

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *SPOROTHRIX
SCHENCKII* E AVALIAÇÃO DA ANTIFUNGICOTERAPIA
NA ESPOROTRICOSE EXPERIMENTAL EM MODELO
MURINO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paulo Guilherme Markus Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *SPOROTHRIX SCHENCKII* E
AVALIAÇÃO DA ANTIFUNGICOTERAPIA NA
ESPOROTRICOSE EXPERIMENTAL EM MODELO MURINO**

por

Paulo Guilherme Markus Lopes

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle da Qualidade e Avaliação Biofarmacêutica de Insumos e Medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2008

© 2008

Todos os direitos autorais reservados a Paulo Guilherme Markus Lopes. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço eletrônico: markuspg@smail.ufsm.ufsm.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix schenckii* E
AVALIAÇÃO DA ANTIFUNGICOTERAPIA NA ESPOROTRICOSE
EXPERIMENTAL EM MODELO MURINO**

elaborada por
Paulo Guilherme Markus Lopes

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Jânio Morais Santurio, Dr. (UFSM)

Margareth Linde Athayde, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 19 de Março de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Paulo e Maristela

Pelo apoio constante e incondicional em perseverar.
Agradeço pelos valiosos ensinamentos, que a vida deve ser pautada pela firmeza de caráter, amizade, honestidade e solidariedade.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, Paulo, Maristela, Marlo e Carla, por representarem a essência de tudo que realmente importa e agrega valor inestimável às nossas vidas.

Ao meu orientador e grande amigo, prof. Sydney Hartz Alves, que ainda na graduação me apresentou à microbiologia, com a maestria que lhe é peculiar, direcionando meu interesse pela ciência. Meu muito obrigado pelas orientações, ensinamentos e oportunidades providas pelo competente pesquisador e professor, assim como as conversas descontraídas, piadas e risadas no convívio diário entre amigos.

À Dani, recentemente Dr^a. Daniela Brayer Pereira, uma amiga realmente formidável, por toda disponibilidade e desprendimento em ajudar e me ensinar muito nesta pesquisa. Agradeço-te minha “co-orientadora”.

Ao prof. Jânio Morais Santurio, pela amizade, troca de idéias, apoio, e pelos papos extremamente construtivos na hora do cafezinho.

Aos colegas e amigos do LAPEMI, Juliana, Ayrton, Isabel, Régis, João, Stela, Patrique, Flávio, Vanessa, Tarcieli, Tatiana, Alessandra, Débora, Patrícia, Érico, Liliane, valeu pela parceria! As fases na vida cumprem seus ciclos, mas os amigos permanecem.

Aos amigos do DEMIP, prof^a. Bárbara, prof^a. Cybele, prof. Mario, prof. Maneco, prof. Géder, prof. Paulo, prof^a. Luciane, Aline, Jarí, Vilson, pelo apoio e amizade nos dois anos que atuei como docente neste departamento.

Aos colegas de mestrado, pela troca de conhecimentos, convívio e amizade.

À prof^a. Clarice Rolim, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e aos demais professores pela amizade e disponibilidade para esclarecimentos dos conhecimentos transmitidos.

À Sandra, pela sua amizade e grande ajuda logística no laboratório.

Enfim, minha imensa gratidão a todos aqueles que de alguma forma interferiram positivamente para que este trabalho pudesse ser concretizado.

“EXISTEM APARENTEMENTE DUAS LEIS CONTRADITÓRIAS QUE REGEM A HISTÓRIA DA HUMANIDADE. UMA DE SANGUE E MORTE, QUE SUSTENTA DIA A DIA A INVENÇÃO DE NOVOS ENGENHOS DE GUERRA, LEVANDO OS POVOS À BATALHA; E UMA LEI DE PAZ, DE TRABALHO E DE SAÚDE, QUE TEM POR FINALIDADE LIBERAR O HOMEM DE SEUS TEMORES. UMA PROCURA APENAS CONQUISTAS VIOLENTAS E A OUTRA CONSAGRA AO ALÍVIO DOS SOFRIMENTOS E AO BEM-ESTAR DA HUMANIDADE”

LOUIS PASTEUR

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix schenckii* E AVALIAÇÃO DA ANTIFUNGICOTERAPIA NA ESPOROTRICOSE EXPERIMENTAL EM MODELO MURINO

AUTOR: PAULO GUILHERME MARKUS LOPES

ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de Março de 2008.

A aprovação do protocolo M38-A pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que estabelece normas padronizadas para avaliação de suscetibilidade *in vitro* de fungos filamentosos, tem expandido o conhecimento inerente aos aspectos de suscetibilidade destes fungos frente aos antifúngicos convencionalmente utilizados na prática clínica. Neste estudo, quarenta e um isolados clínicos de *Sporothrix schenckii*, oriundos de humanos e animais, foram avaliados quanto à suscetibilidade *in vitro* frente ao miconazol, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, terbinafina, caspofungina e anfotericina B. Utilizou-se a metodologia de microdiluição em placa estabelecida pelo protocolo M38-A. Os isolados demonstraram maior suscetibilidade *in vitro* frente à terbinafina (CIM₉₀= 0,25 µg/mL) e menor suscetibilidade ao fluconazol (CIM₉₀= 128 µg/mL). Trinta e cinco isolados (85,37%) apresentaram CIM < 1,0 µg/mL frente ao itraconazol; em três isolados evidenciou-se CIM > 16 µg/mL. Quanto ao voriconazol (CIM₉₀= 16 µg/mL) e a caspofungina (CIM₉₀= 32 µg/mL), os valores de CIM encontrados demonstram um perfil de reduzida suscetibilidade dos isolados testados. As CIMs determinadas frente à anfotericina B (CIM₉₀ = 1 µg/mL) puderam evidenciar um perfil de sensibilidade dos isolados avaliados neste estudo. Na avaliação da esporotricose disseminada em modelo murino, a eficácia de tratamento com itraconazol, voriconazol e anfotericina foram determinadas e comparadas. A antifungicoterapia com anfotericina B evidenciou maior efetividade em relação ao grupo controle (p<0,001) e aos demais tratamentos (p<0,05). Através da subdivisão dos grupos de camundongos por sexo, pôde ser observada uma variação na extensão da infecção disseminada por *Sporothrix schenckii* com maior comprometimento das vísceras dos machos (p<0,05).

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*, antifúngicos, suscetibilidade, *in vitro*, *in vivo*

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *Sporothrix schenckii* AND EVALUATION OF ANTIFUNGAL THERAPY IN A MURINE MODEL OF SYSTEMIC SPOROTRICHOSIS

AUTHOR: PAULO GUILHERME MARKUS LOPES

ADVISER: SYDNEY HARTZ ALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de Março de 2008.

The approval of the protocol M-38A by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), which established standardized procedures for the evaluation of the *in vitro* susceptibility of moulds, has expanded the inherent knowledge about the fungi susceptibility against the most commonly used antifungal drugs. In this study, forty-one *Sporothrix schenckii* clinical isolates from both animals and humans have had their *in vitro* susceptibility against miconazole, ketoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin and amphotericin B tested, by the microdilution method, established by the protocol M-38A. The isolates have shown the highest *in vitro* susceptibility to terbinafine (MIC₉₀= 0.25 µg/mL) and the lowest to fluconazole (MIC₉₀= 128 µg/mL). Thirty-five isolates (85.37%) have shown MIC < 1.0 µg/mL against itraconazole while three isolates have shown MIC > 16 µg/mL. Regarding voriconazole (MIC₉₀= 16 µg/mL) and caspofungin (MIC₉₀= 32 µg/mL), the MIC values found demonstrate a profile of low susceptibility of the tested isolates. The MIC values found for amphotericin B (MIC₉₀ = 1 µg/mL), have shown a profile of sensibility of the isolates evaluated in this study. In the evaluation of disseminated sporotrichosis in murine models, the treatment efficacy with itraconazole, voriconazole and amphotericin B were determined and compared. The antifungal therapy with amphotericin B have shown higher effectiveness compared to the control group (p<0.001) and to the other treatments (p<0.05). Through the subdivision of the mice's groups by gender, could be observed a variation in the extension of *Sporothrix schenckii* disseminated infection, with males showing more damaged organs (p<0.05).

