados com as duas infecções simultaneamente, devido à presença de esporotricose oportunística ou outra condição relacionada ao HIV (FREITAS et al., 2014).

Observou-se que esses pacientes eram mais vulneráveis a desenvolver esporotricose disseminada, necessitar de hospitalizações, além de evoluir a óbito. Durante esse período foi possível verificar um aumento substancial e constante de casos de coinfeção, com níveis próximos ou superiores aos de outras infecções oportunistas como criptococose e histoplasmoses (FREITAS et al., 2014). Tal tendência foi consolidada em estudo recente, em que foram analisadas 118 hospitalizações de 75 pacientes no INI, além de 11 óbitos relacionados à esporotricose. A coinfeção com HIV ocorreu em 71 pacientes da coorte institucional de esporotricose até o ano de 2015, sendo que estes pacientes coinfectados representaram 38,7% dos pacientes com esporotricose que hospitalizaram (29/75 casos) e 54,5% dos óbitos associados à esporotricose (6/11 casos) (FALCÃO et al., 2020).

Dentro do amplo espectro clínico da esporotricose, os pacientes infectados com HIV, porém com boa adesão ao tratamento e sem aids, tendem a apresentar as formas brandas e localizadas, como formas fixas ou linfocutânea, semelhante ao observado em indivíduos imunocompetentes, reiterando o controle imunológico que a atual gama de antirretrovirais proporciona. Em contrapartida, formas cutâneas disseminadas (**Figura 7**), osteoartrite, lesões associadas à mucosa, meningoencefalite, dentre outras complicações, foram observadas em pacientes com aids. Em alguns relatos clínicos, a esporotricose foi apontada, inclusive, como manifestação inicial da aids em alguns pacientes (FREITAS et al., 2012; NETO et al., 1999).

Figura 7: Esporotricose em paciente com aids



Legenda: Pacientes do sexo masculino com aids e esporotricose. A) Múltiplas lesões cutâneas por disseminação hematogênica em paciente com contagem de linfócitos T CD4⁺ de 22 células/ μ l. B) Acometimento de linfonodos da cadeia cervical bilateralmente, com destruição parcial do pavilhão auricular direito em paciente com contagem de linfócitos T CD4⁺ de 212 células/ μ l. Fonte: FREITAS et al., 2012.

2 JUSTIFICATIVA

A coinfeção pelo HIV apresenta um impacto direto negativo na evolução da esporotricose (MOREIRA; FREITAS; LAMAS, 2015). Nos últimos anos, no Rio de Janeiro, a esporotricose entre os pacientes com infecção pelo HIV tem aumentado, diferente da estabilização do número de micoses oportunistas clássicas, como histoplasmose e criptococose (RAMOS-E-SILVA et al., 2012), muito propiciada pelo uso da terapia antirretroviral. O primeiro caso de esporotricose e coinfeção por HIV diagnosticado no INI em 1999 coincide com o surgimento da esporotricose como uma questão de saúde pública nesse estado (FREITAS et al., 2014). Desde então, o aumento do número de pacientes com essa coinfeção foi aproximadamente proporcional ao aumento global de casos de esporotricose ao longo do tempo.

Outro aspecto a ser considerado, é a capacidade de incremento de virulência de *S. brasiliensis in vivo*, como demonstrado em paciente com esporotricose disseminada de 11 anos de evolução e sem infecção por HIV. Os autores atribuíram este diferencial fenotípico a uma capacidade de evadir do sistema imune mantendo a infecção ao longo de todos estes anos, apesar da sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos utilizados testados. É possível que outros fatores, não estudados até então, também contribuam para esta maior virulência (FREITAS et al., 2015a). Ainda não é sabida a frequência de tal evento em pacientes com esporotricose crônica e refratária, tampouco em pacientes com aids, já que o estudo citado acima foi um estudo de caso isolado. Outro estudo demonstrou que *S. brasiliensis* pode possuir certa estabilidade frente a antifúngicos, porém apenas um isolado de um paciente coinfectado com *Sporothrix* e HIV foi estudado (ALMEIDA PAES et al., 2016).

Hoje, a esporotricose associada à infecção pelo HIV é uma doença emergente no Rio de Janeiro, impulsionada pelas mudanças epidemiológicas ocorridas nas duas últimas décadas e com grande morbidade e mortalidade. Desta forma, considerando que a associação esporotricose/aids modifica a história natural da doença e que *S. brasiliensis*, a principal espécie no estado do Rio de Janeiro, é capaz de modificar sua virulência durante a infecção, existe a hipótese de que um quadro semelhante possa ocorrer em pacientes com esporotricose disseminada de evolução crônica e aids. O estudo de aspectos clínicos e fatores fenotípicos e genotípicos do fungo permitirá esclarecer questões relacionadas a sua biologia e sua participação no processo infeccioso. Os resultados podem ser elucidativos no entendimento dos diferentes comportamentos clínicos, norteados prognósticos e sinalizando possíveis intervenções terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar isolados sequenciais de *Sporothrix* spp. obtidos de pacientes com esporotricose e aids, a fim de detectar possíveis aumentos de virulência e aquisição de resistência a antifúngicos durante o curso crônico da esporotricose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar molecularmente os isolados sequenciais de *Sporothrix* spp. obtidos de espécimes clínicos de 5 pacientes com aids e esporotricose.
- Detectar a suscetibilidade antifúngica dos isolados de *Sporothrix* spp., associando com a resposta dos pacientes ao tratamento.
- Caracterizar fatores de virulência de isolados de *Sporothrix* spp. de pacientes com aids nas formas disseminadas da esporotricose.
- Comparar os fatores de virulência de múltiplos isolados de *Sporothrix* spp., coletados em tempos distintos de pacientes com aids.
- Correlacionar os achados fenotípicos dos isolados com as características clínicas dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES E DADOS CLÍNICOS

O estudo possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INI, sob o número: CAAE: 03955818.8.0000.5262.

Para selecionar os pacientes a serem incluídos no estudo e terem seus respectivos isolados de *Sporothrix* spp. avaliados nas metodologias propostas, foi realizada uma triagem no banco de dados do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatologia Infecciosa, contendo dados de pacientes acompanhados no INI entre os anos de 1999 a 2018, com diagnóstico de infecção por HIV e esporotricose disseminada. A partir dessa lista, utilizou-se o Sistema de Prontuário Eletrônico do Paciente do INI a fim de verificar se os mesmos atendiam aos seguintes critérios de inclusão: diagnóstico micológico de esporotricose, com no mínimo três isolados de *Sporothrix* spp. obtidos em cultura em um intervalo mínimo de um ano entre o primeiro e último isolamento, diagnóstico de infecção pelo HIV conforme as recomendações do Ministério da Saúde e esporotricose de evolução crônica, definida neste estudo como pelo menos um ano de tratamento específico para a micose, sem cura. Foram excluídos os pacientes que atenderam os critérios de inclusão listados acima, porém cujos isolados fúngicos não se encontravam viáveis no momento do estudo.

As variáveis de interesse do estudo incluíram: sociodemográficas (idade, sexo, município de residência e ocupação), epidemiológicas (contato com gato, terra ou planta e história de trauma), clínico-evolutivas (ano do diagnóstico da esporotricose, ano do diagnóstico da infecção por HIV, tempo de evolução da esporotricose, forma clínica da esporotricose, outras comorbidades, tipo de tratamento e tempo de tratamento) e laboratoriais (contagem de CD4 e carga viral, data da coleta do isolado de *Sporothrix* spp., resultado de sorologia anti-*Sporothrix* spp. (ALMEIDA-PAES et al., 2007), realizada utilizando exoantígenos de forma filamentosa do fungo).

4.2 CEPAS DE REFERÊNCIA

Para o presente trabalho foram utilizadas, como controle, as cepas *S. brasiliensis* (IPEC 16490), *S. schenckii* (IPEC 36275) e *S. globosa* (IPEC 27135), previamente identificadas por sequenciamento parcial do gene da calmodulina no INI-Fiocruz, como controle para identificação molecular com primer específico. Para os testes relacionados aos fatores de

virulência, foram utilizadas as cepas *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC H99). Para os testes de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos, foram utilizadas as cepas *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) e *Aspergillus fumigatus* (ATCC 3626), como controle de qualidade do teste.

4.3 ISOLADOS CLÍNICOS

Para realização das metodologias propostas, foram recuperados isolados clínicos (**Apêndice A**), oriundos dos pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão acima descritos. Os fungos incluídos nesse estudo foram isolados por metodologias convencionais de diagnóstico, adotada pelo Laboratório de Micologia do INI/Fiocruz e mantidos sob refrigeração a -20 °C desde a data do isolamento até a realização dos testes descritos a seguir.

4.4 REISOLAMENTO

Os isolados de *Sporothrix* spp. criopreservados no Laboratório de Micologia do INI foram semeados em meio PDA (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) em tubos de ensaio com tampa de rosca (20 × 200 mm) e incubados por sete dias em estufa (Nova Ética, Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) a 25 °C. Após esse período, foi realizado novo estriamento a partir dos tubos citados acima para placas de Petri (90 mm) de poliestireno (Plast Labor, Brasil) contendo meio BHI (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA), que foram incubadas em estufa a 35 °C por sete dias. A partir dessa cultura, foi feito isolamento de colônia única, a qual foi usada para o preparo da massa celular, também em meio BHI a 35 °C, utilizada em todos os experimentos a seguir.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Os isolados recuperados foram semeados em placas de Petri contendo meio PDA, e incubados por sete dias a 25 °C. A massa fúngica crescida em toda a superfície da placa foi recolhida com auxílio de alça de platina, acrescida de 650 µl de tampão de lise (SDS 0,5%, NaCl 1,4%, EDTA 0,73% e Tris-HCl 1M) sendo realizada maceração dos filamentos depositados e congelados com nitrogênio líquido, com auxílio de gral e pistilo.

O produto resultante desse processo foi transferido para um tubo estéril de microcentrífuga. Em seguida, foram adicionados 5 µl de β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich®, Steinheim, Germany) e agitou-se em vórtex (Prolab, SP, Brasil) por um minuto. O material foi incubado por 60 minutos a 65 °C, com agitação a cada 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (v:v:v 25:24:1) (Fluka Analytical, Sigma–Aldrich, St Louis, USA). Para obtenção de uma suspensão homogênea, a amostra foi agitada no vórtex e em seguida centrifugada a 18.440 g, por 15 minutos em microcentrífuga (Eppendorf, Hamburg, Germany) modelo 5424. Em seguida, o sobrenadante foi removido com pipeta Pasteur e inserido em novo tubo estéril de microcentrífuga. Um mililitro de isopropanol (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) foi adicionado ao sobrenadante retirado anteriormente e esta mistura foi homogeneizada. O DNA precipitado foi deixado em repouso por 24 horas em temperatura de -20 °C e, após esse período, foi centrifugado novamente a 4 °C (Eppendorf 5430R), 18.440 g, por 15 minutos. Logo em seguida, toda a fase líquida foi retirada com o auxílio de pipeta Pasteur. O precipitado foi lavado com etanol 70% (500 µl) e centrifugado a 18.440 g por 15 minutos. A fase líquida foi removida com pipeta Pasteur, obtendo assim o precipitado que foi ressuspenso em 100 µl de água livre de DNase. Após a finalização desse processo, o DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) (FERRER et al., 2001).

4.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para a identificação molecular, foi realizada uma PCR, tendo como alvo a região parcial do gene da calmodulina (*CAL*). A reação utiliza pares de iniciadores específicos para as espécies mais patogênicas do gênero: *S. globosa*, *S. schenckii*, *S. brasiliensis* (RODRIGUES et al., 2015).

Foram utilizados, para identificação, os iniciadores específicos para os três principais agentes etiológicos da esporotricose (*S. brasiliensis* Sbra-F 5'-CCC CCG TTT GAC GCT TGG-3', Sbra-R 5'-CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT-3'; *S. schenckii* Ssch-F 5'-TTT CGA ATG CGT TCG GCT GG-3', Ssch-R 5'-CTC CAG ATC ACC GTG TCA-3' e *S. globosa* Sglo-F 5'-CGC CTA GGC CAG ATC ACC ACT AAG-3', Sglo-R 5'-CCA ATG TCT ACC CGT GCT-3'). As reações foram realizadas utilizando 3 mM de MgCl₂, 400 mM de cada dNTP (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), 50 U/ml de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™, MO, EUA), 1 µl de cada iniciador específico na concentração de 10 pmol/µl e 1 µl do DNA

genômico fúngico a uma concentração de 100 ng/μl. Todas as reações foram realizadas em volume final de 25 μl em um termociclador (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler).

Para a amplificação das regiões específicas de cada espécie foi realizada a técnica de touchdown PCR, a qual é comum a todas as espécies sendo obedecidas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 1 minuto à temperatura de hibridização (primeiro ciclo a 70 °C com redução subsequente da temperatura de 1 °C a cada 2 ciclos pelos próximos 20 ciclos, finalizando os 15 ciclos restantes a uma temperatura de 60 °C) e 1 minuto a 72 °C, seguidos de uma extensão final a 72 °C por 10 minutos (RODRIGUES et al., 2015).

Para visualização do fragmento amplificado, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1%, a 100 V por aproximadamente 1 hora. O DNA presente no gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μg/ml) e os fragmentos amplificados (Ssch 331bp, Sbra 469bp, Sglo 243bp) foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta a 280 nm, com auxílio de um transiluminador (Labnet International, Inc, NJ, EUA). O tamanho das bandas foi estimado de acordo com o padrão de peso molecular de 1 kb Plus (Invitrogen).

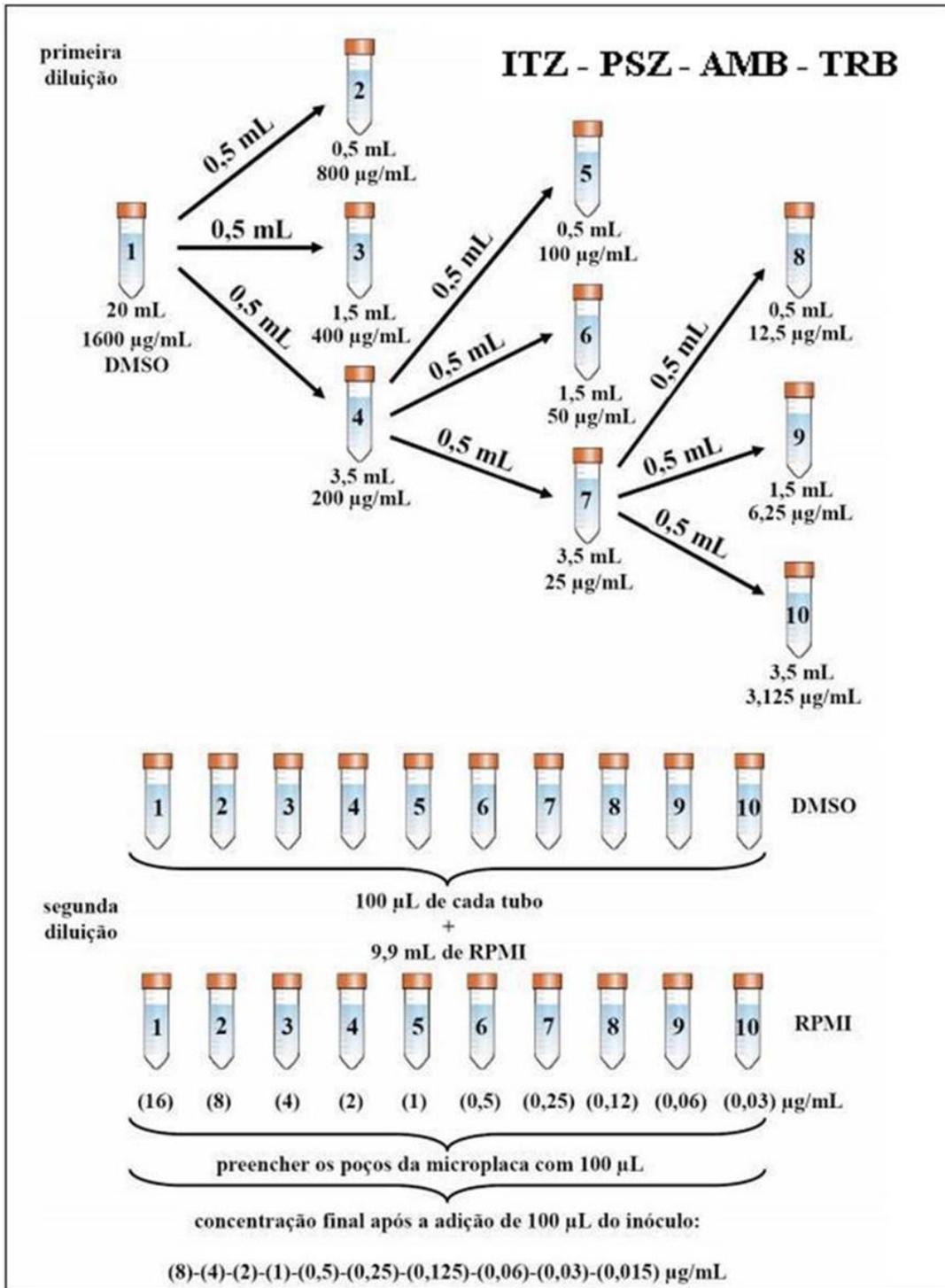
4.7 ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os isolados incluídos neste estudo foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo seguindo o protocolo preconizado pelo CLSI, M38-A2 (CLSI, 2008a) para fungos filamentosos e M27-A3 (CLSI, 2008b) para leveduras, com algumas modificações.