Keywords: *Sporothrix schenckii*, antifungal, susceptibility, *in vitro*, *in vivo*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 – Distribuição dos animais em grupos separados por sexo e tipo de tratamento.....	45
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de 8 antifúngicos frente a 41 isolados clínicos de <i>S. schenckii</i>	49
TABELA 2 - Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> frente aos antifúngicos azólicos, com base nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs).....	52
TABELA 3 - Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> frente à terbinafina, caspofungina e anfotericina B, com base nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs).....	53
TABELA 4 - Parâmetros de suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> frente a 8 antifúngicos.....	54
TABELA 5 - Cultivos positivos de órgãos de camundongos infectados com <i>S. schenckii</i> e não tratados com antifúngicos (grupos controle).....	55
TABELA 6 - Cultivos positivos de órgãos de camundongos infectados com <i>S. schenckii</i> após tratamento com itraconazol.....	56
TABELA 7 - Cultivos positivos de órgãos de camundongos infectados com <i>S. schenckii</i> após tratamento com voriconazol.....	57
TABELA 8 - Cultivos positivos de órgãos de camundongos infectados com <i>S. schenckii</i> após tratamento com anfotericina B.....	58
TABELA 9 - Relação entre os diferentes tratamentos antifúngicos com o número de órgãos evidenciando cultivos positivos para <i>S. schenckii</i>	60
TABELA 10 - Percentuais de positividade em cultivos fúngicos obtidos de necropsias de camundongos infectados com <i>S. schenckii</i> e submetidos a diferentes terapêuticas fúngicas.....	61
TABELA 11 - Valores de (p) encontrados para associação entre sexo dos camundongos com o número de órgãos evidenciando cultivos positivos para <i>S. schenckii</i> , frente a diferentes tratamentos.....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Histórico.....	17
2.2 Etiologia e epidemiologia	18
2.3 Esporotricose em animais	21
2.4 Esporotricose em humanos.....	22
2.5 Citologia e histopatologia	24
2.6 Resposta imunológica do hospedeiro.....	25
2.7 Agentes antifúngicos.....	26
2.8 Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos.....	31
2.9 Fatores de virulência.....	34
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Ensaio <i>in vitro</i> para avaliação de suscetibilidade.....	40
4.1.1 Microrganismos.....	40
4.1.2 Agentes antifúngicos.....	40
4.1.3 Solubilização e preparo das soluções estoques	40
4.1.4 Concentrações testadas	41
4.1.5 Meio de cultivo	41
4.1.6 Preparo das diluições dos antifúngicos nas placas de microdiluição	42
4.1.7 Preparação dos inóculos	42
4.1.8 Inoculação nas placas de microdiluição	43
4.1.9 Incubação.....	43
4.1.10 Leitura dos resultados.....	43
4.2 Ensaio <i>in vivo</i> para avaliação da eficácia de antifungoterapia na esporotricose experimental em modelo murino	44
4.2.1 Isolado.....	44
4.2.2 Inóculo.....	44
4.2.3 Animais.....	44
4.2.4 Antifúngicos utilizados.....	45
4.2.5 Administração dos tratamentos	46
4.2.6 Avaliação micológica dos órgãos de animais necropsiados	46
4.2.7 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	48
5.1 Perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>S. schenckii</i> frente aos antifúngicos azólicos, terbinafina, caspofungina e anfotericina B.....	48
5.1.1 Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> aos imidazólicos: miconazol e cetoconazol.....	50
5.1.2 Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> aos triazólicos de 1ª geração: itraconazol e fluconazol.....	50
5.1.3 Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> aos triazólicos de 2ª geração: voriconazol	50
5.1.4 Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> às alilaminas: terbinafina	51
5.1.5 Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> às equinocandinas: caspofungina	51
5.1.6 Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> aos poliênicos: anfotericina B.....	51
5.2 Avaliação da antifungoterapia na esporotricose experimental em modelo murino	54
5.2.1 Avaliação da atividade de itraconazol	55
5.2.2 Avaliação da atividade de voriconazol.....	56
5.2.3 Avaliação da atividade de anfotericina B.....	57
5.2.4 Avaliação cultural dos tecidos de animais infectados experimentalmente com <i>S. schenckii</i> submetidos a diferentes tratamentos antifúngicos	58

5.2.5	Comparações estatísticas entre os tratamentos	60
5.2.6	Avaliação da variável sexo na esporotricose experimental em modelo murino sob diferentes tratamentos	61
6	DISCUSSÃO	63
6.1	Perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>S. schenckii</i> frente aos antifúngicos azólicos, terbinafina, caspofungina e anfotericina B.....	63
6.1.1	Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> aos imidazólicos: miconazol e cetoconazol.....	64
6.1.2	Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> aos triazólicos de 1ª geração: itraconazol e fluconazol.....	65
6.1.3	Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> aos triazólicos de 2ª geração: voriconazol	67
6.1.4	Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> às alilaminas: terbinafina	68
6.1.5	Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> às equinocandinas: caspofungina	69
6.1.6	Suscetibilidade de <i>S. schenckii</i> aos poliênicos: anfotericina B.....	70
6.2	Avaliação da antifungicoterapia na esporotricose experimental em modelo murino	71
6.3	Considerações finais.....	75
7	CONCLUSÕES	76
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma infecção fúngica subaguda ou crônica causada pelo fungo dimórfico e termotolerante *Sporothrix schenckii*, normalmente limitada ao tecido cutâneo e subcutâneo, sendo infrequente a forma disseminada (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Acomete o homem e uma grande variedade de animais como: gatos, cães, eqüinos, bovinos, camelos, golfinhos, porcos, ratos entre outros (NOBRE et al, 2002). Geralmente se apresenta em forma de nódulos, que se ulceram e supuram, seguindo o trajeto de um tronco linfático ou na forma de uma placa cutânea verrucosa. Em pacientes imunodeprimidos pode desenvolver-se a forma disseminada desta micose, com lesões pulmonares, ósseas, articulares e do sistema nervoso central (SILVA-VERGARA et al, 2005).

Raras vezes os conídios fúngicos podem penetrar por via inalatória e originar uma doença pulmonar crônica com sintomatologia semelhante à tuberculose (TORRES-RODRÍGUEZ et al, 1993). A maioria dos casos ocorre por implantação traumática do fungo através da pele, atingindo a derme (REED et al, 1993). Os pacientes com esporotricose referem traumatismos com espinhos de roseiras, farpas, cortes com folhas de pastagem. Também existem relatos de casos associados com mordida de ratos, picadas de insetos, arranhaduras de tatus, limpeza de pescados, etc. (TORRES-RODRÍGUEZ et al, 1993). Apesar dos tatus (*Dasypus novemcinctus*) não albergarem o fungo na sua epiderme ou nos intestinos, estes são isolados de folhas secas utilizadas para preparar o ninho desses animais (WENKER et al, 1998).

Historicamente definido como tratamento de escolha para as formas cutâneas e linfocutâneas de esporotricose humana, a solução saturada de iodeto de potássio (SSKI) ainda hoje é bastante utilizada principalmente pelo baixo custo. O mecanismo preciso pelo qual o iodeto de potássio age sobre o fungo ainda hoje é desconhecido. Não há um consenso se este atua diretamente sobre as células leveduriformes ou age através de estímulo ao sistema imune do hospedeiro. Os inconvenientes associados ao uso de SSKI estão relacionados ao esquema posológico fracionado em muitas ingestões diárias e alguns efeitos adversos tais como: diarreia, vômitos, náuseas, dor de estômago, queimação na boca, dor de cabeça, acidose metabólica, hipertiroidismo, hipotiroidismo, dermatite herpetiforme e iododerma (STERLING &

HEYMANN, 2000). Alguns estudos clínicos controlados utilizando antifúngicos triazólicos comprovam e indicam o itraconazol atualmente como a primeira escolha terapêutica atualmente. A anfotericina B é preconizada para tratar formas disseminadas desta micose (KAUFFMAN et al, 2007).

A partir da aprovação do protocolo M38-A em 2002 pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) tornou-se disponível a metodologia para os testes de suscetibilidade *in vitro* para alguns fungos filamentosos patogênicos, incluindo *Sporothrix schenckii*; a partir de então, registra-se um incremento das publicações avaliando a suscetibilidade *in vitro* frente a diferentes classes de antifúngicos (KOHLENER et al, 2004; TRILLES et al, 2005; LÓPEZ et al, 2005; KOHLER et al, 2006; MEINERZ et al, 2007; ALVARADO-RAMÍREZ & TORRES-RODRÍGUEZ, 2007; MARIMON et al, 2007). Em vista disso ampliou-se o conhecimento sobre o perfil de suscetibilidade de *S. schenckii* aos antifúngicos utilizados na terapia destas micoses. Sabe-se que os isolados obtidos de diferentes hospedeiros (humanos e animais), formas de apresentação (cutâneas e disseminadas) e localizações geográficas apresentam significativas variações quanto à virulência e suscetibilidades aos antifúngicos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DIXON et al, 1992; TACHIBANA et al, 1998). Até o momento não há um estudo abrangente sobre o perfil de suscetibilidade *in vitro* frente às diversas classes de antifúngicos utilizando isolados de *S. schenckii* oriundas de esporotricose humana no estado do Rio Grande do Sul.

Existe poucos estudos que descrevem a infecção experimental por *S. schenckii* utilizando camundongos como modelo experimental publicados na literatura indexada (FERNANDES et al, 1999; TACHIBANA et al, 1999; TACHIBANA et al, 2001; LIMA et al, 2003; UENOTSUCHI et al, 2006; MAIA et al, 2006). Porém, em apenas um destes avaliou-se a eficácia da antifungoterapia (KAN & BENNETT, 1988).

Considerando que a esporotricose é endêmica na região sul do Brasil, o presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de isolados clínicos de *S. schenckii* frente a diferentes classes de agentes antifúngicos bem como analisar aspectos da virulência do fungo em infecção experimental em modelo murino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

O primeiro caso de esporotricose, documentado por descrição clínica da doença e isolamento do fungo, foi realizado por Benjamin Schenck no Johns Hopkins Hospital em Baltimore, EUA (SCHENCK, 1898). O isolado foi enviado ao fitopatologista E. F. Smith que o identificou como uma espécie do gênero *Sporotrichum*. O segundo caso foi relatado no ano de 1900, por Hektoen e Perkins, Chicago, EUA; um menino com ferimento no dedo causado por martelo. Estes isolaram o fungo e adotaram a nova nomenclatura, *Sporothrix schenckii*. Esta foi utilizada em alguns poucos relatos quando em 1910 o binômio *Sporotrichum schenckii* é retomado e utilizado até 1962. Carmichael descobre diferenças na conidiogênese do gênero *Sporotrichum* com a do agente da esporotricose. A denominação *S. schenckii*, do início do século, é então recuperada (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992 ; TORRES-RODRÍGUEZ et al, 1993).

Durante os primeiros anos do século XX, a esporotricose era uma doença comum na França. O primeiro caso foi descrito em 1903 seguido por mais de 200 casos no curso de 10 anos. Já em 1903 a terapia com iodeto de potássio é sugerida por Sabouraud. Neste mesmo ano Beurnmann e Gougerot publicam uma monografia, *Les Sporotrichoses*, baseada numa revisão de 250 casos franceses de esporotricose. Em 1927, Pijper e Pullinger reportam um surto envolvendo 14 mineiros em Witwatersrand, cidade próxima a capital Johannesburgo, África do Sul. Após isto, entre 1941 e 1944, no mesmo local registra-se o maior surto epidêmico de esporotricose pulmonar já documentado envolvendo cerca de 3000 mineiros. O reservatório para o crescimento saprofítico do fungo foi identificado nas madeiras das estruturas de sustentação da mina (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

No Brasil o primeiro relato de esporotricose em humanos ocorreu em 1907 (LUTZ & SPLENDORE, 1907). Descreveu-se o primeiro caso no Rio Grande do Sul em dois cães no ano de 1964 (LONDERO et al, 1964).

2.2 Etiologia e epidemiologia

O agente etiológico da esporotricose em humanos e animais é o fungo dimórfico *S. schenckii*. Pertence a subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae e gênero *Sporothrix* (LACAZ et al, 1998). Não há consenso sobre a forma teleomórfica deste fungo, apesar da espécie *Ophiostoma stenoceras* já ter sido postulada como tal (LOPES-BEZERRA et al, 2006). Uma variedade denominada, *S. schenckii* var. *luriei*, isolada pela primeira vez na África do Sul também é associada à doença. Recentemente, estudos moleculares de isolados clínicos propuseram uma grande variedade intraespecífica principalmente associada à origem geográfica (WATANABE et al, 2004; NEYRA et al, 2005; MARIMON et al, 2006). Desta forma sugere-se a espécie *S. schenckii* como sendo um complexo de espécies com a proposição de três novas espécies: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix mexicana* (MARIMON et al, 2007).

Pela sua característica dimórfica o fungo apresenta-se na forma filamentosa em condições ambientais e nos cultivos *in vitro* sob temperatura de 25°C; passa a forma leveduriforme *in vivo* e *in vitro* a 37°C (LACAZ et al, 1998). A transição entre as formas foi descrita por Howard em 1961 (HOWARD, 1961).

Na forma de micélio as hifas são finas, hialinas, septadas e ramificadas cujos conidióforos são delgados e no ápice forma-se pequena vesícula com dentículos simpodialmente dispostos. Nestes ápices formam-se conídios hialinos os quais conferem uma característica importante para identificação microscópica: a forma de flor margarida. Ao longo das hifas surgem os conídios demáceos. Os conídios hialinos possuem parede celular mais delgada que os demáceos. Algumas cepas produzem outro tipo de conídio de maior tamanho, forma triangular que possuem uma só célula e são de cor marrom. Os conídios pigmentados apresentam maior resistência aos fatores ambientais. A pigmentação das colônias varia de acordo com tipo de cepa, meio de cultivo e temperatura de incubação (LACAZ et al, 1998).

As formas leveduriformes, encontradas nos tecidos parasitados, são pequenas células ovais ou alongadas em forma de charutos medindo 1,5–2 x 7–9 µm, Gram-positivas normalmente com brotamento polar. Nesta forma as colônias

apresentam-se brancas e cremosas, semelhantes a outros fungos leveduriformes (TORRES-RODRÍGUEZ et al, 1993).

Quanto aos aspectos epidemiológicos, *S. schenckii* é um fungo com características ubíquas sendo encontrado no solo associado a material orgânico de plantas (espinhos, folhas secas e madeira), água, material orgânico em decomposição, entre outros locais. Ocupações como jardinagem, manejo rural, agricultura, construção civil são relacionadas à maior predisposição a infecção (LOPES-BEZERRA et al, 2006).

A esporotricose apresenta uma distribuição geográfica universal, porém atualmente predomina no México, América Central, Japão e no sul dos continentes Africano e Americano. A maioria dos casos é reportada em zonas tropicais ou subtropicais, todavia com diferentes condições climáticas (TORRES-RODRÍGUEZ et al, 1993). Nos Estados Unidos havia menos de 200 casos de esporotricose reportados até 1932 quando a incidência aumentou chegando-se a estimativa de 100 pacientes internados com esporotricose sistêmica (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Neste país a maior epidemia de esporotricose ocorreu em 1988 envolvendo 84 casos em 15 estados (DIXON et al, 1992). Na Guatemala há registro de surtos epidêmicos relacionados à limpeza de pescado e no Uruguai com a caça ao tatu chegando até 88% dos casos (GEZUELE & DA ROSA, 2005). No Peru existe uma área hiperendêmica ao sul das montanhas andinas, com uma incidência anual estimada em 48 a 60 casos por 100.000 habitantes em Abancay (PAPPAS et al, 2000). No Japão o número de casos vem aumentando desde o final da Segunda Guerra de 22 casos entre 1918 e 1939 para mais de 500 casos no período entre 1945 e 1968 (URABE, 1970).

No Brasil o perfil epidemiológico da esporotricose também tem se modificado nos últimos anos. A emergência de uma epidemia de esporotricose no estado do Rio de Janeiro comprova essa dinâmica. Os primeiros registros de transmissão da esporotricose por felinos para humanos datam de 1982. O felino doméstico tem importância na epidemiologia da micose, seja por carrear o agente em suas unhas e cavidade oral ou devido às lesões com exuberância de células leveduriformes (READ & SPERLING, 1982).

No período de 12 anos entre 1987 e 1998 foram registrados apenas 13 casos humanos de esporotricose no Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC) do Pará. No período de apenas 2 anos (1998 e 2000) foram descritos 66 casos humanos, 117

casos em felinos e 7 casos em cães (BARROS et al, 2001). Evidenciando esta como a maior epidemia de esporotricose com transmissão zoonótica, o IPEC reporta no período de 1998 até o final de 2003 o registro de 497 casos humanos de esporotricose e 1056 gatos com cultura positiva para *S. schenckii*. Um total de 421 pacientes (67,4%) apresentou histórico de arranhadura ou mordedura por gatos (SHUBACH et al, 2005). No estado de São Paulo, registra-se um aumento dos casos de esporotricose felina a partir de 1989 (FLEURY et al, 2001). Nos últimos anos, no Rio Grande do Sul, verifica-se um aumento no número de casos de esporotricose em felinos no litoral sul do estado, particularmente no município de Rio Grande (NOBRE et al, 2002).

Em todo país relata-se um aumento de esporotricose felina e decréscimos na esporotricose canina, possivelmente pela menor gravidade da doença em cães e pela semelhança com outras doenças. Estes dados reforçam a característica zoonótica desta micose e atentam para o risco de transmissão para humanos através de arranhaduras e mordeduras por gatos com e esporotricose e mesmo por gatos hígidos (NOBRE et al, 2002; SHUBACH et al, 2005).

Uma análise retrospectiva dos casos de esporotricose registrados no Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia na cidade de Porto Alegre foi realizada reportando 304 casos num período de 35 anos (1967 a 2002). Neste estudo a exposição ao risco ocupacional para infecção foi 13 vezes maior no sexo masculino que no sexo feminino. Observou-se que a maioria afetada foram homens (68,4%) acima dos 12 anos de idade (88,8%). A maioria dos pacientes (74,3%) foi relacionada como pertencentes às categorias de riscos ocupacionais tradicionalmente associadas a esta micose, como fazendeiros, apicultores, carpinteiros, jardineiros, atividades de caça e pesca ou floricultura. Excetuando um paciente, todos receberam terapia com solução saturada de iodeto de potássio com duração de tratamento por mais 16 semanas para remissão das lesões na maioria dos pacientes. A distribuição dos casos avaliados quanto à procedência foi: 72% da região metropolitana de Porto Alegre, 6,5% da região sudeste do estado, 6,2% da região noroeste, 6,2% da região centroeste, 4,2% da região nordeste, 3,2% da região sudeste e 1,3% da região centro-oeste (ROSA et al, 2005).