4.8 PREPARO DAS MICROPLACAS

Os fármacos testados foram anfotericina B (AMB), itraconazol (ITZ), posaconazol (PSZ) e terbinafina (TRB) (Sigma-Aldrich). A diluição das soluções-estoque dos antifúngicos foi realizada em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na concentração de 1.600 μg/ml. Em seguida, estas soluções passaram por filtração em membrana de poro 0,22 μm e foram estocadas a -20 °C em tubos cônicos estéreis até o momento do uso. Foi utilizado meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio) (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA), tamponado com 0,165 M de ácido 3-N morfolino propanossulfônico (MOPS) P. A. (Vetec Química Fina Ltda), pH 7,0 e esterilizado por filtração, com membrana de poro 0,22 μm. A partir da solução estoque de cada antifúngico foram preparadas 10 diferentes diluições seriadas (**Figura 8**).

Figura 8: Esquema de diluição de fármacos antifúngicos.



Legenda: Anfotericina B (AMB), itraconazol (ITZ), terbinafina (TRB), posaconazol (PSZ), pelo método de microdiluição em caldo pelo CLSI (M38-A2). DMSO = dimetilsulfóxido; RPMI = meio Roswell Park Memorial Institute 1640. Fonte: Coelho, 2017.

Utilizou-se uma placa de poliestireno de 96 poços com fundo em U (Jet Biofil, Guangdong, China), na qual os poços da coluna 01 foram preenchidos com 200 µl de RPMI-1640 para controle de esterilidade e os poços da coluna 12 foram preenchidos com 100 µl de

RPMI-1640 com DMSO 0,2% para controle de crescimento fúngico. Os poços entre as colunas 2 e 11 foram preenchidos com alíquotas de 100 µl das 10 diluições seriadas do antifúngico, sendo uma diferente diluição aplicada em cada coluna. A faixa de concentração dos fármacos foi de 0,0313 a 16 µg/ml. Ao término do plaqueamento, as placas de antifúngicos foram devidamente identificadas, fechadas e embaladas com filme PVC, exceto as placas de AMB, que é um fármaco fotossensível, sendo embaladas com papel alumínio e mantidas a -20 °C.

4.9 PREPARO DO INÓCULO E LEITURA DOS RESULTADOS

Para obtenção do inóculo dos isolados foram realizadas culturas em meio PDA e BHI, incubadas a 35 °C, durante sete dias para obtenção do inóculo filamentoso e leveduriforme respectivamente. Em seguida, foi realizada uma suspensão celular de cada cepa em suas diferentes morfologias para o padrão 0,5 da escala de McFarland. Foram realizadas diluições em RPMI-1640 para a produção de uma concentração entre $0,4 \times 10^4$ e 5×10^4 unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml). Para a realização dos testes, as placas foram retiradas do freezer com antecedência mínima de 35 minutos. Após atingirem seu estado líquido, 100 µl de cada isolado diluído em RPMI-1640 foram inoculados nos poços das placas entre as colunas 2 e 12, um isolado por linha, sendo utilizadas as linhas A-F para os isolados de *Sporothrix* spp. e as linhas G e H para as cepas-controle (*A. fumigatus* e *A. flavus* para as placas contendo inóculos da forma filamentosa e *C. krusei* e *C. parapsilosis* para as placas contendo inóculos da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.), reduzindo à metade as diferentes concentrações de antifúngico, e também a concentração do inóculo. As placas foram fechadas e incubadas a 35 °C por até 72 horas para leitura dos resultados. A leitura foi realizada de forma visual, os resultados foram analisados de acordo com descritos nos protocolos M38-A2 (CLSI, 2008a) e M27-A3 (CLSI, 2008b), para determinação da concentração inibitória mínima CIM, que foi determinada como a menor concentração do antifúngico que inibiu o crescimento total do fungo. Os resultados de CIM da forma filamentosa foram interpretados de acordo com os pontos de corte epidemiológico definido previamente (ESPINEL-INGROFF et al 2017).

4.10 ANÁLISE DE POSSÍVEIS FATORES ENVOLVIDOS COM A VIRULÊNCIA

4.10.1 Teste de termotolerância

Preparou-se o inóculo por meio da suspensão celular em escala de McFarland 0,5 (1×10^6 células/ml) utilizando o equipamento IVD Densichek Plus VITEK Optical (BIOMÉRIEUX SA, NC, EUA) de todos os isolados na sua forma leveduriforme, separadamente. Em seguida, alíquotas de 5 μ l da suspensão celular foram inoculadas pontualmente em triplicata em duas placas de Petri (90 mm) contendo meio PDA e incubados em estufas com temperatura de 25 °C e 35 °C, uma placa a cada temperatura, pelo período total de sete dias (FREITAS et al., 2015a). Ao fim do período de incubação, o diâmetro das colônias foi medido em milímetros com auxílio de uma régua e posteriormente foi realizado o cálculo do percentual de inibição de crescimento (%IC), utilizando a fórmula demonstrada a seguir:

$$\%IC = \frac{D_{25} - D_{35}}{D_{25}} \times 100$$

Onde, D_{25} corresponde ao diâmetro da colônia a 25 °C e D_{35} corresponde ao diâmetro da colônia a 35 °C (BOECHAT et al., 2018). A termotolerância de cada isolado foi classificada neste estudo de acordo com a tabela 1:

Tabela 1: Classificação de termotolerância dos isolados de *Sporothrix brasiliensis* após 7 dias de crescimento em ágar batata dextrose (PDA).

Inibição do crescimento do isolado	Classificação
De 0 a 33%	Alta termotolerância
De 34 a 65%	Moderada termotolerância
De 66 a 100%	Baixa termotolerância

Legenda: Valores de referência quanto a termotolerância para a classificação de cada isolado.

4.10.2 Resistência ao estresse nitrosativo

A massa leveduriforme com 7 dias de crescimento foi retirada com auxílio de alça descartável, depositada em tubo cônico estéril, lavada com solução salina tamponada com fosfato - PBS (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH_2PO_4 , 1,2 g/l Na_2HPO_4) e centrifugada a

12.800 g por 10 minutos (Eppendorf 5804R), sendo o processo de lavagem repetido por três vezes. Em seguida foi realizada uma suspensão celular em escala de McFarland 0,5 (1×10^6 células/ml) (BIOMÉRIEUX IVD Densichek Plus VITEK Optical) com solução de radicais de nitrogênio quimicamente gerados (0,5 mM NaNO_2 , 25 mM ácido succínico, pH 4,0). Foram realizadas quatro diluições seriadas em base 10 com intervalos de 0, 1, 2 e 3 horas. Após os intervalos, as células foram plaqueadas em meio BHI (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e incubadas por sete dias em estufa a 35 °C. A viabilidade foi medida pela contagem do número de unidades formadoras de colônia. Alíquotas de células não incubadas com a solução de radicais de nitrogênio foram utilizadas como controle e a taxa de sobrevivência foi calculada pela razão do número de colônias resultantes após os diversos tempos de tratamento com a solução e o número de colônias da suspensão-controle (ALMEIDA-PAES et al., 2012).

4.10.3 Resistência ao estresse oxidativo

O teste foi realizado por semeadura em profundidade (*Pour Plate*) (SILVA, 1999), com algumas modificações.

Os isolados foram cultivados por sete dias em meio BHI em estufa a 35 °C. Utilizou-se 57,5 ml do meio líquido BHI (Difco, Becton Dickinson and Company, USA), devidamente autoclavado e resfriado a 50 °C. Posteriormente, foi realizada uma suspensão celular equivalente a 0,5 na escala McFarland em 2,5 ml em solução 0,45% de NaCl. Essa suspensão foi adicionada ao fundo de uma placa de Petri (15X150 mm), sendo o volume de BHI dispensado na placa e agitado delicadamente para obtenção de um meio homogêneo. Após a solidificação do mesmo, foram feitos 4 poços de 5 mm de diâmetro e distribuídos de maneira equidistante em cada placa. Em cada poço, foram aplicados 65 μl de H_2O_2 a 5% (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Foi realizada a avaliação de resistência ao estresse oxidativo por meio da mensuração do diâmetro do halo de inibição de crescimento formado ao redor de cada poço, com auxílio de régua milimetrada, após sete dias de incubação a 35 °C.

4.10.4 Produção de urease

Para um volume final de 2 ml de caldo ureia de Christensen (peptona 0,1%, NaCl 0,5%, KH_2PO_4 0,2%, ureia 2%, glicose 0,1%, vermelho de fenol 0,0016%) foram adicionados 200 μl de uma suspensão celular equivalente a 0,5 McFarland. A suspensão celular de leveduras em

caldo de ureia de Christensen foi incubada em estufa a 35 °C. Ao final de sete dias, foi realizada centrifugação a 10.000 g por 10 minutos em centrífuga (Eppendorf 5804R), 100 µl do sobrenadante foram transferidos em triplicata para placa estéril de poliestireno de 96 poços com fundo plano (Jet Biofil, Guangdong, China). A absorbância do teste foi obtida por meio de espectrofotometria no comprimento de onda de 559 nm utilizando espectrofotômetro Epoch (Biotek Instruments) (ALMEIDA PAES et al., 2015).

4.11 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM MEIO SÓLIDO

Inicialmente, todas as leveduras foram crescidas em meio BHI (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA), em estufa com temperatura de 35 °C pelo período de 7 dias. A atividade das enzimas foi mensurada em placas de Petri (90 mm) contendo meio específico para cada enzima a ser testada.

4.11.1 Preparo dos inóculos

Foi realizada a suspensão celular em escala de McFarland 0,5 (1×10^6 leveduras/ml). Alíquotas de 5 µl da suspensão celular de leveduras foram inoculadas pontualmente em triplicata na superfície de cada meio e as placas foram incubadas por sete dias em estufa a 35°C. As amostras positivas apresentam um halo ao redor de sua colônia (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2017). Todos os testes foram realizados no mínimo duas vezes para confirmação de resultados.

4.11.2 Atividade da aspártico-protease

Preparou-se meio Agar albumina [contendo 1,17% de meio base de carbono para leveduras e Agar 1,5% (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA)] que foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos, esfriado a 50 °C e então suplementado com 0,2% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma–Aldrich, St Louis, USA), pH 4,0, filtrada previamente em filtro com membrana de 0,22 µm (RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982).

4.11.3 Atividade hemolítica

Foi utilizado meio comercial Agar Sangue de Carneiro a 5% (PlastLabor, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em placa de Petri de 90 mm (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2017).

4.11.4 Atividade da fitase

O meio utilizado para determinar a atividade de Fitase (hexafosfato de mio-inositol fosfo-hidrolase) foi o Agar Fitato de Cálcio [produzido a partir de 1% de glicose; 0,05% (NH₄)₂SO₄; 0,02% KCl; 0,01% MgSO₄.7 H₂O; 0,0005% MnSO₄; 0,0005% FeSO₄ (Sigma–Aldrich, St Louis, USA); 0,2% fitato de cálcio; 0,05% extrato de levedura; 1,5% agar, pH 7,0] (TSANG, 2011). Para o meio ser plaqueado foi necessária uma agitação constante do mesmo para que a distribuição fosse uniforme, já que o fitato não é solúvel.

4.11.5 Atividade da fosfolipase

Utilizou-se o meio Agar Gema de Ovo, composto de 2% de glicose (Sigma–Aldrich, St Louis, USA); 1% peptona; 0,5% extrato de levedura (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA); 4% NaCl; 0,074% CaCl₂ (Sigma–Aldrich, St Louis, USA); 1,5% Agar (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA). O meio foi autoclavado em uma temperatura de 121 °C por 15 minutos, posteriormente foi resfriado a 60 °C, em seguida 8% da emulsão da gema de ovo orgânico foi adicionado ao meio com pH 7,0 (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

4.11.6 Atividade de esterase

A atividade de esterase foi avaliada a partir da utilização do meio Agar Tween (1% peptona; 0,5% extrato de levedura; 0,01% CaCl₂; 1,5% agar); autoclavado a 121 °C por 15 minutos e resfriado a 50 °C para a adição de 0,1% Tween 80 (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) estéril, pH 7,0 (AKTAS; YIGIT; AYYILDIZ, 2002).

4.11.7 Interpretação dos resultados de atividade enzimática em meio sólido

As colônias tiveram seu diâmetro (a) e o diâmetro da colônia mais o halo de precipitação (b) medidos com régua milimetrada. A expressão de cada atividade enzimática foi realizada por meio do valor de Pz ($Pz=a/b$), os quais foram classificados em quatro categorias, como mostra a tabela 2:

Tabela 2: Classificação de atividade enzimática.

Pz	Classificação
1	Atividade enzimática negativa
0,70 a 0,99	Atividade enzimática baixa
0,40 a 0,699	Atividade enzimática moderada
Menor que 0,399	Atividade enzimática alta

Fonte: Price, Wilkinson e Gentry (1982)

4.12 PLASTICIDADE METABÓLICA

Foi avaliado o crescimento de todos os isolados clínicos na presença de glicose, lactato e GlcNAc. Um inóculo inicial de 0,5 McFarland foi preparado em meio base de nitrogênio para leveduras (Difco, Becton-Dickinson e Company, EUA) suplementado com 0,5% de cada fonte de carbono acima mencionada (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Alíquotas de 100 µl foram inoculadas em triplicata em placas de 96 poços de fundo plano e incubadas a 35 °C por sete dias. A densidade óptica dos poços a 530 nm foi medida em espectrofotômetro (EspectraMax Plus 384, Califórnia, EUA) a cada 24 horas durante o período de incubação para a construção de curvas de crescimento.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos foram inseridos em bancos de dados próprios para análise posterior no software GraphPad Prism 7.0. Testes não paramétricos (por ex., Kruskal-Wallis, Kaplan-Meier e Log-rank) foram usados, com *p*-valor menor que 0,05 para apuração da significância. Outros testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados conforme adequação e necessidade nas diferentes análises e comparações. Os achados dos experimentos foram confrontados com variáveis clínicas (data do isolado, tempo de evolução da esporotricose e espécime clínico de obtenção do isolado), imunoviológicas (contagem de linfócitos T CD4+, T CD8+, carga viral e título de anticorpos anti-*Sporothrix* spp.) e terapêuticas (fármacos

utilizados), objetivando encontrar correlações entre os fenótipos dos isolados fúngicos e aspectos clínicos dos pacientes estudados.