Na região central do estado do Rio Grande do Sul entre 1988 e 1997 foram observados 31 casos de esporotricose registrados no Hospital Universitário de Santa Maria. Na mesma cidade, um estudo retrospectivo realizado entre 1957 e 1997

registrou 342 casos de esporotricose em humanos. A esporotricose continua sendo a mais freqüente micose subcutânea humana no Rio Grande do Sul apesar de uma diminuição da incidência nas últimas décadas. Houve uma redução progressiva no acometimento de mulheres e conseqüentemente aumento da proporção de casos homens/mulheres, possivelmente atribuída à entrada das mulheres no mercado de trabalho urbano e diminuição de suas atividades em jardinagem e horticultura (LOPES et al, 1999).

2.3 Esporotricose em animais

Na espécie felina há uma tendência do quadro de esporotricose cutânea disseminada com evolução para forma sistêmica com comprometimento dos pulmões, fígado, baço, ossos e linfonodos, sendo fator determinante dos óbitos. Uma possível relação entre a severidade das formas de esporotricose felina e imunossupressão causada por infecções virais como pelo vírus da imunodeficiência felina ou leucemia felina foi investigada, no entanto, não comprovada (MARQUES et al, 1993; SCHUBACH et al, 2003). A maior freqüência tem sido observada nos machos não castrados em idade reprodutiva, possivelmente relacionada ao comportamento mais agressivo destes facilitando a aquisição destas lesões em brigas (SCHUBAH et al, 2001). Assim como os aspectos clínicos e histológicos da esporotricose felina são distintos da esporotricose humana, também a abordagem terapêutica é mais complexa, pois os gatos são mais suscetíveis a iodotoxicose, embora o tratamento com iodeto de potássio mostre-se eficaz e seguro (MARQUES et al, 1993). Terapias com cetoconazol apresentam resultados discordantes sendo o itraconazol considerado uma alternativa terapêutica importante para estes animais (NOBRE et al, 2001).

Em cães, a forma cutânea e linfocutânea são as mais comuns. A esporotricose canina disseminada pode ocorrer em animais imunocompetentes, no entanto é mais rara sua ocorrência. As lesões apresentam-se principalmente na face, pavilhão auricular, mucosa nasal, tronco e membros. As lesões são nodulares e ulcerativas, não pruriginosas e com presenças de placas anulares e alopecia. Os nódulos ulcerados tipicamente drenam exsudato purulento, mas, diferentemente dos

felinos, as formas leveduriformes são raramente observadas. (SHUBACH & SHUBACH, 2000; WHITTEMORE & WEBB, 2007).

Nos eqüinos as formas de esporotricose assemelham-se às humanas, com nódulos subcutâneos, que ulceram formando crostas, localizadas nos membros e no pescoço (COPETTI et al, 2002). Na década de 70 a esporotricose eqüina foi considerada de ocorrência freqüente no vale do rio Mississipi nos Estados Unidos (SOLTYS & SUMNER-SMITH, 1971).

2.4 Esporotricose em humanos

As diferentes manifestações clínicas da esporotricose em humanos relacionam-se diretamente com a via de infecção e estado imunológico do paciente (TORRES-RODRÍGUEZ et al, 1993). As formas clínicas classificam-se inicialmente em cutâneas e extracutâneas. As formas cutâneas podem ser fixas, linfocutâneas ou disseminadas. Também podem ser consideradas situações em que há comprometimento de mucosas tais como a conjuntiva ocular e mucosa nasal. Nas manifestações extracutâneas da micose podem ser relatados casos como esporotricose pulmonar, osteoarticular, meníngea ou sistêmica (LOPES-BEZERRA et al, 2006).

A esporotricose cutânea fixa aparece como lesão única permanecendo restrita ao local de infecção. Não há migração da lesão pelo trajeto linfático contíguo a área afetada. São normalmente pápulas eritematosas ou placas que podem tornar-se ulceradas ou verrucosas. Não tendem a regressão espontânea havendo casos descritos com até 26 anos de evolução. Localiza-se com maior freqüência na face ou nos membros superiores com manifestações polimórficas que podem conduzir a erros de diagnóstico como, por exemplo, leishmaniose, cromomicose, blastomicose e piodermite vegetante. Representam em torno de 25% dos casos e são mais freqüentes em áreas de alta endemicidade (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

A forma linfocutânea é a mais prevalente, representando 80% dos casos. Inicia com um nódulo ou uma lesão ulcerada no local da inoculação fúngica seguindo o trajeto linfático regional, contíguo a lesão inicial, formando novos nódulos que ulceram, fistulam e regridem. Estes sinais clínicos caracterizam a denominação

desta forma como linfangite nodular ascendente. Comprometimento de mucosas não são comuns mas podem ocorrer na forma de lesões orofaciais (AARESTRUP et al 2001), de sinusites (MORGAN & REVES, 1996) e endoftalmites (KUROSAWA et al, 1988).

A esporotricose pulmonar é uma condição primariamente relacionada com inalação de conídios ou, em alguns casos, conseqüência de disseminação hematogênica. Podem ser encontrados casos assintomáticos, apenas com algum infartamento nos gânglios do hilo pulmonar ou casos com sintomatologia aguda e quadro clínico de pneumonia aguda leve, tosse, expectoração mucopurulenta, febre e padrão radiológico de infiltração pulmonar localizada com infartamento dos gânglios hilo-mediastínicos. Nos pacientes com a forma pulmonar crônica os sinais e sintomas não são característicos e podem confundir-se com tuberculose pulmonar ou histoplasmoze cavitária com radiografias exibindo lesões infiltrativas e nodulares localizadas nos ápices pulmonares e cavitação em 75% dos casos. O típico paciente classifica-se como sendo homem (relação homem/mulher em 6:1), alcoolista ou diabético e com média de idade estimada em 46 anos (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; CAMPBELL et al, 2004). Três casos na literatura relatam esporotricose pulmonar acometendo pacientes infectados pelo vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (GORI et al, 1997; LOSMAN & CAVANAUGH, 2004; CALLENS et al, 2005).

O envolvimento das articulações, denota a forma osteoarticular da esporotricose com artrite localizando-se na maioria das vezes nos joelhos, cotovelos, punhos e quadris. Mais da metade dos casos compromete apenas uma articulação podendo, na ausência de tratamento, afetar outras regiões. Produz, inicialmente, sinovites e tenosinovites podendo, com a evolução do quadro, determinar alguns focos de osteomielites. Clinicamente manifesta-se por dor articular, limitações de movimento, tumefação e acúmulo de líquido sinovial na cavidade articular. A disseminação poliarticular acompanhada de lesões cutâneas múltiplas observa-se em pacientes diabéticos, com linfomas, transplante de órgãos, tratamento com corticosteróides, sarcoidose e SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (TORRES-RODRÍGUEZ et al, 1993; LOPES-BEZERRA et al, 2006).

A artrite fúngica causada por *S. schenckii* foi pela primeira vez associada como infecção oportunista na SIDA em 1985, ainda no início da pandemia desta

doença sendo o primeiro relato de caso da co-infecção HIV/S. *schenckii* (LIPSTEIN-KRESH et al, 1985).

Há casos de disseminação hematogênica do fungo com envolvimento de múltiplos órgãos. Em pacientes com esporotricose cutânea disseminada, ou mesmo sem um foco primário aparente, pode ser observado um processo meningoencefálico com evolução subaguda ou crônica. Condições imunossupressoras aumentam a probabilidade de disseminação hematogênica e com isso o quadro de meningites ou abscessos cerebrais. Observando-se o histórico de casos dos pacientes com SIDA/esporotricose pode-se inferir que em cerca de 20% a disseminação evolui para comprometimento do sistema nervoso central (SILVA-VERGARA et al, 2005).

2.5 Citologia e histopatologia

A fase leveduriforme de *S. schenckii* pode variar morfológicamente, desde células globosas atingindo 10 μm de diâmetro até células em formato de charuto com dimensões de 1– 3 μm x 3 – 10 μm chegando até 17 μm de comprimento. A resposta inflamatória ao *S. schenckii* em lesões primárias e secundárias é, caracteristicamente, piogranulomatosa exibindo grupos de neutrófilos circundados por ampla área contendo células epitelíoides, histiócitos, linfócitos, escassos eosinófilos e células gigantes multinucleadas (PADILLA & LA ROCHE, 2000).

Na maioria das vezes a busca por elementos leveduriformes em pesquisas histopatológicas das lesões cutâneas humanas é infrutífera. Um número maior de formas parasitárias pode ser encontrado em pacientes recebendo corticosteróides sistêmicos ou tópicos. Em pacientes imunocomprometidos há um exuberante aumento de formas parasitárias pleomórficas com aparente redução da resposta inflamatória (FITZPATRICK & EUBANKS, 1988). A exuberância de células fúngicas, no interior de macrófagos e isolados no tecido dérmico, acompanhada de pequena reação inflamatória linfoplasmocitária é um achado histopatológico das lesões cutâneas em felinos (MARQUES et al, 1993).