5 RESULTADOS

5.1 PACIENTES E ISOLADOS CLÍNICOS

Foram incluídos cinco pacientes, quatro do sexo masculino e uma do sexo feminino, todos possuíam históricos semelhantes em relação a abandono de tratamento antirretroviral e antifúngico, múltiplas internações, melhora do quadro geral durante a internação e acentuada piora após alguns meses de alta hospitalar. Apenas o paciente 2 segue em tratamento, enquanto os demais evoluíram a óbito. Apenas o paciente 3 teve diagnóstico da infecção pelo HIV previamente ao diagnóstico da esporotricose. Após utilização da técnica de ELISA, constatou-se que todos, exceto o paciente 2, não apresentaram níveis detectáveis de anticorpos IgG anti-*Sporothrix* no soro. Todos passaram por esquemas terapêuticos para a esporotricose, envolvendo anfotericina B, itraconazol e terbinafina. As características demográficas e epidemiológicas dos pacientes estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Características sociodemográficas e clínico-epidemiológicas dos pacientes estudados

Paciente	Sexo	Idade no diagnóstico da esporotricose	Município	Ocupação	Ano de diagnóstico do HIV	Ano do diagnóstico da esporotricose	História	Desfecho clínico
1	M	45	Nova Iguaçu	Pedreiro	2011	2011	Contato com gato	Falecido (2013)
2	M	37	Rio de Janeiro	Cabeleireiro	2011	2011	Mordedura por gato	Em acompanhamento
3	M	38	Rio de Janeiro	Mecânico	2005	2016	Contato com gato	Falecido (2018)
4	M	25	Magé	Gari/Servente	2012	2012	Não determinada	Falecido (2015)
5	F	20	Campos dos Goytacazes	Estudante	2012	2012	Contato com gato	Falecida (2014)

Legenda: M: masculino; F: feminino; HIV: vírus da imunodeficiência humana.

5.2 ISOLADOS INCLUÍDOS NO ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Os dados dos isolados estudados e dos exames laboratoriais referentes ao status imunoviológico dos pacientes no momento de cada isolamento estão descritos na tabela 4, para os experimentos a seguir essa sequência de isolados foi obedecida.

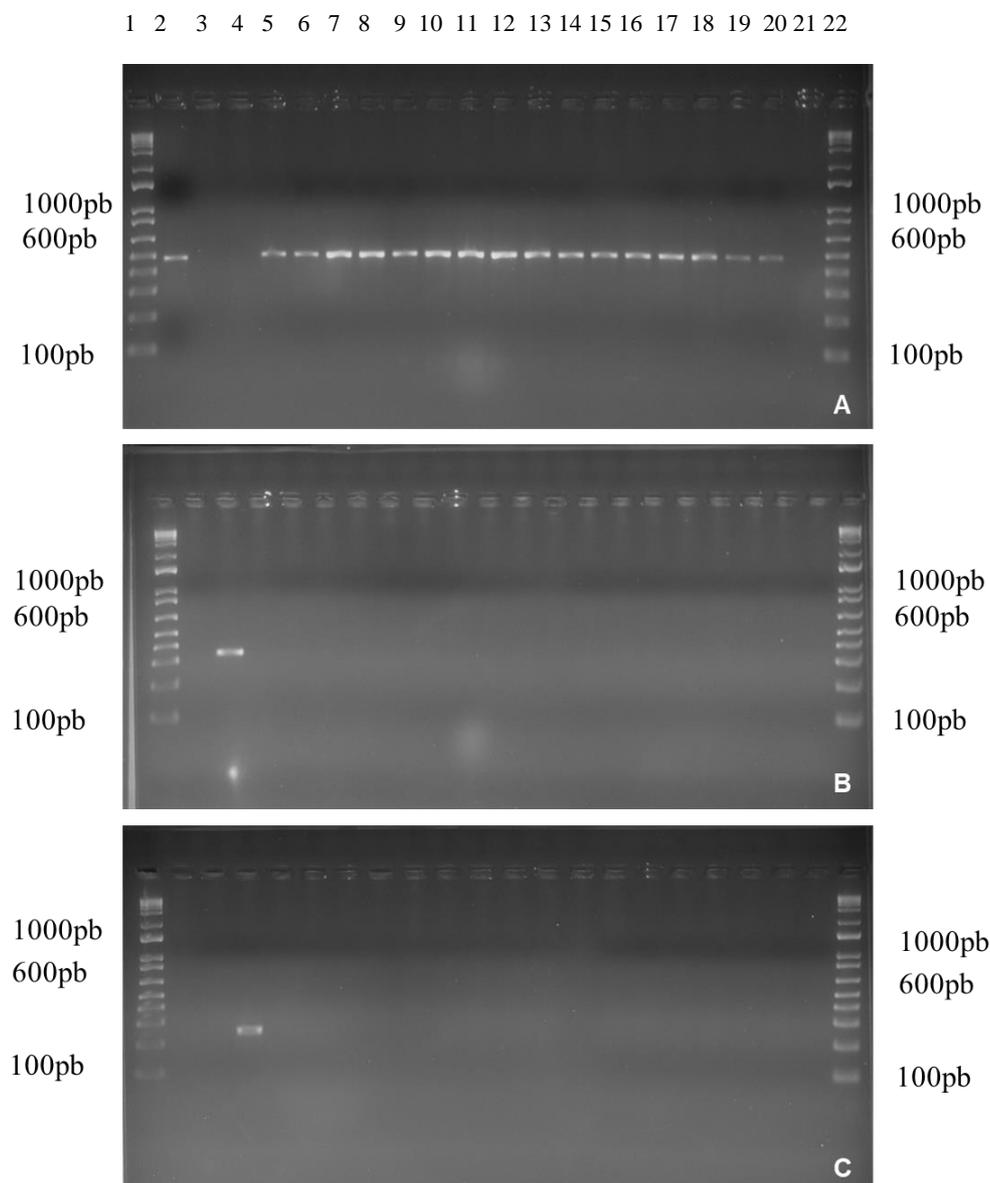
Tabela 4: Origem dos isolados incluídos no estudo e status imunoviológico de cada paciente no período de isolamento.

Paciente	Número do isolado	Data de isolamento	Espécime clínico	T CD4	T CD8	CV
1	41932	08/08/2011	Exsudato de lesão	46	545	104.290
	44886	15/10/2012	Líquor	204	1.967	194
	45308	21/12/2012	Líquor	55	595	<50
2	654H	02/09/2011	Sangue periférico	66	292	423.153
	42235	19/09/2011	“Swab” de orofaringe	66	292	423.153
	45030	05/11/2012	Biópsia de lesão de pele	127	506	<50
3	49240	16/11/2016	Biópsia de lesão de pele	53	1.486	174.603
	49263	24/12/2016	Biópsia de lesão de pele	95	925	<50
	49413	17/01/2017	Líquor	95	925	<50
	50661	28/03/2018	Exsudato de lesão	13	759	61.948
4	43723	04/05/2012	Aspirado de medula óssea	25	325	66.989
	47418	11/06/2014	Biópsia de laringe	80	482	<50
	48294	10/12/2015	Urina	34	406	<50
5	43987-1	14/06/2012	Exsudato de lesão	111	605	82
	44022	20/06/2012	Escarro induzido	51	341	<50
	46670	23/07/2013	Escarro	304	1.510	<50

Legenda: CD4⁺ = Contagem de linfócitos TCD4⁺ por ml. CD8 = Contagem de linfócitos TCD8⁺ por ml. CV = Carga viral em cópias por ml

A partir desses 5 pacientes obteve-se 16 isolados clínicos que foram identificados molecularmente como *S. brasiliensis* (**Figura 9**).

Figura 9: Identificação molecular dos isolados estudados



Legenda: Reação realizada com primers específicos para (A) *S. brasiliensis*, (B) *S. schenckii* e (C) *S. globosa*. Poço 1. Peso molecular 1kb plus – Poço 2. Controle de *S. brasiliensis* IPEC 16490. Poço 3. Controle de *S. schenckii* IPEC 36275- Poço 4. Controle de *S. globosa* IPEC 27135. Paciente 1- Poço 5-7-. 41932 (isolado 1), 44886 (isolado 2), 45308 (isolado 3). Paciente 2- Poço 8-10-. 654h (isolado 1), 42235 (isolado 2), 45030 (isolado 3). Paciente 3- Poço 11-14- 49240 (isolado 1), 49263 (isolado 2), 49413 (isolado 3), 50661 (isolado 4). Paciente 4- Poço 15-17- 43723 (isolado 1), 47418 (isolado 2), 48294 (isolado 3). Paciente 5- Poço 18-20- 43987-1 (isolado 1), 44022 (isolado 2), 46670 (isolado 3). Poço 21. Controle negativo– Poço 22. Peso molecular 1kb plus.

5.3 ANÁLISE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Para validação dos testes, foram utilizados isolados de referência, os quais apresentaram valores de CIM compatíveis com o estabelecido pelo protocolo do CLSI (**Anexos A e B**). A **tabela 5** apresenta os dados da CIM de 16 isolados clínicos de *S. brasiliensis* oriundos dos pacientes incluídos nesse estudo. O teste foi realizado tanto na forma micelial quanto na forma leveduriforme, ambas seguindo o protocolo M38-A2 e M27-A3 do CLSI, respectivamente, a fim de comparar uma possível diferença no comportamento do fungo em suas diferentes morfologias perante os fármacos antifúngico utilizados e consequentes associações com a resposta terapêutica de cada paciente.

Todos os isolados clínicos foram avaliados como tipo selvagem para anfotericina B, itraconazol e posaconazol, de acordo com os cortes epidemiológicos descritos para a forma micelial de *S. brasiliensis*. Já para terbinafina, os isolados dos pacientes 1 e 2 foram considerados como tipo não selvagens. Com intuito de verificar se a determinação da CIM nas formas micelial e leveduriforme teria a capacidade de alterar a correlação clínica quanto à resposta terapêutica aos antifúngicos utilizados por cada paciente, também foram determinadas CIMs para a forma de levedura de *S. brasiliensis*. Entre os isolados avaliados no estudo, sete apresentaram variações acima de duas diluições nos valores da CIM do itraconazol entre as formas de micélio e levedura, dois no posaconazol e cinco na terbinafina.

A grande maioria dos isolados estudados obteve CIM maior para a forma micelial, com exceção dos isolados do paciente 2, que produziram CIMs mais altas para a forma de levedura. É interessante notar que os isolados do paciente 1, coletados ao longo de 60 semanas de evolução da esporotricose, evoluíram para um aumento de duas diluições nos valores de CIM da anfotericina B, de 0,5 µg/ml para 2,0 µg/ml para a forma micelial e de 1,0 µg/ml a 4,0 µg/ml para a forma de levedura. O último isolado do paciente 4 também apresentou aumento semelhante no valor da CIM da anfotericina B, de 1,0 mg/l para 4,0 mg/l, mas apenas para a forma micelial do fungo. Todas as outras variações observadas nos valores de CIM da forma micelial dos isolados estudados estavam dentro de uma faixa de diluição. Por outro lado, os pacientes 2 e 4 apresentaram um aumento de duas diluições nos valores de CIM de itraconazol para a forma de levedura dos isolados, e o paciente 1 apresentou uma variação semelhante nas CIM de levedura de terbinafina.

Tabela 5: Dados clínico-terapêuticos e concentração inibitória mínima de 16 isolados clínicos de *S. brasiliensis*.

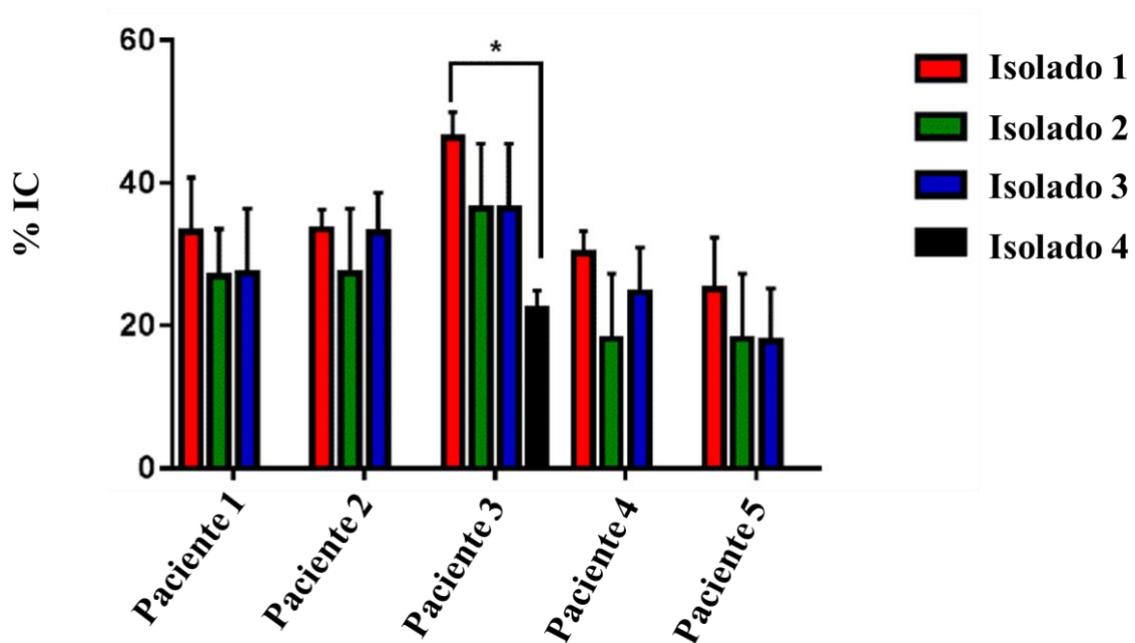
Caso	Número da cepa	Evolução da esporotricose (semanas)	Tratamentos antifúngicos anteriores	CIM (mg/l)							
				Anfotericina B		Itraconazol		Posaconazol		Terbinafina	
				M	L	M	L	M	L	M	L
1	41932	0	Nenhum	0,5	1,0	0,5	0,25	1,0	0,25	0,25 ^a	0,12
	44886	60	AMB (d) / ITC / FLC	2,0	2,0	1,0	0,25 ^b	0,5	0,25	0,5	0,12
	45308	69	AMB (d) / ITC / FLC	2,0	4,0	0,5	1,0	0,5	0,25	0,5	0,25
2	654H	0	Nenhum	2,0	2,0	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,12
	42235	2	AMB (d)	2,0	2,0	0,5	0,5	0,25	1,0	0,5	0,06
	45030	65	AMB (d) / ITC	4,0	4,0	0,25	1,0	0,5	1,0	0,5	0,12
3	49240	0	ITC	4,0	2,0	1,0	1,0	0,5	0,25	0,03	0,03
	49263	4	AMB (d) / ITC	20	2,0	2,0	0,25	0,5	0,25	0,03	0,03
	49413	9	AMB (d) (l) / ITC	2,0	1,0	2,0	0,5	0,5	0,5	0,06	0,015
	50661	66	AMB (d) (l) / ITC	2,0	2,0	1,0	0,5	0,5	0,25	0,03	0,015
4	43723	0	AMB (d) / ITC / TRB	1,0	2,0	2,0	0,25	0,5	0,5	0,06	0,06
	47418	105	AMB (d) (l) / ITC	1,0	1,0	2,0	0,25	0,5	0,25	0,06	0,03
	48294	187	AMB (d) (l) / ITC / TRB / PSC	4,0	2,0	1,0	1,0	0,5	0,25	0,06	0,06
5	43987-1	0	AMB (d) (l) / ITC	4,0	2,0	2,0	1,0	0,5	0,5	0,03	0,06
	44022	1	AMB (d) (l) / ITC	4,0	2,0	2,0	2,0	1,0	0,5	0,06	0,06
	46670	56	AMB (d) (l) / ITC / TRB / PSC	4,0	1,0	2,0	0,5	0,5	0,25	0,06	0,03

Legenda: ^a Os números em negrito indicam CIMs de isolados do tipo não selvagem. ^b Os números em itálico indicam CIMs com uma diferença de duas ou mais diluições entre as formas miceliais fúngicas e leveduras. AMB (d): desoxicolato de anfotericina B; (l): complexo lipídico; ITC: itraconazol; FLC: fluconazol; PSC: posaconazol M: micélio; L: levedura; CIM: concentração inibitória mínima.

5.4 TERMOTOLERÂNCIA

Todos os isolados apresentaram crescimento nas temperaturas de 25 °C e 35 °C. Quanto menor a % IC, maior a termotolerância do fungo. Os isolados de todos os pacientes, exceto do paciente dois, coletados em estágios finais da infecção por *S. brasiliensis* apresentaram maior termotolerância em comparação aos isolados anteriores. No entanto, notou-se uma diferença significativa ($p = 0,0007$) apenas para o último isolado do paciente 3 que apresentou uma alta termotolerância em relação ao primeiro isolado (Figura 10).

Figura 10: Distribuição dos valores de %IC indicativos da termotolerância.



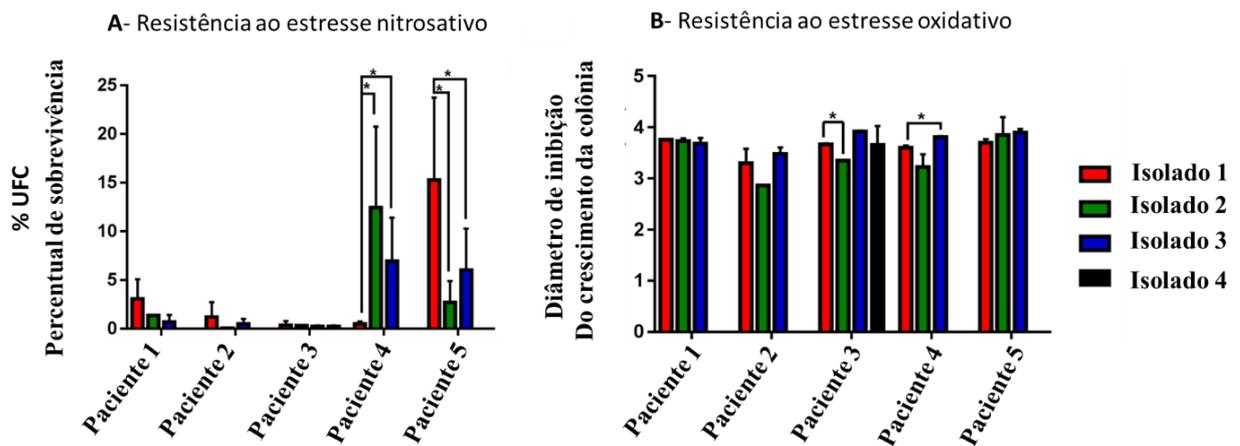
Legenda: Média e desvio padrão baseados em ensaios de termotolerância com incubação de isolados por 7 dias a 25 °C e 35 °C. Quanto menor a porcentagem de inibição de crescimento, maior a termotolerância dos isolados. O símbolo * indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a termotolerância do isolado obtido no momento do diagnóstico de esporotricose e os isolados obtidos durante a evolução da doença.

5.5 RESISTÊNCIA AO ESTRESSE NITROSATIVO E OXIDATIVO

Os isolados do paciente 4, obtidos após mais de dois anos de evolução da esporotricose, foram mais resistentes aos oxidantes derivados de nitrogênio do que o isolado obtido no diagnóstico (Figura 11A), mas o último isolado deste paciente foi mais suscetível ao peróxido de hidrogênio do que o isolado obtido no diagnóstico de esporotricose (Figura 11B). Para todos os outros pacientes, observou-se que a resistência aos oxidantes derivados de nitrogênio diminuiu ao longo do tempo, embora apenas o paciente 5 tenha apresentado diferença

estatisticamente significativa. O segundo isolado do paciente 3, obtido do líquido cefalorraquidiano, foi mais resistente ao peróxido de hidrogênio ($p = 0,0012$), mas para outros isolados, todos de lesões cutâneas, o perfil de suscetibilidade a esse estresse oxidativo foi semelhante. O perfil de suscetibilidade a oxidantes derivados de oxigênio de isolados de outros pacientes foi semelhante ao longo do tempo.

Figura 11: Avaliação dos isolados de *S. brasiliensis* frente a radicais de nitrogênio quimicamente gerados e peróxido de hidrogênio.

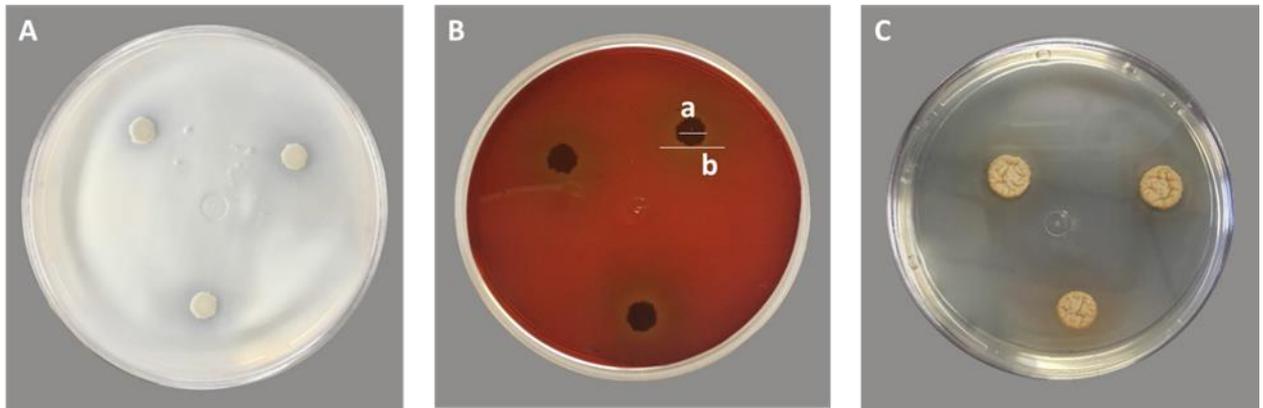


Legenda: A resistência de *S. brasiliensis* foi avaliada pela exposição de células leveduriformes a radicais de nitrogênio quimicamente gerados e peróxido de hidrogênio. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de (A) a porcentagem de sobrevivência da forma de levedura dos isolados em uma solução oxidante derivada de nitrogênio e (B) zona de inibição, em centímetros, do crescimento de leveduras de *S. brasiliensis* na presença de peróxido de hidrogênio. O símbolo * indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as resistências do isolado obtido no momento do diagnóstico e os isolados obtidos durante a evolução da esporotricose.

5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade de diferentes enzimas hidrolíticas foi evidenciada pela presença de um halo ao redor de cada colônia, como representado na **figura 12**.

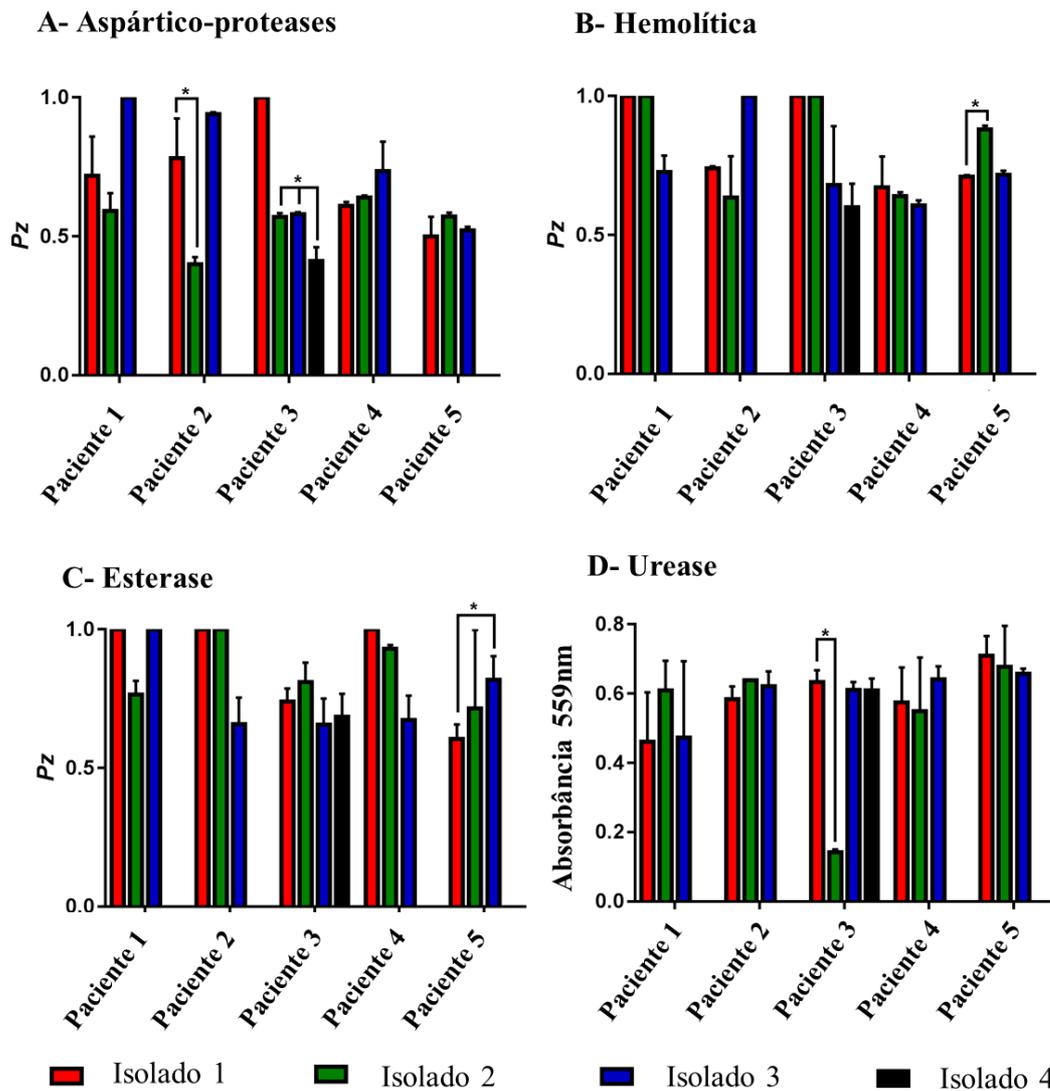
Figura 12: Fotografias de isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* apresentando halo devido à atividade enzimática.



Legenda: Isolados clínicos de *S. brasiliensis* produtores de enzimas hidrolíticas. A- Aspártico-protease; B- Atividade hemolítica; C- Esterase. As atividades foram representadas por meio do valor de Pz ($Pz = a/b$) sendo (a) o diâmetro da colônia e (b) o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação.

Não houve atividade enzimática ($Pz=1$ Atividade enzimática negativa) de fosfolipase e fitase a partir dos testes realizados com todos os 16 isolados de *S. brasiliensis* desse estudo. Ambos os testes foram validados pela produção de halo pela cepa de referência *C. albicans* ATCC 18804. A **figura 13** apresenta uma visão geral da atividade de algumas enzimas associadas à virulência fúngica pelos 16 isolados de *S. brasiliensis* avaliados nesse estudo. Dentre os isolados, dois (isolado 3 do paciente 1 e isolado 1 do paciente 3) não foram capazes de apresentar atividade de aspártico-protease, cinco (isolados 1 e 2 do paciente 1, isolado 3 do paciente 2 e isolados 1 e 2 do paciente 3) não foram capazes de apresentar hemólise em ágar sangue de carneiro, outros cinco (isolados 1 e 3 do paciente 1, isolados 1 e 2 do paciente 2 e isolado 1 do paciente 4) não apresentaram atividade de esterase e um (isolado 2 do paciente 3) não apresentou atividade de urease. Foram observadas algumas variações significativas na atividade de aspártico-protease no segundo isolado do paciente 2, com uma maior atividade dessa enzima, além de alteração semelhante no último isolado do paciente 3. Vale ressaltar que o isolado obtido deste paciente no momento do diagnóstico da esporotricose não apresentou atividade aspártico-protease, enquanto os isolados subsequentes o fizeram. O último isolado obtido do paciente 1, 15 meses após o diagnóstico, também não apresentou atividade desta enzima.

Figura 13 - Atividades de enzimas hidrolíticas por isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* de pacientes com esporotricose crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida.



Legenda: Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão da atividade de (A) aspártico-proteases, (B) hemolítica, (C) esterase e (D) urease. As atividades de aspártico-proteases, hemolítica e esterase são expressas como o Pz obtido em meios de cultura específicos para testagem da produção dessas enzimas por leveduras do fungo. A atividade da urease é expressa como a densidade óptica (559 nm) das culturas de levedura de *S. brasiliensis* em caldo de ureia de Christensen. O símbolo * indica uma diferença estatisticamente significativa entre a atividade da enzima hidrolítica pelo isolado obtido no momento do diagnóstico de esporotricose e os isolados obtidos durante a evolução da doença.

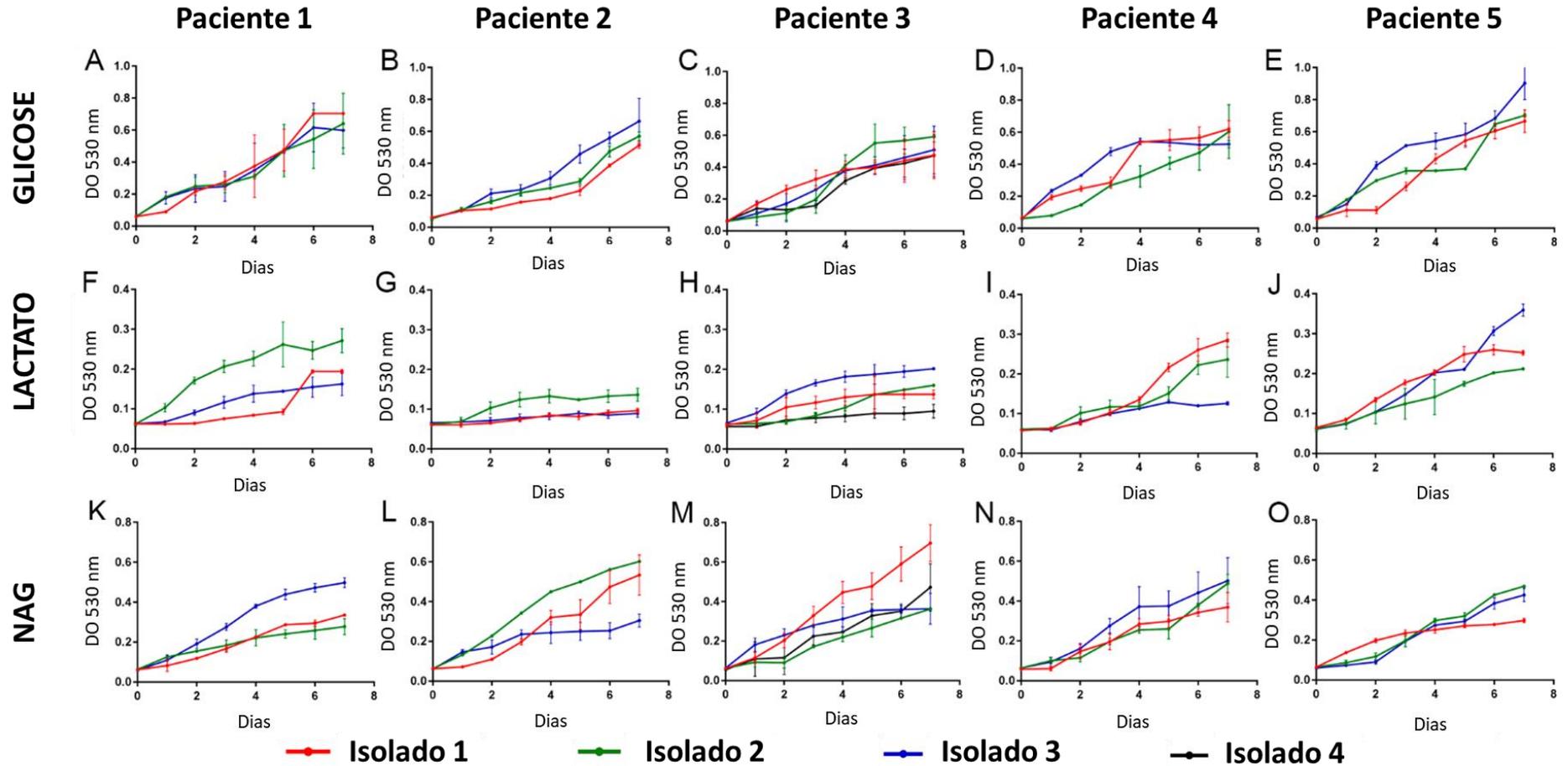
Quanto à atividade hemolítica, esta não foi observada para os isolados dos pacientes 1 e 3, obtidos no momento do diagnóstico, porém isolados subsequentes apresentaram uma evolução para baixa atividade hemolítica. Já os isolados do paciente 2 agiram de maneira inversa aos citados acima, ou seja, o último isolado desse paciente não exibiu atividade hemolítica, diferentemente de seus isolados anteriores. A atividade hemolítica do paciente 4 se manteve estável durante todo o período estudado e o paciente 5 apresentou uma diminuição

significativa na atividade de hemolisina no isolado 2 ($p = 0,004$). Quanto à atividade de esterase, esta foi baixa para o segundo isolado do paciente 1 e moderada para o último isolado do paciente 2. Ocorreram pequenas variações nos níveis de atividade de esterase dos isolados dos pacientes 3 e 4, porém sem diferenças estatisticamente significativas, apesar do aparente aumento ao longo do tempo observado para o paciente 4. Foi observado um decréscimo na atividade de esterase no terceiro isolado do paciente 5 em relação ao primeiro isolado ($p < 0,001$). Entre as enzimas estudadas, a atividade de urease foi a que se apresentou mais homogênea entre todos os isolados. Somente o segundo isolado do paciente 3 não apresentou tal atividade.