Em condições habituais, a imagem histopatológica mais característica e freqüente é o corpo asteróide. Este consiste em área central ligeiramente basófila,

contendo o microrganismo com ou sem brotamento, rodeada por material eosinofílico, estrelar ou radiado que podem alcançar até 80 μm . As formações acidófilas são claviformes e dispõem-se em forma de coroa demonstrando uma típica reação de Hoeppli-Splendore (SERRA-BALDRICH, 1994). A possibilidade de visualização desta estrutura em amostras clínicas, varia de acordo com a metodologia utilizada na coleta e na observação total do campo microscópico (GEZUELE & DA ROSA, 2005).

2.6 Resposta imunológica do hospedeiro

Os mecanismos imunológicos requeridos nas micoses são principalmente de origem celular, envolvendo neutrófilos, macrófagos, linfócitos e, em menor extensão células NK (*Natural Killer*). As células envolvidas com a fagocitose das células fúngicas (elementos leveduriformes) são os polimorfonucleares e os macrófagos. A atividade antifúngica associada aos anticorpos é pequena. Os linfócitos T desenvolvem papel fundamental na defesa contra infecções fúngicas, especialmente os linfócitos T CD_4^+ (T - auxiliar) (CORBELLINI et al, 1996). Em infecção experimental por *S. schenckii* o principal mecanismo de resposta imune está relacionado à ativação de macrófagos via citocinas, principalmente interleucina-12 (IL-12) e interferon-gama (IFN- γ), mediadas por linfócitos T CD_4^+ fenótipo Th1, fenótipo Th2 com pequena contribuição de linfócitos T CD_8^+ (T-citotóxico) (MAIA et al, 2006). Recentemente, foi sugerido por Uenotsuchi et al (2006) que isolados de esporotricose cutânea são capazes de ativar de forma muito mais intensa as células dendríticas e a resposta de linfócitos Th1 que isolados de esporotricose disseminada.

A atividade fagocítica desempenhada pelos macrófagos pode ser comprometida devido às variações na composição química da parede celular dos fungos (CORBELLINI et al, 1996). Frações lipídicas, proporção glicídica (ramnose:manose) e DHN-melanina presentes na parede celular fúngica são elementos claramente envolvidos na inibição de fagocitose das formas leveduriformes de *S. schenckii* (FERNANDES et al, 1999; LANGFELDER et al, 2003).

Os mecanismos oxidativos envolvendo a liberação de substâncias reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos, são fundamentais para eliminação dos microrganismos fagocitados. No interior dos fagolisossomas os processos oxidativos envolvem espécies químicas como superóxidos, peróxido de hidrogênio, mieloperoxidase e haletos (CORBELLINI et al, 1996). O óxido nítrico tem importante função na atividade fungicida desempenhada pelos macrófagos contra conídios e elementos leveduriformes de *S. schenckii* (CARLOS et al, 2003).

A variação de composição química da parede celular de conídios (crescimentos de 7 e 12 dias) e leveduras de *S. schenckii* demonstra além de mudanças na fagocitose por macrófagos ativados ou não, diferenças na suscetibilidade destes à ação do óxido nítrico. Os elementos leveduriformes de *S. schenckii* parecem possuir mecanismos de evasão intracelular que lhes conferem proteção contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (FERNANDES et al, 2000). Um estudo evidenciou, através de várias técnicas de detecção de cerebrosídeos, que na forma de micélio o fungo apresenta apenas β -glicosilceramidas em sua parede fúngica; na fase leveduriforme apresenta, aproximadamente, partes iguais de β -glicosil- e β -galactosilceramidas. Isto revela que variações em relação à composição glicolípídica relacionam-se com o fenótipo do dimorfismo observado (TOLEDO et al, 2000).

2.7 Agentes antifúngicos

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é, ainda hoje, limitado. As quatro principais classes de antifúngicos para uso sistêmico são os poliênicos, azólicos, alilaminas e equinocandinas (CHEN & SORRELL, 2007).

A anfotericina B e os azólicos - principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol - têm sido os agentes mais utilizados nas últimas décadas para tratamento da maioria das micoses sistêmicas. Estas duas classes de medicamentos têm como alvo a membrana celular dos fungos. A terbinafina, uma alilamina, também se encontra disponível para uso sistêmico. A caspofungina pertence à

classe das equinocandinas e foi recentemente aprovada para uso sistêmico (CARRILLO-MUÑOZ et al, 2001).

No tratamento das micoses superficiais a diversidade de fármacos disponíveis para a terapia é maior. Além dos polienos anfotericina B e nistatina, da flucitosina e de maior variedade de azóis (bifonazol, clotrimazol, econazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, miconazol, terconazol e tioconazol), existem ainda outros antifúngicos: o derivado da morfolina, amorolfina; os tiocarbamatos tolnaftato e tolciolato; as alilaminas naftifina, terbinafina e butenafina e o composto ciclopirox, além da griseofulvina (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004).

Os poliênicos ligam-se, basicamente ao ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais. O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversas pequenas moléculas, levando à morte celular. A anfotericina B é um antibiótico fungicida potente e de amplo espectro; é indicada no tratamento de micoses sistêmicas graves e, potencialmente fatais, incluindo a aspergilose, blastomicose, coccidiomicose, criptococose, histoplasmose, paracoccidiomicose, esporotricose, candidíase sistêmica e zigomicose (GUBBINS & ANAISSIE, 2002). No entanto seu uso é associado a efeitos adversos significativos tais como febre e calafrios durante a administração e, com maior gravidade, relacionando-se à nefrotoxicidade em até 30% dos pacientes com quadro de falha renal aguda. Isto se deve às interações do desoxicolato de anfotericina B com o colesterol da membrana plasmática dos mamíferos embora com menor afinidade do que com o ergosterol da membrana celular fúngica (DERAY, 2002).

Infusões intravenosas diárias repetidas de 0,5 mg/kg em adultos resultam em concentrações plasmáticas de cerca de 1,0 a 1,5 µg/mL ao final da infusão alterando-se para cerca de 0,5 a 1,9 µg/mL após 24 horas (BENNETT, 2003). Com mais de 40 anos de uso clínico e, apesar das limitações relacionadas com a toxicidade e restrição ao uso endovenoso, este fármaco ainda é considerado como o “padrão ouro” para o tratamento de infecções fúngicas disseminadas (BATES et al, 2001). Novas formulações da anfotericina B disponíveis nas formas lipossomal, de dispersão coloidal e complexo lipídico, produzem menos efeitos colaterais devido a redistribuição do fármaco nos tecidos e pela seletividade de liberação, mantendo o espectro de atividade; são referidas como formulações com maior potência de ação. Estas novas formulações podem ser utilizadas em dosagens diárias de até 5 mg/kg

com a forma lipossomal podendo atingir um AUC (área sob a curva) de 555 mg/L. Por outro lado o aspecto negativo está relacionado maior custo de tratamento (DUPONT, 2002). Atualmente, a forma lipossomal de anfotericina B é sugerida como primeira escolha nas formas disseminadas, pulmonares e meníngeas de esporotricose (KAUFFMAN et al, 2007).

Os antifúngicos azólicos incluem duas classes amplas: os imidazólicos e os triazólicos. Ambas as classes compartilham do mesmo espectro antifúngico e do mesmo mecanismo de ação. O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da lanosterol-14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e determinando o acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, não desempenhando as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo. Podem ter ação fungistática ou fungicida dependendo do fármaco e principalmente da dose de tratamento (BENNETT, 2003).

No Brasil estão disponíveis para uso sistêmico em infecções fúngicas o cetoconazol e os triazólicos itraconazol, fluconazol e voriconazol. Destes o cetoconazol e o itraconazol apenas em formulações para administração via oral; fluconazol e voriconazol com formulações orais e endovenosas (DEF, 2007).

O primeiro relato de atividade antifúngica relacionada aos imidazólicos foi na década de 1960 sendo o miconazol o primeiro fármaco da classe disponível para administração parenteral (GHANNOUM & RICE, 1999). A indicação do miconazol para uso sistêmico tornou-se rara com o surgimento de agentes mais modernos (BENNETT, 2003).

No início da década de 1980 o cetoconazol foi o primeiro azólico a ser administrado por via oral no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. Até a introdução dos triazólicos, o cetoconazol era particularmente útil no tratamento de alguns tipos de candidíase, blastomicose e histoplasmose (TERRELL, 1999). Após doses orais de 200, 400 e 800 mg, os picos máximos de concentração plasmática do cetoconazol variam entre 8 e 20 $\mu\text{g/mL}$. O cetoconazol apresenta aspectos negativos quanto à hepatotoxicidade e não atinge concentrações terapêuticas no sistema nervoso central. Pode causar interações medicamentosas e distúrbios endócrinos por inibição de sistemas enzimáticos relacionados com a síntese de

testosterona e estradiol humanos. Com dose de 400mg diárias o cetoconazol seria capaz de suprimir a produção de androgênios nas mulheres com síndrome de ovário policístico (BENNETT, 2003).

Havia a necessidade de agentes com espectro de atividade mais amplo, mais potente e principalmente com menos efeitos colaterais. Assim o início da década de 1990 marca o início da era dos triazólicos. O primeiro triazólico aprovado para uso clínico foi o fluconazol. O fluconazol atinge elevadas concentrações no líquido cefalorraquidiano (50 a 90% dos valores plasmáticos) e líquidos corporais (oculares, escarro e saliva), sendo o fármaco de escolha para maioria das meningites fúngicas. As concentrações máximas atingidas com doses repetidas de 100 mg ficam entre 4 e 8 µg/mL (BENNETT, 2003; RANG, et al 2004). Este antifúngico tem aprovação para uso em candidíase vaginal, orofaríngea, esofágica e meningite criptocócica bem como para profilaxia de candidíase em pacientes pós-transplante de medula óssea recebendo quimioterapia citotóxica e pacientes com SIDA (GUBBINS & ANAISSIE, 2002).

O fluconazol pode ser utilizado como alternativa terapêutica em algumas micoses como coccidioomicose, histoplasmose e blastomicose substituindo a anfotericina B (TERRELL, 1999). Na esporotricose linfocutânea e cutânea, o fluconazol só deve ser utilizado após falha de tratamento ou intolerância ao itraconazol, terbinafina e SSKI, respectivamente, sendo administrado em doses diárias de 400-800 mg por dia (KAUFFMAN et al, 2007).

O itraconazol também pertence à primeira geração dos triazólicos. Este apresenta consideráveis vantagens sobre o fluconazol no tratamento de aspergilose e esporotricose e sobre o cetoconazol no tratamento de formas não invasivas de histoplasmose, blastomicose e paracoccidioomicose (TERRELL, 1999). Para esporotricose linfocutânea e cutânea recomenda-se o uso de 200 mg ao dia de itraconazol até 2 a 4 semanas após a remissão completa das lesões. Também é primeira escolha para a esporotricose osteoarticular por um período não inferior a 12 meses de tratamento (KAUFFMAN et al, 2007)

Apesar de sofrer extenso metabolismo hepático, o itraconazol raras vezes apresenta efeitos adversos hepáticos. Este não penetra bem no SNC, tem alta lipossolubilidade e meia-vida de 36 horas com máximas concentrações do fármaco inalterado de 0,5 µg/mL após 15 dias com doses diárias de 100 mg. A associação do itraconazol com hidroxipropil-β-ciclodextrina em solução oral tem sido utilizada como

uma alternativa farmacotécnica na solubilização deste fármaco e para incremento na absorção, sem a dependência do baixo pH gástrico e alimentação concomitante à administração oral (BENNETT, 2003; RANG et al, 2004). Mais recentemente foi desenvolvida uma preparação intravenosa de itraconazol, ainda não disponível no Brasil (AIXIA et al, 2006).

Na última década, as investigações sobre novos antifúngicos tem se concentrado em melhorar antigas formulações e torná-las menos tóxicas e desenvolver novos fármacos a partir das estruturas já conhecidas. A partir da primeira geração de triazólicos surgem o voriconazol, ravuconazol e posaconazol classificados como a segunda geração de triazólicos, sendo mais potentes e com amplo espectro de ação sobre leveduras e fungos filamentosos (NEELY & GHANNOUM, 2000)

Com aprovação concedida em 2002, o voriconazol é estruturalmente relacionado ao fluconazol e também possui biodisponibilidade clinicamente relevante após administração oral que não é afetada pelo pH gástrico. Com características farmacocinéticas complexas, o voriconazol apresenta extensa metabolização hepática, meia-vida estimada em aproximadamente 24 horas com doses de 4-6 mg/kg endovenosa duas vezes ao dia (CARRILLO-MUÑOZ et al, 2001; CHEN & SORRELL, 2007). Atinge concentrações terapêuticas no líquido cefalorraquidiano (LCR) sendo sugerido como potencial alternativa terapêutica para tratamento de meningite criptocócica (SERENA et al, 2007).

O voriconazol é indicado como alternativa contra infecções invasivas graves por *Candida sp.* resistentes ao fluconazol, no tratamento de aspergilose invasiva e infecções fúngicas graves causadas por *Scedosporium spp.* e *Fusarium spp.* Para os patógenos *Curvularia spp.* e *Sporothrix spp.* foi verificada atividade *in vitro*, contudo a significância clínica é desconhecida (VFEND, 2007).

Outra classe de agentes antifúngicos disponíveis para utilização clínica são as alilaminas. Entre as alilaminas estão a naftifina, butenafina e terbinafina, sendo apenas esta última utilizada por via oral. Atuam inibindo seletivamente a enzima esqualeno-epoxidase, envolvida na síntese de ergosterol a partir do esqualeno na membrana fúngica. Portanto a ação decorre da inibição da biossíntese de ergosterol pelo fungo e também pelo acúmulo de esqualeno no interior da célula fúngica o que leva a lise da membrana celular do fungo. A terbinafina, composto fungicida queratinofílico e altamente lipofílico, é ativa contra ampla variedade de patógenos

cutâneos. Quando administrada por via oral, sofre rápida absorção e distribuição na pele, unhas e tecido adiposo (RANG et al, 2004). Este antifúngico pode ser utilizado no tratamento de esporotricose linfocutânea e cutânea (KAUFFMAN et al, 2007).

Uma nova classe de antifúngicos é representada pelas equinocandinas. O novo mecanismo de ação desta classe através de inibição enzimática da β -(1,3) glucana-sintetase que atua na síntese do 1,3- β -glicano, polímero de glicose necessário para a manutenção da estrutura da parede fúngica. Na ausência deste polímero, as células fúngicas perdem sua integridade desencadeando um processo lítico. Todos os fármacos deste grupo são antifúngicos semi-sintéticos e baseiam-se na estrutura de um hexapeptídeo cíclico acilado da pneumocandina B₀, inicialmente isolada de *Aspergillus nidulans* (RANG et al, 2004). Até o momento, três equinocandinas destacam-se pela importância clínica já evidenciada: caspofungina, anidulafungina e micafungina (CHEN & SORRELL, 2007).

A caspofungina foi a primeira a receber aprovação em 2001 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2002 e tem como indicação as seguintes condições: terapia empírica para presumíveis infecções fúngicas em pacientes neutropênicos e febris; tratamento de candidemias e outras infecções por *Candida sp.* como abscessos intra-abdominais, peritonites e pleurites; terapia de resgate em pacientes com aspergilose invasiva e tratamento de candidíase esofágica. Encontra-se disponível apenas para administração endovenosa com dose de ataque recomendada de 70mg seguida de 50 mg ao dia. Dependendo da concentração atingida pode ter característica fungistática ou fungicida. Sua farmacocinética polifásica com meia-vida longa amplia sua distribuição e concentração nos tecidos podendo alcançar níveis fungicidas com administração uma dose diária (FDA, 2001; ANVISA, 2002; CANCEIDAS,2007).

2.8 Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos

Usualmente infecções fúngicas estão associadas a tratamentos mais difíceis e mais longos que infecções bacterianas, visto que os organismos fúngicos multiplicam-se mais lentamente e muitas vezes infectam tecidos ou órgãos que apresentam dificuldades para o acesso de fármacos antifúngicos resultando em

concentrações abaixo das faixas terapêuticas estabelecidas. Assim como nas infecções bacterianas, os fungos também desenvolvem mecanismos de resistência aos fármacos resultando em falhas terapêuticas associadas ao aumento nas prevalências de morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos por micoses sistêmicas (NEELY & GHANNOUM, 2000; LIU et al, 2003; MÜLLER et al, 2007). Infecções graves, por vezes potencialmente fatais, causadas por fungos dimórficos tornaram-se mais comuns com o maior número de pacientes imunocomprometidos encontrados na prática clínica (DIXON et al, 1996). Nestes pacientes, especialmente aqueles acometidos pela SIDA, a esporotricose pode aparecer nas formas mais graves e com prognóstico bastante ruim. (DONABEDIAN et al, 1994; WARE et al, 1999; NETO et al, 1999; CARVALHO et al, 2002; HARDMAN et al, 2005).

Considerando esses agravos na evolução das doenças fúngicas humanas tornou-se imprescindível o aperfeiçoamento das metodologias laboratoriais para determinação das suscetibilidades *in vitro* dos diferentes patógenos frente aos agentes antifúngicos disponíveis para uso clínico. A possibilidade de prever um insucesso terapêutico denota a importância da correlação entre um ensaio de suscetibilidade e a resposta clínica. Estes testes também podem ser utilizados para descoberta de novos fármacos e estudos epidemiológicos (REX et al, 2001).

Inicialmente o conceito de CIM (concentração inibitória mínima) era irrelevante, visto que não existiam alternativas terapêuticas à anfotericina B. Com a introdução da 5-fluorocitosina nos anos 70 e dos azólicos nos anos 80, a determinação da CIM surge como um auxílio interessante para a definição de um tratamento adequado. Em 1983 o NCCLS estabelece um subcomitê para padronização de teste de suscetibilidade *in vitro* para fungos patogênicos. Dez anos mais tarde são determinados vários aspectos complexos e limitantes para tal padronização como concentração e preparação do inóculo, tempo e temperatura de incubação, meio de cultura e determinação do ponto final de leitura que poderiam gerar resultados de CIM com divergências maiores que 50.000 vezes. Com estas informações, pesquisadores foram desafiados para desenvolver metodologias reprodutíveis que refletissem, através dos ensaios *in vitro*, as concentrações séricas atingidas com doses usuais dos fármacos antifúngicos e sensíveis o bastante para detectar variações reais de suscetibilidades de diferentes isolados. Em 1997, os

esforços resultam na aprovação do protocolo M27-A do NCCLS para teste de suscetibilidade em fungos leveduriformes (NEELY & GHANNOUM, 2000).