5.7 CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

O perfil de crescimento dos isolados na presença de glicose foi semelhante entre os cinco pacientes (**Figura 14A-E**). Em geral, todos os isolados apresentaram pouco crescimento na presença de lactato (**Figura 14F-J**), e dois isolados do paciente 2 não foram capazes de crescer quando essa foi a única fonte de carbono ofertada como nutriente. O crescimento dos isolados clínicos de *S. brasiliensis* aqui estudados foi mais abundante na presença de GlcNAc do que na presença de lactato (**Figura 14K-O**). No entanto, não foi possível associar o crescimento dos isolados com o tempo de evolução da doença nem com a amostra clínica que produziu o isolado. Por exemplo, o terceiro isolado do paciente 1 (16 meses de evolução da esporotricose, isolado do líquido cefalorraquidiano) cresceu mais abundantemente na presença de GlcNAc do que os dois primeiros isolados. Por outro lado, para o paciente 3, o primeiro isolado (no diagnóstico, de um fragmento de tecido da pele) apresentou o melhor crescimento entre os quatro isolados estudados na presença da mesma fonte de carbono.

Figura 14- Crescimento de *Sporothrix brasiliensis* sob diferentes fontes de carbono.

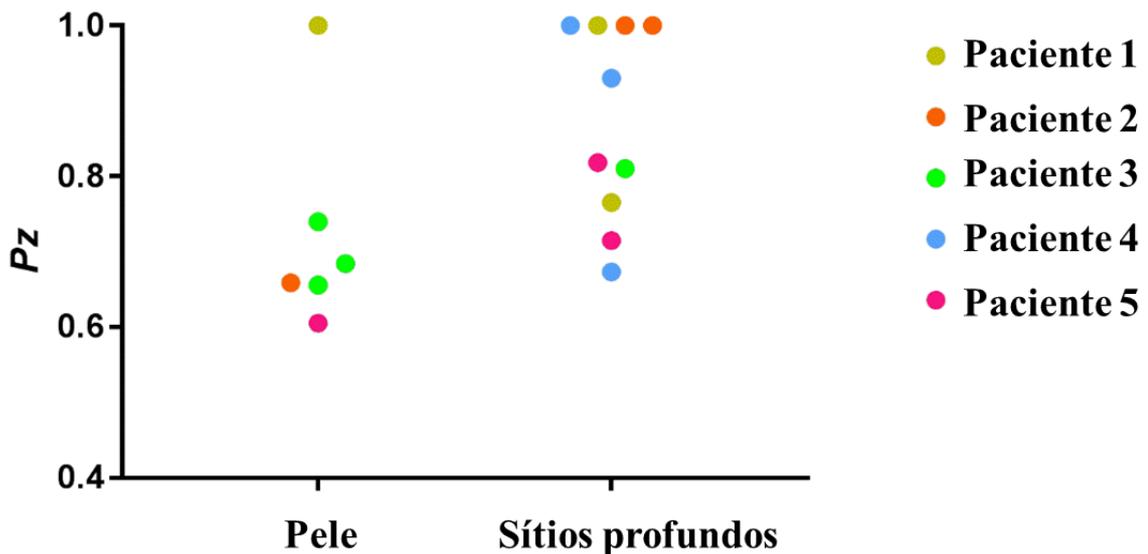


Legenda: Eixo X relacionado aos pacientes, eixo Y relacionado as fontes de carbono. Glicose (A, B, C, D, E), lactato (F, G, H, I, J) e N-acetil-D-glucosamina (K, L, M, N, O) serviram como fontes de carbono para o crescimento de isolados clínicos de *S. brasiliensis* obtidos do paciente 1 (A, F, K), 2 (B, G, L), 3 (C, H, M), 4 (D, I, N), e 5 (E, J, O), todos com esporotricose crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida. A densidade óptica (530 nm) dos isolados cultivados nas diferentes fontes de carbono foi medida diariamente durante sete dias. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão das leituras. NAG: N-acetil-D-glucosamina; DO: densidade óptica.

5.8 DIFERENÇAS FENOTÍPICAS DE ACORDO COM SÍTIO DE ISOLAMENTO

Para avaliar se isolados da pele e de locais disseminados possuem características fenotípicas diferentes, os 16 isolados clínicos incluídos no estudo foram agrupados de acordo com o sítio de origem e as variáveis fenotípicas avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. Observamos que isolados provenientes de pele produziram mais esterase do que isolados de sítios corporais profundos (medianas de Pz: 0,6714- atividade enzimática alta e 0,8742- atividade enzimática baixa, respectivamente; $p = 0,0387$), como demonstrado na **figura 15**. Os demais fenótipos estudados comportaram-se de forma semelhante, independentemente do local do isolamento (pele e sítios profundos) ($p > 0,05$). Embora não tenha apresentado significância estatística ($p = 0,1853$), é interessante observar que os isolados com menor % IC, ou seja, com alta termotolerância, foram obtidos de sítios corporais profundos.

Figura 15- Diferenças fenotípicas entre os 16 isolados clínicos dos pacientes com esporotricose e infecção por HIV.

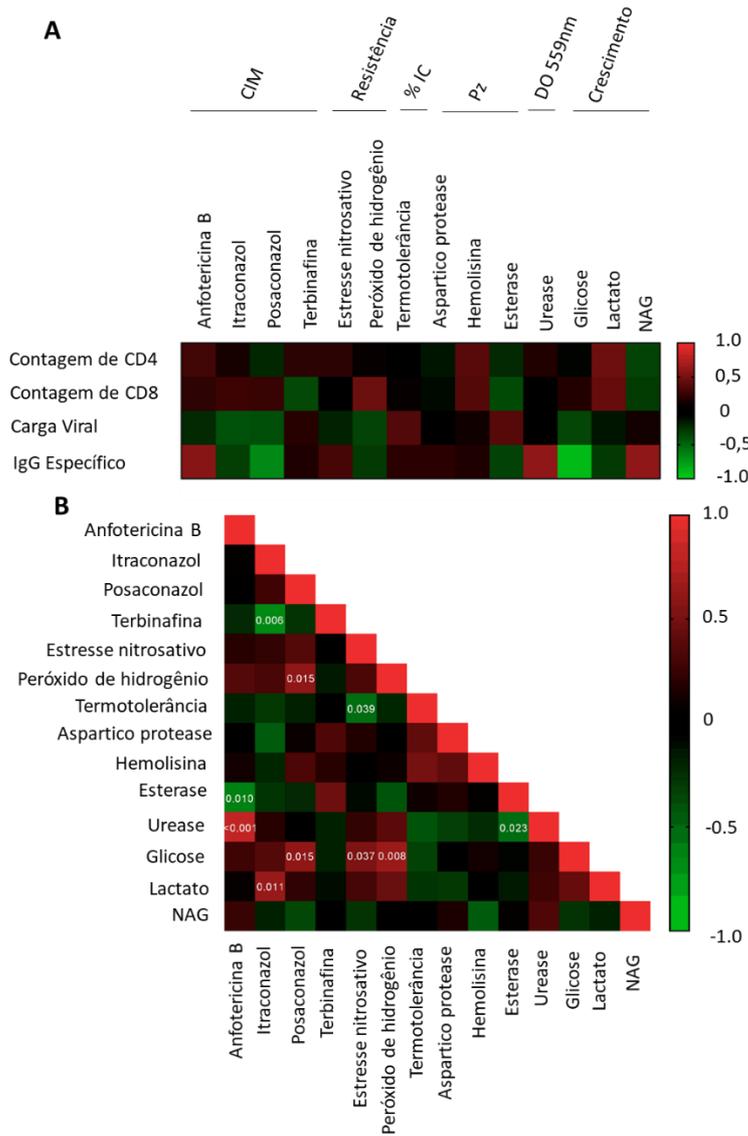


Legenda: Diferenças entre a produção de esterase dos isolados estudados, obtidos da pele e sítios corporais profundos de pacientes com esporotricose crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida. Os resultados foram demonstrados com o valor médio de seis medições de Pz realizadas em dois experimentos independentes. Os valores de Pz estão representados por uma variação de cores.

5.9 CORRELAÇÕES ENTRE FENÓTIPOS FÚNGICOS E ASPECTOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

Foram feitas avaliações entre as características fenotípicas dos isolados obtidos dos pacientes e o estado imunológico de cada um deles, correlacionando dados como contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺, níveis de IgG específica contra *S. brasiliensis*, bem como a carga viral no momento do isolamento em cultura dos isolados durante o curso da infecção. Como demonstrado na **figura 16A**, não houve correlações significativas entre os dados clínicos dos pacientes e os fenótipos dos fungos avaliados neste estudo. Foram realizadas também possíveis correlações entre diferentes fenótipos apresentados por um mesmo isolado fúngico. A **figura 16B** apresenta o coeficiente de correlação de Spearman de todas as associações e os valores de p de correlações significativas ($p < 0,05$). Após análise estatística, foram encontradas as seguintes correlações significativas: (i) isolados com maiores valores de CIM de anfotericina B foram mais produtores de esterase e urease; (ii) isolados com maiores valores de CIM de itraconazol apresentaram menores valores de CIM de terbinafina e tiveram melhor crescimento na presença de lactato como fonte de carbono; (iii) isolados com valores mais altos de CIM de posaconazol foram mais suscetíveis ao peróxido de hidrogênio e tiveram melhor crescimento com a glicose como fonte de carbono; (iv) isolados com maior resistência a oxidantes derivados de nitrogênio apresentaram menor termotolerância, mas apresentaram melhor crescimento com a glicose como fonte de carbono; (v) isolados com maior resistência ao peróxido de hidrogênio cresceram menos abundantemente com glicose como fonte de carbono; e (vi) isolados que produziram níveis mais altos de esterase também produziram altos níveis de urease.

Figura 16: Mapas de calor representando a correlação entre fenótipos fúngicos e aspectos clínicos dos pacientes.



Legenda: Análises de correlação de variáveis clínicas e micológicas. Mapas de calor representando os coeficientes de correlação de Spearman de (a) as associações entre aspectos imunológicos (contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺, resposta IgG específica) e carga viral de pacientes com os fenótipos de isolados sequenciais de *Sporothrix brasiliensis*; e (b) as associações entre diferentes fenótipos dos isolados clínicos estudados. A cor verde representa associações negativas, enquanto a vermelha representa associações positivas. Os valores de probabilidade de correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) estão exibidos dentro dos respectivos quadrados. CIM: Concentração Inibitória Mínima. %IC: Inibição de crescimento. DO: Densidade Óptica. CD4 e CD8: Linfócitos. NAG: N-acetil-D-glucosamina.

6 DISCUSSÃO

A esporotricose é uma doença cosmopolita (CHAKRABARTI et al., 2015; CONTI-DIAZ, 1989; OROFINO-COSTA et al., 2017) e a região metropolitana do Rio de Janeiro é hiperendêmica desde o final dos anos 90 (FALCÃO et al., 2018; PEREIRA et al., 2014), com o fungo sendo transmitido, na maioria dos casos, pelo contato com gatos domésticos e semidomiciliados infectados, geralmente acompanhado de arranhaduras e mordeduras (BARROS et al., 2001). Isso difere da transmissão clássica da doença que se dá por inoculação traumática por madeiras e plantas (RIPPON, 1988). No Rio de Janeiro, região onde o estudo foi conduzido, destaca-se a espécie *S. brasiliensis* (ALMEIDA-PAES et al., 2014), altamente virulenta (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; FREITAS et al., 2015a), o que explica o achado exclusivo desta espécie, associada a quadros graves de esporotricose, no presente trabalho. As formas mais agressivas da infecção são observadas principalmente em pacientes com aids (FALCÃO et al., 2020).

Falcão e colaboradores analisaram e descreveram dados de 1992 a 2015, provenientes de bancos de dados do Sistema Único de Saúde do Brasil, com 782 hospitalizações e 65 óbitos associados à esporotricose. Em 6% das hospitalizações e 40% dos óbitos havia coinfeção pelo HIV. Na casuística aqui apresentada, todos os pacientes foram hospitalizados em algum momento da evolução da doença e a maioria deles apresentou um desfecho negativo (óbito) em decorrência, direta ou indireta, da esporotricose. Todos os pacientes tiveram isolamento do fungo de variados sítios e em mais de um momento ao longo do curso da infecção, além de contagem de células T CD4⁺ abaixo de 200 células/ μ l, no momento do diagnóstico da esporotricose. Este quadro avançado imunossupressão remete a um período pré-terapia antirretroviral, quando pacientes com infecção pelo HIV evoluíam, quase que invariavelmente para aids, com quadros oportunistas graves e fatais. Neste cenário, ainda hoje, seja por atraso diagnóstico da infecção pelo HIV, seja por falha no seguimento terapêutico, a esporotricose tem se comportado como doença oportunística, quando há sobreposição dessas infecções (FALCÃO et al., 2020; FREITAS et al., 2012, 2014, 2015b; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010).

Enquanto o diagnóstico micológico nesses pacientes é relativamente fácil, justamente pela abundância de estruturas fúngicas nas lesões, o manejo clínico e terapêutico representa um grande desafio, dadas as possíveis coinfeções, comorbidades e diagnósticos diferenciais. Dentre os cinco pacientes estudados, quatro tiveram a esporotricose como doença indicadora de aids. As seguidas hospitalizações e abandonos de tratamento em todos os casos aqui

estudados ratificam esta realidade, com seus aspectos socioeconômicos, culturais, psicológicos e comportamentais. A paciente 5 desse estudo teve seu quadro clínico-evolutivo explorado em um relato de caso, no qual pode-se entender que, mesmo após inúmeros procedimentos diagnósticos, esquemas terapêuticos e hospitalizações, a paciente, ainda que evoluindo lentamente com melhora clínica, acabou por ter o óbito como desfecho de complicação indireta da esporotricose, notadamente pelo envolvimento do sistema nervoso central (PAIXÃO et al., 2015). Além de todos os aspectos citados, algumas peculiaridades em casos graves e crônicos nessa população de pacientes coinfectados trazem questões a serem investigadas com relação ao agente causador, *S. brasiliensis*, de potencial virulento sabidamente conhecido e que pode ter papel adjuvante nesses desfechos desfavoráveis (ALMEIDA-PAES et al., 2014; ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; FREITAS et al., 2015a).

A anfotericina B foi administrada a todos os pacientes incluídos nesse estudo durante algum momento do tratamento. Entre eles, dois apresentaram um aumento nos valores de CIM para a anfotericina B em isolados obtidos após o tratamento com esse fármaco. Embora dois isolados tenham demonstrado aumento na CIM, todos foram considerados como tipo selvagem para a anfotericina B, pois *S. brasiliensis* apresenta ECV elevado para esse poliênico, o que sugere uma resistência natural contra esse fármaco (ESPINEL-INGROFF et al., 2017).

Quanto aos pontos de corte epidemiológico, nesse estudo, isolado tipo não selvagens foram encontrados somente para terbinafina. Estes isolados pertenciam aos pacientes 1 e 2, que não receberam tratamento com esse fármaco. Um relato feito por Almeida-Paes e colaboradores (2017) já descreveu a existência de isolados de *S. brasiliensis* tipo não selvagens para terbinafina no estado do Rio de Janeiro, indicando que a infecção desses pacientes possa ter ocorrido por isolados tipo não selvagem para terbinafina naturalmente existentes na área onde o estudo foi conduzido.