A aprovação de um protocolo normatizando a metodologia para testes de suscetibilidade com fungos filamentosos patogênicos, M38A, concretiza-se em 2002. O documento abrange espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* e a forma miceliana de *S. schenckii*. Com a padronização, o número de publicações na literatura relacionadas à avaliação de suscetibilidade *in vitro* de diversos patógenos aumentou consideravelmente. Uma busca por artigos indexados na literatura internacional envolvendo suscetibilidade *in vitro* de *Sporothrix schenckii* entre o ano de 1980 e 2001 resulta em 9 artigos. Esta mesma busca realizada entre 2001 até 2007 fornece 11 artigos.

Um estudo comparativo entre atividades *in vitro* de triazólicos (posaconazol) e equinocandinas (micafungina e caspofungina) frente a diversos fungos filamentosos e leveduras foi publicado em 1998, antes da aprovação do protocolo M38-A. Este estudo foi o único a reportar a atividade da caspofungina frente ao *S. schenckii* (ESPINEL-INGROFF, 1998).

McGinnis et al (2001) avaliaram 100 isolados clínicos de esporotricose humana frente ao voriconazol, itraconazol e anfotericina B utilizando fase leveduriforme seguindo metodologia do protocolo M27-A modificado. Outros autores também utilizaram o protocolo M27-A2 adaptado para fungos dimórficos avaliando atividade da terbinafina, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravuconazol, albaconazol, eberconazol e micafungina (TRILLES et al, 2005; MEINERZ et al 2007). Um estudo recente de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* faz uma correlação entre kits comerciais (Sensititre YeastOne e ATB Fungus 2), inicialmente padronizados para leveduras, com a metodologia estabelecida como padrão seguindo o protocolo M38-A (ALVARADO-RAMÍREZ & TORRES-RODRÍGUEZ, 2007).

A infecção experimental de esporotricose pode ser investigada através de inoculação intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, intratesticular e intravenosa. Ambas as formas, filamentosa e leveduriforme, são utilizadas para preparo do inóculo. Diversos animais são citados como possíveis modelos experimentais, sendo o camundongo preferencialmente utilizado. O modelo murino (*Mus musculus*) é a espécie de escolha em micologia devido à similaridade com a fisiologia humana,

bem como facilidade de manejo e baixo custo. A paridade genômica entre humanos e camundongos é descrita como superior a 99% (CAPILLA et al, 2007).

Há apenas um trabalho reportando as atividades *in vivo* de itraconazol, terbinafina e anfotericina B em modelo de esporotricose disseminada. São descritas características farmacocinéticas da terbinafina neste modelo e compara diferentes doses de administração de itraconazol. Anfotericina B mostrou-se efetiva em prolongar a sobrevivência dos animais e controlar a infecção que foi demonstrada por cultura de órgãos e observação das lesões. O itraconazol aumentou a sobrevivência em relação aos controles mas não protegeu adequadamente os camundongos da infecção disseminada para o cérebro, ossos e vísceras. A terbinafina não apresentou nenhuma redução de mortalidade ou disseminação da infecção em relação aos controles, mesmo com detecção de níveis séricos terapêuticos do fármaco (KAN & BENNETT, 1988).

Há escassez de estudos clínicos para avaliação de diferentes tratamentos em esporotricose. Relata-se que nenhum estudo clínico randomizado, para os fármacos atualmente utilizados, foi realizado para comparar eficácia entre dois tratamentos diferentes. Além disso, avaliações de terapia para esporotricose extracutânea ainda não foram realizadas de forma prospectiva com um número maior de pacientes devido a sua ocorrência esporádica (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004).

2.9 Fatores de virulência

As investigações a respeito dos fatores de virulência associados ao *S. schenckii* têm contribuído para um melhor entendimento a cerca desta micose. A epidemia de esporotricose em felinos registrada na região sudeste assim como o surgimento de casos na forma disseminada em pacientes com SIDA justifica o interesse de pesquisadores brasileiros em saber mais sobre esta infecção principalmente em identificar e confirmar quais fatores estão realmente implicados na virulência fúngica (ROCHA et al, 2001; SHUBACH et al, 2005).

Possivelmente os fatores que mais contribuem para a expressão da virulência do *S. schenckii* são a termotolerância, composição da parede celular e produção de proteinases extracelulares (HOGAN et al, 1996).

A termotolerância, capacidade do fungo em se desenvolver sob temperatura de 37°C, caracteriza-se como um fator importante para disseminação do fungo além do tecido subcutâneo, adaptando-se a temperatura corporal nos órgãos internos. O crescimento fúngico limitado a 35°C caracteriza a termo-intolerância e pode ser verificado em isolados clínicos obtidos a partir de esporotricose cutânea-fixa ou induzindo-se mutação *in vitro* de isolados termo-tolerantes obtidos a partir esporotricose pulmonar. Os isolados mutantes perdem a capacidade de infecção visceral, porém são capazes ainda de desenvolver lesões cutâneas quando inoculados no coxim plantar de camundongos BALB/c (TACHIBANA et al, 2001).

Um estudo identificou que isolados clínicos de diferentes formas clínicas (disseminada, linfocutânea e cutânea-fixa) apresentam perfis genotípicos distintos estabelecidos por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) relacionados com as características infecciosas em camundongos BALB/c. Os animais inoculados por via intravenosa com inóculo proveniente de esporotricose disseminada morreram em 4-8 dias, por outro lado, todos os animais sobreviveram quando inoculados no coxim plantar com inóculo isolado de esporotricose cutânea-fixa. Estes autores utilizando inoculação intraperitoneal e isolados de esporotricose linfocutânea verificaram 100% de sobrevivência dos animais (KONG et al, 2006). Previamente já haviam sido verificadas variações de infectividade em camundongos dependente da via de inoculação e origem de isolamento (TACHIBANA et al, 1998).

As características de parede fúngica dos isolados cultivados em ágar batata a 25°C por diferentes períodos também alteram a virulência *in vivo*. Camundongos BALB/c e Swiss inoculados por via intravenosa com inóculo de 7 dias podem apresentar mortalidade de até 100%. Por outro lado, inóculos preparados com cultivos de 12 dias determinam 100% de sobrevivência dos animais infectados. A maior virulência foi associada aos glicídios da parede celular numa relação molar entre ramnose e manose de 1,7:1,0 e uma menor virulência para a relação 1,0:1,7 (FERNANDES et al, 1999). Na fase leveduriforme há, notadamente, mudanças nas condições de virulência fúngica frente a macrófagos peritôniais de camundongos (FERNANDES, et al, 2000).

A produção de enzimas configura outro aspecto de relevância para a virulência de *S. schenckii*. Enzimas do tipo fosfatase ácida são produzidas por conídios e formas leveduriformes; especialmente na forma leveduriforme são produzidas grandes quantidades de fosfatase ácida. Estas enzimas interferem na

interação entre as leveduras de *S. schenckii* com macrófagos e outras células do sistema imune do hospedeiro. A atividade destas enzimas indica capacidade em catalisar e liberar fosfato de fosfoproteínas como a caseína e também de desfosforilar outras enzimas ou componentes de membrana celular do hospedeiro (HOGAN et al, 1996).

Outras duas enzimas extracelulares estão associadas aos aspectos de virulência do fungo: proteinase I (proteinase serina) com peso molecular de 36,5 KDa e proteinase II (proteinase aspartato) com peso molecular de 39 KDa. O perfil eletroforético demonstra homogeneidade entre as enzimas, tendo a proteinase II propriedades similares as carboxil-proteinases identificadas em *Candida albicans*. Outros fungos patogênicos também apresentam mais do que um tipo de enzimas extracelulares. As duas proteinases hidrolisam substratos naturais constituintes do tecido dérmico humano como elastina e principalmente colágeno. A produção de proteinases e crescimento em meio contendo colágeno sugeria que *S. schenckii* fosse capaz de multiplicar-se *in vivo* na derme do hospedeiro utilizando colágeno como fonte de nitrogênio (TSUBOI et al, 1987). Yoshiike et al (1993) verificam a proposição anterior titulando anticorpos séricos, através de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), contra as proteinases I e II em camundongos inoculados por via subcutânea. Os resultados obtidos sugerem de forma contundente que *S. schenckii* produz as duas proteinases *in vivo*.