O protocolo empregado habitualmente para verificar a ação dos antifúngicos sobre *Sporothrix* spp. utiliza a forma filamentosa do fungo para determinação da CIM (ESPINEL-INGROFF et al., 2017). Todavia, como leveduras são as formas encontradas no hospedeiro, escolhemos analisar também essa morfologia do fungo, comparando assim, se haveria algum padrão diferenciado específico de cada forma, ou se as CIMs da forma leveduriforme teriam maior associação com a resposta terapêutica dos pacientes. Em sua grande maioria, as CIMs foram semelhantes em ambas as morfologias, consolidando desta forma que a determinação da CIM na forma filamentosa, como padronizada nos protocolos, é suficiente para obtenção de resultados de suscetibilidade antifúngica. Entretanto, se faz necessário um estudo com uma

coorte maior, de preferência multicêntrico e envolvendo pacientes infectados por diferentes espécies de *Sporothrix* para confirmação dessa hipótese.

Poucas variações foram constatadas entre as formas filamentosa e de levedura, sendo que a maioria dos isolados apresentou CIMs maiores na forma filamentosa, como relatado em estudos prévios (SANCHOTENE et al., 2017; TRILLES et al., 2005). Somente os isolados do paciente 2 tiveram CIMs mais elevadas para itraconazol (terceiro isolado) e posaconazol (segundo isolado) na fase leveduriforme quando comparadas às de micélio. Esse paciente não foi tratado com posaconazol, todavia o uso prolongado de itraconazol pode ter influenciado o aparecimento de subpopulações mais tolerantes a maiores concentrações de antifúngicos azólicos na forma parasitária do fungo. Entretanto, como esse resultado ocorreu em um único paciente incluído no estudo, e não se repetiu em outros pacientes tratados de forma semelhante, acreditamos que o itraconazol tenha uma capacidade bastante reduzida de induzir resistência *in vivo* em leveduras de *S. brasiliensis* durante o curso da esporotricose.

A termotolerância confere a capacidade ao fungo de sobreviver no organismo do hospedeiro, seja ele humano ou animal. É, também, sabida sua importância na patogênese da esporotricose e, em nosso estudo, foi possível evidenciar o que a literatura já relata, que o mesmo possui a habilidade de crescimento em temperaturas distintas, 25 °C e 35 °C (BOECHAT et al., 2018; MESA-ARANGO et al., 2002), indicando que possui fácil adaptação tanto na natureza, quanto exposto à temperatura corpórea. A maioria dos isolados estudados apresentou uma alta termotolerância, ou seja, exibiram menos que 33% de inibição do crescimento a 35 °C, o que condiz com a forma disseminada da esporotricose apresentada pelos pacientes. Foi evidenciado, também, que os últimos isolados dos pacientes que evoluíram a óbito possuíam um leve aumento da termotolerância, em comparação aos primeiros isolados coletados, sugerindo que *S. brasiliensis* adote mecanismos de tolerância à temperatura corpórea durante o curso da infecção, evidenciando a importância desse fator de virulência na esporotricose por este agente.

Um estudo realizado por Freitas e colaboradores (2015a) abordou o aumento da resistência de *S. brasiliensis* aos radicais livres de nitrogênio, em um paciente com esporotricose crônica. Nos isolados analisados no presente estudo, também foi possível verificar tal comportamento no paciente 4. Em contrapartida, os isolados do paciente 5, obtidos durante o curso da infecção, tiveram maior suscetibilidade quando submetidos ao mesmo tipo de estresse, o que indica que *S. brasiliensis* possui uma capacidade adaptativa às circunstâncias às quais é exposto e possivelmente ao status imunológico do paciente. Foi observado, ainda, que o último isolado do paciente 4, o qual possui maior resistência a radicais de nitrogênio

quimicamente gerados, foi o mais sensível quando exposto ao peróxido de hidrogênio. Em sua maioria, os isolados apresentaram estabilidade frente ao peróxido de hidrogênio durante o curso da infecção, especialmente nos pacientes 1 e 5, o que ocorreu no estudo de Freitas e colaboradores (2015a) com um paciente não infectado pelo HIV.

Neste estudo foi possível avaliar a produção de enzimas como: aspártico-protease, esterase, hemolisina e urease. Como é sabido por meio de estudos anteriores, cerca de 20 a 25% das isolados brasileiros de *Sporothrix* apresentam atividade proteolítica *in vitro* (ALMEIDA-PAES et al., 2015; FERNANDES et al., 2009). Em nosso estudo foi possível verificar a presença de atividade proteolítica em 87,5% dos isolados analisados, o que ratifica prévias considerações, apontando que a maior parte dos isolados com essas características são provenientes de pacientes com HIV (ALMEIDA-PAES et al., 2015). Oliveira e colaboradores (2015) demonstraram resultados semelhantes, em relação à frequência de resultados positivos quanto à esterase. No presente estudo, foi possível avaliar que dentre os isolados coletados da pele dos pacientes e dos sítios corporais mais profundos, os primeiros possuíam maior capacidade de produzir esterase, o que sugere o possível uso de ácidos graxos no parasitismo da pele.

A captação de ferro é um dos meios utilizados por fungos patogênicos para sua sobrevivência em seus respectivos hospedeiros, por meio de lise dos glóbulos vermelhos e assimilação do ferro associado à hemoglobina (CRAWFORD; WILSON, 2015). Outras formas de captação de ferro, são a captação redutora e não redutora de ferro e a síntese de sideróforos (ANDREWS et al., 2016; BAIRWA et al., 2017). Tais atividades hemolíticas já foram relatadas em gêneros como *Cryptococcus*, *Candida* e *Saccharomyces*, entre outros (NAYAKA; GREEN; BEEZHOLD, 2013; SRIVASTAVA; SUNEETHA; KAUR, 2014). Foi possível avaliar a atividade hemolítica em alguns dos isolados estudados. Até o presente momento, não há relatos sobre essa atividade em isolados de *S. brasiliensis*, sendo essa a primeira descrição.

A urease tem sido apontada como detentora de diversos domínios funcionais, tendo como seu objetivo mais relevante a utilização da ureia como fonte de nitrogênio. Além disso, as ureases possuem a capacidade de hidrolisar ureia, gerando amônia e dióxido de carbono como subprodutos (CARLINI et al., 2016; FOLLMER, 2008). Estudos anteriores relatam que a produção e expressão de urease por *S. brasiliensis* é estatisticamente mais elevada que a de *S. schenckii*, espécie considerada menos virulenta que a primeira (ALMEIDA-PAES et al., 2015). Em nosso estudo foi possível verificar uma produção homogênea de urease na quase totalidade de isolados estudados, o que corrobora estudos precedentes (ALMEIDA-PAES et al., 2015; MENDOZA et al., 2005).

Não foram detectadas atividades de fosfolipase e fitase nos isolados estudados. Acreditamos que a inabilidade de detectar fosfolipase em nossos isolados pode estar ligada à metodologia escolhida ou ainda a diferentes características celulares entre leveduras de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, já que Valentín-Berríos e colaboradores (2009) destacam a presença de fosfolipase A2 citosólica no desenvolvimento da levedura de *S. schenckii*. Até o término desse estudo não foram encontrados relatos de produção de fitase por espécies patogênicas humanas do gênero *Sporothrix*.

Alguns isolados de *S. brasiliensis* estudados aqui foram capazes de crescer na presença de lactato, um composto abundante na maioria dos hospedeiros e ainda mais na presença de GlcNAc, que é um derivado da glucosamina que é produzido naturalmente pelo ser humano e juntamente com o d-glucuronato compõem o ácido hialaurônico, que compõe todos os tecidos do corpo, como por exemplo, articulações e a pele. Entre os sítios mais acometidos por *Sporothrix* spp., encontra-se em primeiro lugar a pele, seguida das articulações, sendo mais frequente nos joelhos e pulsos. As lesões podem apresentar aspecto granulomatoso solitário ou artrite destrutiva, gerando destruição óssea e tenossinovite associada. Estudos indicam que *Sporothrix* spp. possui tropismo pelas articulações e regiões ricas nos compostos supracitados, muitas vezes, o diagnóstico e tratamento adequados tornam-se complicados, já que os sintomas são semelhantes aos causados por outras etiologias que afetam as articulações (BARBARYAN et al., 2018; OROFINO-COSTA et al., 2017; SCHWARTZ, 1989).

A capacidade de os microrganismos crescerem sob diferentes condições nutricionais é conhecida como plasticidade metabólica e para *C. albicans*, essa característica está relacionada à virulência fúngica (MIRAMÓN; LORENZ, 2017)

Esse resultado, além da produção de aspártico-protease pela maioria dos isolados deste estudo, sugere que *S. brasiliensis* utiliza proteínas hospedeiras como moléculas para o crescimento. Recentemente, foi demonstrado que *S. brasiliensis* é capaz de utilizar bactérias mortas como a única fonte de nutrientes para o seu crescimento (ALMEIDA PAES et al., 2019), o que pode explicar melhor o crescimento mais abundante de *S. brasiliensis* na presença de GlcNAc. Como a pele e outras partes do corpo têm uma microbiota bacteriana associada, esta talvez possa servir como nutriente para o fungo.

Diante dos achados supracitados, este estudo contribuiu para um melhor entendimento do comportamento do fungo frente a diversos mecanismos de virulência já bem descritos em outros patógenos. Embora tenham sido encontrados dados interessantes, como a não produção de fosfolipase nos isolados estudados e a primeira descrição de atividade hemolítica em isolados de *S. brasiliensis*, a última enzima citada auxilia na disseminação hematogênica e na aquisição

de ferro nos tecidos hospedeiros, podendo beneficiar a sobrevivência do fungo durante a infecção, uma das limitações do nosso estudo foi o tamanho do número de amostras incluídas no projeto, devido ao afinamento resultante dos critérios de inclusão. Ainda que se tratando de amostras de um centro de referência em doenças infecciosas, com concentração de casos de aids e de esporotricose, a associação estudada e os critérios de inclusão restringiram o tamanho amostral e limitaram a validação dos achados. Mesmo com as limitações desse trabalho, acredita-se que os achados do presente estudo auxiliam no entendimento preliminar do papel de *S. brasiliensis* em um grupo específico de pacientes com esporotricose e aids, em um contexto de gravidade e cronicidade de doença.

Estudos semelhantes englobando um maior número de casos, talvez multicêntrico, pela raridade da associação, são desejáveis para se alcançar conclusões mais consistentes quanto à participação das espécies de *Sporothrix* nos diferentes quadros clínicos.

7 CONCLUSÕES

- Todos os isolados estudados foram identificados como *Sporothrix brasiliensis*, que é a espécie predominante na esporotricose no Brasil.
- Todos os isolados apresentaram-se como tipo selvagem para anfotericina B, itraconazol e posaconazol, mesmo sendo esses fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento da esporotricose nos pacientes incluídos.
- As formas micelial e leveduriforme apresentaram uma concordância nas CIMs, o que dá suporte ao uso do teste de suscetibilidade com a forma filamentosa tal como preconizado pelo CLSI, mesmo essa não sendo a forma parasitária do fungo.
- A maioria dos isolados apresentou termotolerância alta corroborando a capacidade de disseminação de *S. brasiliensis*. Quanto ao crescimento frente a diferentes fontes de carbono disponíveis no hospedeiro, *S. brasiliensis* prefere GlcNAc a lactato para o seu crescimento.
- Os isolados de *S. brasiliensis* são capazes de produzir algumas enzimas hidrolíticas extracelulares, as quais podem aumentar a virulência em outros modelos fúngicos.
- A resposta de isolados sequenciais de *S. brasiliensis* com relação ao estresse gerado por radicais de oxigênio e nitrogênio é variável entre diferentes pacientes, não havendo um padrão que possa ser associado ao desfecho clínico dos casos.
- A supressão imunológica causada pelo HIV em pacientes com aids tem papel mais relevante no desfecho clínico da esporotricose de evolução crônica nesse grupo do que os fenótipos associados à virulência dos isolados de *S. brasiliensis*.

REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, P. C. et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 1695-1710, 2008.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes Infect**, Paris, v. 11, n.5, p. 554-562, 2009.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the *Sporothrix* Complex. **BioMed Res Int**, New York, v. 2015, p. 01–10, 2015.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e3094, 2014.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Use of Mycelial-Phase *Sporothrix schenckii* Exoantigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Sporotrichosis by Antibody Detection. **Clin Vaccine Immunol**, Washington, v. 14, n. 3, p. 244–249, 2007.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n.5, p. 376–381, 2017.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. **Appl environ microbiol**. v. 78, n. 24, p. 8623–8630, 2012.
- ALSINA, A.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N. Effects of divalent cations and functionally related substances on the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 22, n. 1, p. 1– 5, 1984.
- AL-TAWFIQ, J. A.; WOOLS, K. K. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation of immunodeficiency virus infection. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 26, n. 6, p. 1403-1406, 1998.
- ANDREA A. et al. Ocular Sporotrichosis: 26 cases with bulbar involvement in a hyperendemic area of zoonotic transmission, ocular immunology and inflammation. **Ocul Immunol Inflamm**, London, v. 28(5), p. 764-771, 2020.
- ANDREWS, M. Y.; SANTELLI, C. M.; DUCKWORTH, O. W. Layer plate CAS assay for the quantitation of siderophore production and determination of exudation patterns for fungi. **J Microbiol Methods**, Amsterdam, v. 121, p. 41-43, 2016.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clin Microbiol Infect**, Paris, v. 15, n. 7, p. 651-655, 2009.
- BALLOU, E. R. et al. Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. **Nat Microbiol**, London, v. 2, n. 16238, 2016.

- BARELLE, C. J. et al. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. **Cell Microbiol**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 961–971, 2006.
- BAROUCH, D. H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. **Nature**, London, v. 455, n. 7213, p. 613–661, 2008.
- BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (aids). **Science**, New York, v. 220, n. 4599, p. 868–871, 1983.
- BARROS, M. B. L. et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 777–779, 2001.
- BARROS, M. B. L. et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 38, n. 4, p. 529–535, 2004.
- BARROS, M. B. L. et al. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Rev Panam Salud Publica**, Washington, v. 27, p. 455–460, 2010.
- BARROS, M. B. L. et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 3, p. 677–681, 2003.
- BARROS, M. B. L. et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 777–779, 2001.
- BATOOL, O. et al. Purification of hemolysin from *Aspergillus fumigatus* and study its cytotoxic effect on normal cell line (REF) in vitro. **EAJBS**, Cairo, v. 5, p. 35–43, 2013.
- BERRY, N. et al. Low level viremia and high CD4% predict normal survival in a cohort of HIV type-2-infected villagers. **AIDS Res Hum Retroviruses**, New York, v. 18, n. 16, p. 1167–1173, 2002.
- BEURMANN, L. H, GOUGEROT, H. VAUCHER, A. Sporotrichose expérimentale du chat. **C R Soc Biol**, Paris, v. 66, p. 338–340, 1909.
- BIANCARDI, A. L. et al. Multifocal choroiditis in disseminated sporotrichosis in patients with hiv/aids. **Retin Cases Brief Rep**; v. 11(1), p. 67–70, 2017.
- BISWAS, S.; VAN DIJCK, P.; DATTA, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. **Microbiol Mol Biol Rev**, Washington, v. 71, n. 2, 348–376, 2007.
- BOECHAT, J. S. et al. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro - Brasil, v. 113, n. 3, p. 185–196, 2018.
- CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, Oxford, v. 110, p. 90–109, 2016.

CARLOS, I. Z. et al. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 168, n. 1, p. 1-10, 2009.

CARMICHAEL, J. W. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic Hyphomycetes. **Can J Bot**, Ottawa, v. 40, n. 8, p. 1137-1173, 1962.

CARREIRA, A.; FERREIRA, L. M; LOUREIRO, V. Production of brown tyrosine pigments by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 90 n. 3, p. 372-379, 2001.

CASTELLI, M. et al. Novel Antifungal Agents: A Patent Review (2011 - Present). **Expert Opin Ther Pat**, London, v. 24, n. 3, p. 323–338, 2014.

CDC. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men New York City and California. **MMWR Morb Mortal Wkly**, Atlanta, v. 30, n. 25, p. 305-308, 1981.

CHAHINIAN, H.; SARDA, L. Distinction between Esterases and Lipases: Comparative Biochemical Properties of Sequence-Related Carboxylesterases. **Protein and Peptide Letters**, Schiphol, v. 16, n. 10, p. 1149–1161, 2009.

CHAKRABARTI, L. et al. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. **Nature**, London, v. 328, n. 6130, p. 543–547, 1987.

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

CHEATWOOD, J. L. et al. An outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a free-ranging population of pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*) in Florida. **J Wildl Dis**, Iowa, v. 39, n. 2, p. 329-337, 2003.

CHOAPPA, R. M. C.; OYARZO, P. I. V.; SILVA, L. C. C. Aislamiento de *Sporothrix pallida* complex en muestras clínicas y ambientales de Chile. **Rev Argent Microbiol**, Buenos Aires, v. 46, n. 4, p. 311–314, 2014.

CLAVEL, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with aids. **Science**, New York, v. 233, n. 4761, p. 343-346, 1986.

CLINKENBEARD, K. D. Diagnostic Cytology: Sporotrichosis. **The Compendium**, Newtown, v. 13, n. 2, p. 207-211; 1991.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard-second edition ed. Wayne, PA. USA: **Clinic and Lab Stand Instit**, v. 28, 2008a.

CLSI. Reference Method for Both Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard - Third Edition. CLSI DOCUMENT M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: **Clinic and Lab Stand Instit**, 2008b.

COELHO, R. A. **SUSCEPTIBILIDADE DE *Fonsecaea* spp. AOS ANTIFÚNGICOS: relações com a produção de melanina fúngica, associação de fármacos e aspectos clínicos dos pacientes.** Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2017.

COHEN, M. S. et al. Acute-HIV-1 Infection: Basic, clinical and public health perspectives. **N Engl J Med**, Boston, v. 364, n. 20, p. 1943–1954, 2011.

COLES, F. B. et al. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. **Am J Epidemiol**, Baltimore, v. 136, n. 4, p. 475-487, 1992.

COLOMBO, A. L.; GUMIARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CONTI-DIAZ, I. A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathol**, Dordrecht, v. 108, n. 2, p. 113-116, 1989.

COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v. 56, n. 6, p. 139-165, 2002.

COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun**, Washington, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

CRAWFORD, A.; WILSON, D. Essential Metals at the Host-Pathogen Interface: Nutritional Immunity and Micronutrient Assimilation by Human Fungal Pathogens. **FEMS Yeast Res**, Amsterdam, v. 15, n. 7, p. fov071, 2015.

CRUZ, R.; VIEILLE, P.; OSCHILEWSKI, D. Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfo-cutánea. **Revista chilena de infectología**, Santiago, v. 29, n. 4, p. 401–405, 2012.

DE BEER, Z. W. et al. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Stud Mycol**. Baarn, v. 83, p. 165-191, 2016.

DE SOUZA, P. C. et al. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. **J Fungi (Basel)**, Basel, v. 4, n. 125, p. 2-12, 2018.

DIAS, N. M. et al. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerg Infect Dis**, Atlanta, v. 17, n. 10, p. 1975-1976, 2011.

DIXON, D. M. et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 29, n. 6, p. 1106–1113, 1991.

DUBREUIL, J. D.; GIUDICE, G. D; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. **MMBR**, Washington, v. 66, n. 4, p. 617–629, 2002.

DUPONT, S. et al. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? **Evolution**, New York, v. 66, n. 9, p. 2961-2968, 2012.

ELAVARASHI, E. et al. Enzymatic and Nonenzymatic Virulence activities of dermatophytes on Solid Media. **J Clin Diagn Res**, India, v. 11, n. 2, p. 23-25, 2017.

ENGLES, J.; DESIR, J.; BERNSTEIN, J. M. A rose by any other name. **Skinmed**, Darien, v. 6, n. 3, p. 139-141, 2007.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. **Antimicrob agents chemother**, Washington, v. 61, n. 10, p. e01057-17, 2017.

FALCÃO, E. M. M. et al. Zoonotic sporotrichosis with greater severity in Rio de Janeiro, Brazil: 118 hospitalizations and 11 deaths in the last 2 decades in a reference institution. **Med Mycol**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 141-143, 2020.

FALCÃO, E. M. M. **Hospitalizações e mortalidade por esporotricose no Brasil com ênfase no estado do Rio de Janeiro: uma análise de 25 anos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

FALCÃO, E. M. M. et al. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015), **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 4, p. 1-7, 2019.

FERNANDES, G. F. et al. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, Austin, v. 4, n. 3, p. 241-149, 2013.

FERREIRA, C. P. et al. Pregnancy during a sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Gynaecol Obstet**, New York, v. 117, n. 3, p. 294-295, 2012.

FERRER, C. et al. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.

FICHMAN, V. et al. Sporotrichosis transmitted by a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). **J Eur Acad Dermatol Venereo**, Amsterdam, v. 32, p. 157-158, 2018.

FIGUEIREDO, C. C. et al. The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microb Pathog**, London, v. 36, n. 4, p. 177-188, 2004.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G. et al. Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence –related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*. **Mediators Inflamm**, Oxford, v. 2017, p. 8952878, 2017.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**. London, v. 69, n. 1, p. 18–28, 2008.

- FRANCESCONI, G. et al. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 171, n. 5, p. 349-354; 2011.
- FREITAS, D. F. S et al. Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. **Virulence**, Austin, v. 6, n. 2, p. 112-120, 2015a.
- FREITAS, D. F. S, et al. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Med Mycol**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 170-178, 2012.
- FREITAS, D. F. S, et al. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 8, n. 8, p. e3110, 2014.
- FREITAS, D. F. S, et al. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 50, n. 1, p. 453, 2010.
- FREITAS, D. F. et al. Sporotrichosis in the Central Nervous System Caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 61, n. 4, p. 663–664, 2015b.
- FREITAS, D. F. S. Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos associados à esporotricose. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2014.
- GALLO, R. C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with aids and at risk for aids. **Science**, New York, v. 224, n. 4648, p. 500–503, 1984.
- GHANNOUM, M. A. et al. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**. Washington, v. 13, n. 1, p. 122-43, 2000.
- GHOSH, A. et al. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**. Berlin. v. 45, n. 11-12, p. 449-454, 2002.
- GONÇALVES, D. S. et al. Unravelling the interactions of the environmental host *Acanthamoeba castellanii* with fungi through the recognition by mannose binding proteins. **Cell Microbiol**, Oxford, v. 21, n. 10, p. e13066, 2019.
- GONSALES, F. F. et al. Feline *Sporothrix* spp. detection using cell blocks from brushings and fine-needle aspirates: Performance and comparisons with culture and histopathology. **Vet Clin Pathol**, Baton Rouge, v. 48, n. 1, p. 143-147, 2019.
- GOVENDER, N. P. et al. An outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis among mine-workers in South Africa. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e0004096, 2015.
- GREENE, W. C. A history of aids: Looking back to see ahead. **Eur J Immunol**, Weinheim, v. 37, p. 94–102, 2007.

- GREMIÃO, I. D. F. et al. A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS Pathog**, San Francisco, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.
- GUARRO, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. **Enferm Infec Microbiol Clin**, Barcelona, v. 30, p. 33-39, 2012.
- GUIMARAES, A. J. et al. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. **Microbiol Res**, Jena, v. 193, p. 30-38, 2016.
- GUTIERREZ-GALHARDO, M. C, et al. *Sporothrix schenckii* meningitis in aids during immune reconstitution syndrome. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, London, v. 81, p. 696-699, 2010.
- GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. et al. Epidemiological aspects of sporotrichosis epidemic in Brazil. **Current Fungal Infection Reports**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p. 238–245, 2015.
- GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. et al. Erythema multiforme associated with sporotrichosis **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 507-509, 2005.
- GUYADER, M. et al. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. **Nature**, London, v. 326, n. 6114, p. 662–669, 1987.
- HAJJEH, R. et al. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, Oxford, v. 176, n. 2, p. 499–504, 1997.
- HAMEL, D. J. et al. Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: Changes in HIV diversity. **AIDS Res Hum Retroviruses**, Larchmont, v. 23, v. 10, p. 1189–1196, 2007.
- HANSBERG, W.; SALAS-LIZANA, R; DOMINGUES, L. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 525, n. 2, p. 170-180, 2012.
- HAY, R. J; MORRIS-JONES R. Outbreaks of sporotrichosis. **Curr Opin Infect Dis**, Hagerstown, v. 21, p. 119-121, 2008.
- HEKTON, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. **J Exp Med**, New York, v. 5, n. 1, p. 77-91, 1900.
- HENRICI, A. T. An Endotoxin from *Aspergillus Fumigatus*. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 4, n. 36, p. 319-338, 1939.
- HIRANO, M. et al. A case of feline sporotrichosis. **J Vet Med Sci**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 283-284, 2006.
- HIRUMA, M. et al. Urease gene of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii*. **The Journal of dermatology**, London, v. 40, n. 2, p. 111-113, 2013.

- HLADIK, F. MCEL RATH, M. J. Setting the stage: Host invasion by HIV. **Nat Rev Immunol**, London, v. 8, n. 6, p. 447–457, 2008.
- HOLZBERG, M; WILLIAM, M. A. Hydroxamate Siderophore Production by Opportunistic and Systemic Fungal Pathogens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 40, n. 3, p. 1134–1139, 1983.
- HOOG, G. S.; GUARRO, J; FIGUERAS, M. J. Atlas of Clinical Fungi. 2 edition. Utrecht: **ASM Press**, Washington, p. 1160, 2001.
- HUET, T. et al. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. **Nature**, London, v. 345, p. 356–359, 1990.
- ISHIZAKI, H. et al. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 19–26, 2009.
- KANTARCIOGLU, A. S.; YÜCEL, A. Phospholipase and Protease Activities in Clinical *Candida* Isolates with Reference to the Sources of Strains. **Mycoses**, Berlin, v. 45, n. 5–6, p. 160–165, 2002.
- KATNER, S. N. et al. *Caenorhabditis elegans* as a model system to identify therapeutics for alcohol use disorders. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 365, p. 7–16, 2019.
- KAUFFMAN, C. A. et al. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 45, p. 1255–1265, 2007.
- KAUFFMAN, C. A. Sporotrichosis. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 29, p. 231–236, 1999.
- KEISER, P.; WHITTLE, D. Sporotrichosis in human immunodeficiency virus-infected patients: report of a case. **Rev Infect Dis**, Chicago, v. 13, p. 1027–1028, 1991.
- KWON-CHUNG, K. J; BENNETT, J. E. Sporotrichosis In: **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 707–729, 1992.
- KWON-CHUNG, K. J.; HILL, W. B.; BENNETT, J. E. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 13, n. 2, p. 383–387, 1981.
- LACAZ, C. S. Esporotricose e outras micoses gomosas. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. et al. (Ed.). **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 479–497.
- LACAZ, C. S, et al. Guia para identificação: Fungos; actinomicetos e algas de interesse médico. **São Paulo: Sarvier**, 1998.
- LARONE, D. H. Medically important fungi: a guide to identification. 4th ed. Washington, Lea & Febiger. p. 707–729, 1992.

- LIMA, O. C. et al. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. **Infect Immun**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6874-6880, 2001.
- LIN, J. et al. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* clinical isolates from China. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 148, n. 2, p. 69-72, 1999.
- LOPES BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **An Acad Bras Cienc**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.
- LOPES-BEZERRA, L. M. et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Med Mycol**. Oxford, v. 56, n. 1, p. 126–143, 2018.
- LUO, G. et al. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2971-2874, 2001.
- LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. **Rev Med S Paulo**, São Paulo, v. 21, p. 433-450, 1907.
- LYON, G. M. et al. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 36, n. 1, p. 34–39; 2013.
- MACEDO, P. M. et al. New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 719-724, 2015.
- MADRID, I. M. et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 173, n. 4, p. 265-273, 2012.
- MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a Hemolytic Factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 11, p. 5154–5156, 1994.
- MARIMON, R. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 44, n. 9, p. 3251-3256, 2006.
- MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 45, n. 10, p. 3198-3206, 2007.
- MARIMON, R. et al. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Med Mycol**. Oxford, v. 46, n. 6, p. 621-625, 2008.
- MARIO, D. N. et al. *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**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 554-557, 2017.
- MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 449–460, 2006.

MARTORELL, P. et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. **J Agric Food Chem**, Washington, v. 59, n. 5, p. 387-401, 2020.

MCGUINNESS, S. L. et al. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, northern territory, Australia. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 16, p. 1-7, 2016.

MENDONÇA, L. et al. Polymorphism of *Sporothrix schenckii* surface polysaccharides as a function of morphological differentiation. **Biochemistry**, Washington, v. 15, p. 2423– 2431, 1976.

MENDONÇA-HAGLER, L. C. et al. Deoxyribonucleic acid base composition and hybridization studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis* species. **Infect Immun**, Washington, v. 9, n. 5, p. 934-938, 1974.

MESA-ARANGO, A. C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 40, n. 8, p. 3004-3011, 2002.

MEYER, E. M. et al. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, Lancaster, v. 100, n. 4, p. 647–661, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico de HIV e Aids 2019. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hivaids-2019>. Acesso em: 17 dez. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação nacional de medicamentos essenciais. Formulário terapêutico nacional: RENAME/ Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília: **Ministério da Saúde**. Brasil. 7a ed, 2010.

MIRAMÓN, P.; LORENZ, M. C. A feast for *Candida*: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS Pathog**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e1006144, 2017.

MITCHELL, T. G.; XU, J. Molecular methods to identify pathogenic fungi. In: HOWARD, D. H. (Ed.) **Pathogenic fungi in humans and animals**, v. 16, p. 677-702, 2003.

MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol rev**, Washington, v. 59, n. 3, p. 451–480, 1995.

MORA-CABRERA, M. et al. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii*. **Med Mycol**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 439-444, 2001.

- MORAES, et al. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, vol. 5, p. 98, 2012.
- MOREIRA, J. A.; FREITAS, D. F.; LAMAS, C. C. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. **Infect**, München, v. 43, n. 3, p. 267-276, 2015.
- MOUSSA, T. A. A. et al. Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. **J Med Microbiol**, Irvine, v. 66, n. 5, p. 560–569, 2017.
- NAKAGAWA, Y. et al. The Expression of the Pathogenic Yeast *Candida albicans* Catalase Gene in Response to Hydrogen Peroxide. **Microbiol and Immunol**, New York, v. 43, n. 7, p. 645– 651, 1999.
- NAKAMURA, K. et al. Microbial Resistance in Relation to Catalase Activity to Oxidative Stress Induced by Photolysis of Hydrogen Peroxide. **Microbiol and Immunol**, New York, v. 56, n. 1, p. 48–55, 2012.
- NAYAKA, A. P.; GREEN, B. J.; BEEZHOLD, D. H. Fungal hemolysins. **Med Mycol**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 1–16, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª Ed. **Artmed**, 2014.
- NETO, R. J. P. et al. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida: relato de caso. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 32, p. 57–61, 1999.
- NEVITT, T.; THIELE, D. J. Host Iron Withholding Demands Siderophore Utilization for *Candida glabrata* to Survive Macrophage Killing. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e1001322, 2011.
- NORIEGA, C.T. *Sporothrix schenckii*: culturas en diferentes suelos. **Rev Latinoam Micol**, v. 35, p. 191-194, 1993.
- NOSANCHUK, J. D; OVALLE, R; CASADEVALL, A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **J Infect Dis**, v. 183, n. 7, p. 1093-1099, 2001.
- OLIVEIRA, L. C. et al. Diagnostic performance of mycologic and serologic methods in a cohort of patients with suspected sporotrichosis. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 36, n. 2, p. 61–65, 2019.
- OLIVEIRA, M. M. et al. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 50, n. 6, p. 2159-62, 2012.
- OLIVEIRA, M. M. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Res Microbiol**, Jena, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.

OLIVEIRA, M. M. E, et al. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathol**, Dordrecht, v. 169, n. 5, p. 359-363, 2010.

OROFINO-COSTA, R. et al. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 606-620, 2017.

PADHYE, A. A, et al. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 30, n. 9, p. 2492-2494, 1992.

PAIXAO, A. G. et al. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced aids. **Res Ther**, London, v. 12, n. 16, p. 1-6, 2015.

PAPPAS, P. G, et al. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 30, n. 1, p. 65-70, 2000.

PARK, M.; DO, E.; JUNG, W. H. Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. **Mycobiol**, Seoul, v. 41, n. 2, p. 67-72, 2013.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 8, n. 5, p. 340-349, 2010.

PEREIRA, S. A. et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **J Feline Med Surg**, London, v. 13, n. 3, p. 220-223, 2011.

PEREIRA, S. A. et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 3, p. 392-393, 2014.

PERÓN, M. L. F.; TEIXEIRA J. J. V; et al. Epidemiologia e etiologia das dermatomicoses superficiais e cutâneas na Região de Paranaíba- Paraná, Brasil. **Rev Bras Anal Clin**, Brasília, v. 37, p. 77-81, 2005.

POPOVIC, M. et al. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with aids and pre-aids. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 497-500, 1984.

POPPER, S. J. et al. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: Low virus production in vivo. **J Virol**, Baltimore, v. 74, n. 3, p. 1554-1557, 2000.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

QUINTAL, D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. **J Cutan Med Surg**, Hamilton, v. 4, n. 1, p. 51-54, 2000.

QUINTELLA, L. P et al., Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **J Cutan Pathol, Rio De Janeiro** v. 38, n. 1, p. 25-32, 2011.

- QUIROS, P. M.; LANGER, T.; LOPEZ-OTIN, C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, London, v. 16, n. 6, p. 345-359, 2015.
- RAMIREZ-SOTO, et al. Ecological Determinants of Sporotrichosis Etiological Agents. **J Fungi**, Basel, v. 4, n. 3, p. 95, 2018.
- RAMOS-E-SILVA, M. et al. Sporotrichosis. **Clin Dermatol**. v. 25, p. 181-187, 2007.
- RAMOS-E-SILVA, M. et al. Systemic mycoses in immunodepressed patients (aids). **Clinics in Dermatology**, Wilmington, v. 30, n. 6, p. 616–627, 2012.
- RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **MMBR**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.
- RODRIGUES, A. M. et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, Dordrecht, doi.org/10.1007/s11046-020-00425-0, 2020.
- RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A. Comparison of Secretory Proteinases from Different Strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 20, n. 3, p. 233–244, 1982.
- RUIZ-CAMPOS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso Sistémico, **Enferm Infecc Microbiol Clin**, Barcelona, v. 27, p. 353-362, 2009.
- SANTOS, A. L. S. Aspartic Proteases of Human Pathogenic Fungi Are Prospective Targets for the Generation of Novel and Effective Antifungal Inhibitors. **Current Enzyme Inhibition**, Sharjah, v. 7, n. 2, p. 96–118, 2011.
- SASAKI, A. A, et al. Chromosomal polymorphism in the *Sporothrix schenckii* complex. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 1, e86819, 2014.
- SCHALLER, M. et al. Hydrolytic Enzymes as Virulence Factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v. 48, n. 6, p. 365-377, 2005.
- SCHENCK B. R. Refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. **Bull Johns Hopkins Hosp**, Baltimore, v. 9, p. 286-290, 1898.
- SCHUBACH, A. O. et al. Esporotricose primária da mucosa nasal. **Rev Soc Bras Med Trop**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 222, 2003.
- SCHUBACH, T. M. P. et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Med Mycol**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 87-92, 2006.
- SCHUBACH, T. M. P. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1988-2001). **J Am Vet Med Assoc**, Ithaca, v. 224, p. 1623-1629, 2004.
- SCHUBACH, T. M. P, et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Med Mycol**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 147-149, 2001.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B. L.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis: **Curr Opin Infect Dis**, Hagerstown, v. 21, n. 2, p. 129–133, 2008.

SCHUBACH, A. et al. Cat transmitted Sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, Atlanta, v. 11, n. 12, p. 1952–1954, 2005.

SCHWARTZ, D. A. *Sporothrix* tenosynovitis—differential diagnosis of granulomatous inflammatory disease of the joints. **J Rheumatol**, Toronto, v. 16, p. 550–553, 1989.

SCOTT, E. M; MUCHMORE, H. Immunoblot Analysis of Antibody Responses to *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 27, n. 2, p. 300-304, 1989.

SENEVIRATNE, C. et al. Architectural Analysis, Viability Assessment and Growth Kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Biofilms. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 54, n. 11, p. 1052–1060, 2009.

SGARBI, D. B. et al. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 9-14, 1997.

SHARP, P. M, et al. Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. **Aids**, London, v. 8, p. S27–S42, 1994.

SILVA, M. B. T. et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 10, p. 1867-1880, 2012.

SILVA, C. H. P. M. Bacteriologia: Um texto ilustrado. 1. ed. **Eventos**, Teresópolis, 1999.

SINGER, J. I.; MUNCIE, J. E. Sporotrichosis. Etiologic considerations and report of additional cases from New York. **New York State J Med**, Pennsylvania, v. 52, n. 17:1, p. 2147-2153, 1952.

SINGHAI, M. et al. Primary pulmonary sporotrichosis in a sub-Himalayan patient. **J Lab Physicians**, Mumbai, v. 4, p. 48-49, 2012.

SINGULANI, J. L. et al. Applications of Invertebrate Animal Models to Dimorphic Fungal Infections. **J Fungi (Basel)**, Basel, v. 19, n. 4, p. E118, 2018.

SONG, Y. et al. Infant Sporotrichosis in northeast China: a report of 15 cases. **Int J Dermatol**, Philadelphia, v. 50, p. 522-529, 2011.

STANISZEWSKA, M.; MAŁGORZATA, B.; ZBIGNIEW, O. Contribution of Aspartic Proteases in *Candida* Virulence. Protease Inhibitors against *Candida* Infections. **Current Protein & Peptide Science**, Hilversum, v. 18, n. 10, p. 1050-1062, 2016.

STEENBERGEN, J. N. et al. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infect Immun**, Washington, v. 72, n. 6, p. 3478-3488, 2004.

- STEHR, F. et al. Expression Analysis of the *Candida albicans* Lipase Gene Family during Experimental Infections and in Patient Samples. **FEMS yeast research**, Amsterdam, v. 4, n. 4–5, p. 401–408, 2004.
- SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 9, p. 737–748, 2011.
- SVOBODA, A.; TRUJILLO-GONZALEZ, A. *Sporothrix schenckii*-a freeze-fracture study. **J Basic Microbiol**, Berlin, v. 30, p. 371-378, 1990.
- TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. **Med Mycol**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 21-27, 1998.
- TANG, M. M. et al. Cutaneous sporotrichosis: a six-year review of 19 cases in a tertiary referral center in Malaysia. **Int J Dermatol**, Philadelphia, v. 51, n. 6, p. 702-708, 2012.
- TATEISHI, T. et al. Karyotyping by PFGE of clinical isolates of *Sporothrix schenckii*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 147-154, 1996.
- TEIXEIRA, M. M. et al. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC genomics**, London, v. 15, p. 1-22, 2014.
- THOMAZ, L. et al. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 138-146, 2015.
- TORRES-GUERRERO, H. Ploidy Study in *Sporothrix schenckii*. **Fung Genet and Biol**, Orlando, v. 27, n. 1, p. 49-54, 1999.
- TSANG, P. W. Differential Phytate Utilization in *Candida* Species. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 172, n. 6, p. 473-479. 2011.
- UNAIDS / UNICEF. Estatísticas globais sobre HIV 2019. Disponível em: <http://www.unaids.org>. Acesso em 12.02.2020.
- VAN DER LOEFF, M. F. et al. Sixteen years of HIV surveillance in a West African research clinic reveals divergent epidemic trends of HIV-1 and HIV-2. **Int J Epidemiol**, London, v. 35, n. 5, p. 1322– 1328, 2006.
- VEEN, M.; STAHL, U.; LANG, C. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 87-95, 2003.
- VESPER, S. J.; VESPER, M. J. Possible Role of Fungal Hemolysins in Sick Building Syndrome. **Adv Appl Microbiol**, New York, v. 55, p. 191-213, 2004.
- VILELA, R. et al. Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 24, n. 2, p. 161-163, 2007.

WEINBERG, E. D. Roles of metallic ions in host parasite interactions. **Bacteriol Rev**, Washington, v. 30, n. 136-151, 1966.

WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, New York, v. 163, p. 150-160, 1969.

YEGNESWARAN, P. P. et al. Zoonotic sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. **Int J Dermatol**, Philadelphia, v. 48, p. 1198-1200, 2009.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. et al. **New diagnostic applications in sporotrichosis. In: KHOPKAR, U.** Skin Biopsy Perspectives, Rijeka: In Tech; p. 53-72, 2011.

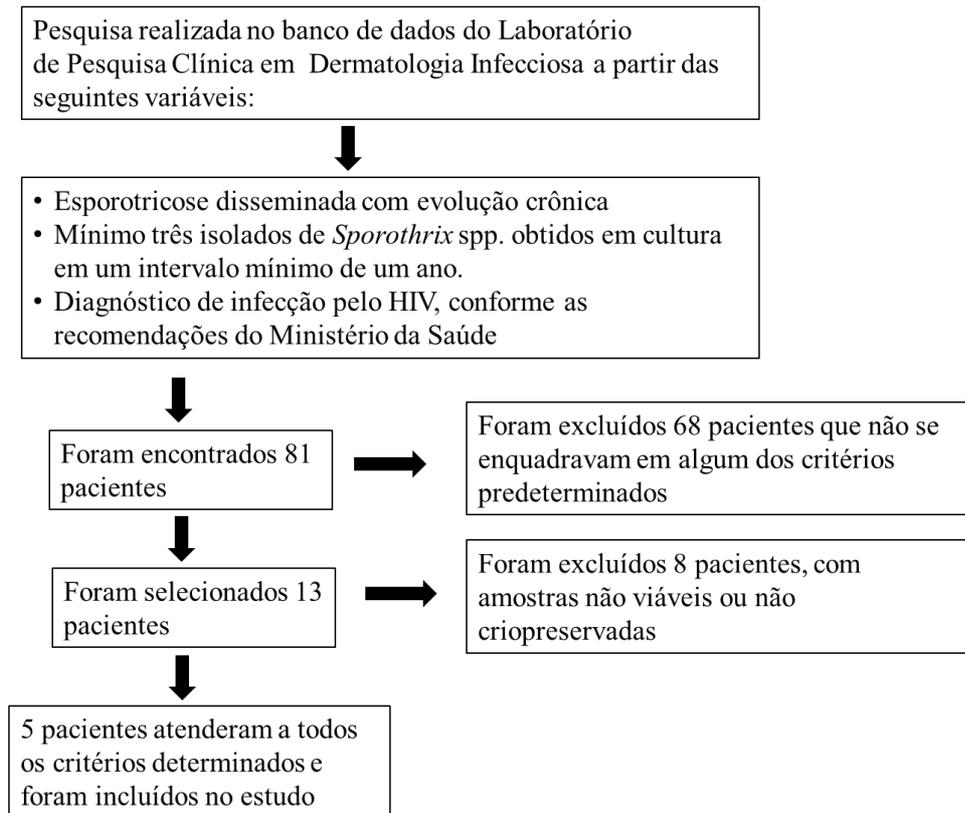
ZANPHORLIN, L. M. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp, **Process Biochemistry**, Barking, v. 46, p. 2137-2143, 2011.

ZHANG, Z. et al. Variation in genotype and higher virulence of a strain of *Sporothrix schenckii* causing disseminated cutaneous sporotrichosis. **Mycopathol**, Dordrecht, v. 172, n. 6, p. 439-446, 2011.

ZHANG, M. et al. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e0007219, 2019.

ZHANG, Y. et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia**, Leiden, v. 35, n. 1, p. 1–20, 2015.

ZOHRI, A. et al. Impact of Enzymes and Toxins Potentiality of Four *Aspergillus* Species to Cause Aspergillosis. **Biology and Medicine**, Aligarh, v. 9, n. 5, p. 1-7, 2017.

APÊNDICE A - Fluxograma da pesquisa de amostras viáveis para o estudo.

ANEXO A - Intervalo de concentração inibitória mínima e concentração efetiva mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) utilizadas nesse estudo.

Number 16

M38-A2

Table 4. Recommended MIC or MEC Limits for QC and Reference Strains for Broth Dilution Procedures. (Reprinted with permission from the authors and the American Society for Microbiology.)

Organism	Purpose	Antifungal Agent	MIC Range (µg/mL)	Mode	% of MICs Within Range	Incubation Times
<i>Paecilomyces variotii</i> ATCC® MYA-3630 ^{6,9} (see note 4)	QC	Amphotericin B	1-4	2.0	100.0	48 hours
		Itraconazole	0.06-0.5	0.12	100.0	48 hours
		Voriconazole	0.015-0.12	0.06	100.0	48 hours
		Posaconazole	0.03-0.25	0.06	99.5	48 hours
	Reference (MEC)	Anidulafungin	≤0.015	N/A	100.0	24 hours
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	91.7	48 hours
		SFC	0.12-0.5	0.25	97.9	48 hours
		Fluconazole	1.0-4.0	2.0	98.1	48 hours
		Itraconazole	0.12-0.5	0.25	97.5	48 hours
		Ketoconazole	0.06-0.5	0.12	98.3	48 hours
		Voriconazole	0.03-0.25	0.06	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.03-0.25	0.06	98.3	48 hours
		Posaconazole	0.06-0.25	0.12	98.8	48 hours
		Anidulafungin	0.5-2.0	1.0	95.0	48 hours
		Caspofungin	0.5-4.0	1.0	92.9	48 hours
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258 ^{27,29}	QC	Amphotericin B	1.0-4.0	2.0	100.0	48 hours
		SFC	8.0-32	16	99.6	48 hours
		Fluconazole	16-128	32	100.0	48 hours
		Itraconazole	0.25-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Ketoconazole	0.25-1.0	0.5	99.6	48 hours
		Voriconazole	0.12-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.25-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Posaconazole	0.12-1.0	0.5	99.6	48 hours
		Anidulafungin	0.03-0.12	0.06	97.5	48 hours
		Caspofungin	0.25-1.0	0.5	97.5	48 hours
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC® 204304 ^{2,4} (see note 3)	Reference	Amphotericin B	0.5-4	ND	100.0	48 hours
		Itraconazole	0.25-0.5	ND	100.0	48 hours
		Voriconazole	0.5-4	ND	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.5-4	ND	100.0	48 hours
		Posaconazole	0.06-0.5	ND	100.0	48 hours
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® MYA-3626 ^{6,9} (see note 4)	Reference	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	98.7	48 hours
		Itraconazole	0.25-2.0	1.0	95.7	48 hours
		Voriconazole	0.25-1.0	0.5	100.0	48 hours
	Reference (MEC)	Anidulafungin	≤0.015	N/A	100.0	24 hours

ANEXO B – Intervalo da concentração inibitória mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258.

M27 A3

<u>MIC (µg/mL) Ranges for Microdilution Tests</u>							
Organism	Antifungal Agent	24-Hour		% Within	48-Hour		% Within
		Range	Mode	Range	Range	Mode	Range
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC [®] 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97.1	0.5-4.0	2.0	91.7
	Anidulafungin	0.25-2.0	1.0	95.0	0.5-2.0	1.0	95.0
	Caspofungin	0.25-1.0	0.5	96.7	0.5-4.0	1.0	92.9
	Flucytosine (5-FC)	0.06-0.25	0.12	99.2	0.12-0.5	0.25	97.9
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98.2	1.0-4.0	2.0	98.1
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	95.8	0.12-0.5	0.25	97.5
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	97.5	0.06-0.5	0.12	98.3
	Micafungin	0.5-2	1	100.0	0.5-4	1	100.0
	Posaconazole	0.06-0.25	0.12	96.7	0.06-0.25	0.12	98.8
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	95.8	0.03-0.25	0.06	98.3
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100.0	0.03-0.25	0.06	100.0
<i>Candida krusei</i> ATCC [®] 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100.0	1.0-4.0	2.0	100.0
	Anidulafungin	0.03-0.12	0.06	97.9	0.03-0.12	0.06	97.5
	Caspofungin	0.12-1.0	0.5	98.8	0.25-1.0	0.5	97.5
	Flucytosine (5-FC)	4.0-16	8.0	97.5	8.0-32	16	99.6
	Fluconazole	8.0-64	16	100.0	16-128	32	100.0
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	95.8	0.25-1.0	0.5	100.0
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	95.4	0.25-1.0	0.5	99.6
	Micafungin	0.12-0.5	0.25	99.6	0.12-0.5	0.25	99.0
	Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100.0	0.12-1.0	0.5	99.6
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93.3	0.25-1.0	0.5	100.0
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98.3	0.12-1.0	0.5	100.0