Há mais de 50 anos é conhecida a capacidade fúngica em produzir melanina. Em geral, melaninas são macromoléculas formadas através de polimerização oxidativa de compostos indólicos e fenólicos. Normalmente são pigmentos que variam suas colorações entre tonalidades de marrom a preto, porém outras cores podem ser observadas. São substâncias hidrofóbicas com carga negativa caracterizadas por dois tipos principais: melanina DHN (di-hidroxinaftaleno) e melanina DOPA (di-hidroxifenilalanina). Encontram-se como parte da própria parede celular, geralmente reconhecida por uma fina camada externa bem definida, em associação com a matriz fibrilar que se estende para fora da parede celular de muitos fungos ou ainda dispersa nos meios de cultura por liberação da parede celular na forma de grânulos (BUTLER & DAY, 1998).

Uma melhor compreensão sobre o papel desempenhado pela melanina na patogênese das doenças fúngicas tem se desenvolvido mais recentemente. Em fitopatógenos, como no fungo *Pyricularia grisea*, agente da brusone no arroz, torna-

se clara a importância da melanina visto que é essencial sua presença nas estruturas apressórias do fungo para que este consiga penetrar nas folhas da planta (LANGFELDER et al, 2003).

Nas micoses humanas a melanina é associada principalmente com a função de proteção da célula fúngica contra sistemas de defesa do hospedeiro tais como peptídeos microbicidas, processos oxidativos, fagocitose e atividade lítica intracelular. Também é citada como um fator de resistência fúngica aos fármacos, principalmente poliênicos e equinocandinas. *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Exophiala dermatidis*, *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus fumigatus* são os principais patógenos humanos nos quais se identifica variações da virulência associadas à biossíntese de melanina (LANGFELDER et al, 2003, NOSANCHUK & CASADEVALL, 2006).

Evidencia-se que *S. schenckii* realiza biossíntese de melanina DHN (1,8-dihidroxi-naftaleno) a partir do malonil-CoA pela via metabólica pentacetídeo. A partir de reações de ciclização de 5 moléculas de malonil-CoA forma-se 1,3,6,8-THN (tetrahidroxi-naftaleno) que seguindo na rota sofre reações seqüenciais de redução e desidratação resultando no precursor 1,8-DHN; então se iniciam sucessivas reações de dimerização seguidas de polimerização para obtenção de melanina DHN. O triciclazol é um composto inibidor da biossíntese de melanina DHN capaz de inibir as duas redutases da via pentacetídeo. Sugere-se que o triciclazol iniba preferencialmente a segunda enzima redutase da via metabólica em *S. schenckii* (ROMERO-MARTINEZ et al, 2000, LANGFELDER et al, 2003).

Romero-Martinez et al (2000) investigaram *in vitro* as características que a produção de melanina em *S. schenckii* apresenta associadas à virulência. Verificaram que conídios melanizados foram menos suscetíveis a exposição com radiação ultravioleta e por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estes resultados sustentam a hipótese que a melanina em *S. schenckii* é um importante componente de proteção para a célula fúngica contra agressões físicas e químicas, atuando como uma barreira captadora de radicais livres. A fagocitose também foi reduzida para os conídios melanizados quando comparados aos conídios não-melanizados. Sugere-se que a melanina diminua a possibilidade de interação com as células de defesa do hospedeiro por ser um polímero negativamente carregado (ROMERO-MARTINEZ et al, 2000). Morris-Jones et al (2003) evidenciaram que

conídios e formas leveduriformes são capazes de sintetizar melanina no curso de uma infecção em mamíferos .

Paradoxalmente ao exposto para melanização em *S. schenckii*, a produção de melanina em *Fonsecaea pedrosoi* parece induzir *in vitro* a resposta humoral e celular do hospedeiro, aumentar atividade fagocítica e explosão respiratória em neutrófilos, onde desempenharia desta forma uma função protetora aos pacientes com cromoblastomicose (ALVIANO et al, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Sporothrix schenckii* frente a diferentes classes de antifúngicos e avaliar a eficácia de antifungioterapia na esporotricose experimental em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Determinar a suscetibilidade *in vitro* de 41 isolados clínicos de *Sporothrix schenckii* frente aos azólicos: miconazol, cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol.

3.2.2 Determinar a suscetibilidade *in vitro* de 41 isolados clínicos de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina, caspofungina e anfotericina B.

3.2.3 Avaliar a eficácia de terapia antifúngica com anfotericina B, itraconazol e voriconazol em modelo experimental de esporotricose sistêmica utilizando modelo murino.

3.2.4 Avaliar as manifestações de virulência e extensão de infecção através de modelo experimental de esporotricose sistêmica utilizando modelo murino.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Ensaio *in vitro* para avaliação de suscetibilidade

A metodologia descrita a seguir para as avaliações de suscetibilidade *in vitro* foi estabelecida seguindo-se as normas do protocolo M38-A do CLSI (NCCLS, 2002).

4.1.1 Microrganismos

Foram incluídos 41 cultivos de *Sporothrix schenckii* isolados de casos de esporotricose humana e animal; todos os cultivos eram pertencentes à micoteca do LAPEMI (Laboratório de Pesquisas Micológicas) vinculado ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMIP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) .

4.1.2 Agentes antifúngicos

Os antifúngicos miconazol, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, cloridrato de terbinafina, voriconazol, acetato de caspofungina e anfotericina B (desoxicolato de sódio) foram adquiridos dos fabricantes em forma de pó puro ou soluções injetáveis.

4.1.3 Solubilização e preparo das soluções estoques

Para miconazol, itraconazol, cetoconazol, voriconazol, terbinafina e anfotericina B foram utilizados como solvente o dimetilsulfóxido com qualidade analítica (DMSO-PA). As respectivas soluções padrões de cada fármaco foram preparadas dissolvendo-se os pós ou soluções no solvente estabelecido resultando

numa concentração 100 vezes maior do que a maior concentração teste estabelecida (1.600 µg/ml). Para o fluconazol e caspofungina foi utilizada água bidestilada estéril como solvente e solução estoque com concentração de 1.280 µg/ml. Pequenos volumes destas soluções estoques foram colocados em frascos estéreis e congelados.

4.1.4 Concentrações testadas

As concentrações foram testadas nas faixas estabelecidas pelo protocolo M38-A com abrangência sobre os resultados esperados para as cepas de controle de qualidade disponíveis. As seguintes faixas de concentração entre as diversas classes de antifúngicos foram testadas:

miconazol	0,0625 µg/ml a 16 µg/ml
cetoconazol	0,0625 µg/ml a 16 µg/ml
itraconazol	0,0625 µg/ml a 16 µg/ml
fluconazol	0,5 µg/ml a 128 µg/ml
voriconazol	0,0625 µg/ml a 16 µg/ml
terbinafina	0,0312 µg/ml a 8 µg/ml
caspofungina	0,25 µg/ml a 64 µg/ml
anfotericina B	0,0312 µg/ml a 8 µg/ml

4.1.5 Meio de cultivo

Para a manutenção dos cultivos e ativação dos inóculos foi utilizado ágar batata-dextrose. Para os testes de suscetibilidade foi utilizado o meio de cultivo sintético quimicamente definido caldo RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH) tamponado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) e suplementado com dextrose 2%. Após o preparo do

meio com tampão o pH foi medido mantendo-se em $7,0 \pm 0,1$ em temperatura ambiente (25°C).

4.1.6 Preparo das diluições dos antifúngicos nas placas de microdiluição

Foram utilizados tubos de ensaio estéreis na preparação das diluições dos antifúngicos e placas de microdiluição, estéreis, com 96 poços para realização dos ensaios. O volume de cada solução de trabalho foi de 0,1 mL por poço em cada teste na placa de microdiluição num total de 1,0 mL para 9 diluições testadas. As soluções de trabalho para cada antifúngico foram 2 vezes mais concentradas do que as concentrações finais, considerando-se que ocorre uma diluição 1:2 da solução de trabalho quando combinada com 0,1 ml do inóculo. Todas as avaliações foram realizadas em duplicata com repetições para resultados discordantes.

4.1.7 Preparação dos inóculos

Para induzir-se a produção de conídios do fungo utilizou-se cultivo em ágar batata-dextrose por 7 dias a 30°C. Após o crescimento os cultivos em tubos de ensaio foram cobertos com 1,0 mL de salina estéril 0,85% com aproximadamente 0,01 mL de Tween 20 estéril. Procedeu-se então o preparo da suspensão de conídios e fragmentos de hifas agitando-se delicadamente o tubo com ponteira estéril; transferiu-se a suspensão para tubo estéril onde ocorreu a sedimentação das partículas mais pesadas após 3 a 5 minutos de repouso. A suspensão sobrenadante foi transferida para novo tubo estéril onde foi homogeneizada em agitador de tubos por 15 segundos. A turvação desta suspensão foi padronizada utilizando-se espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 530 nm e leitura de transmitância entre 80 a 82%. Após diluição a 1:50 em caldo RPMI a densidade obtida era 2 vezes maior que $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL consideradas necessárias para os ensaios *in vitro*.

4.1.8 Inoculação nas placas de microdiluição

Cada poço das placas de microdiluição contendo 0,1 mL das concentrações dos antifúngicos era inoculada com 0,1 mL da suspensão do inóculo padronizado. Os poços de controle positivo continham 0,1mL do inóculo e 0,1 mL de meio sem qualquer droga.

4.1.9 Incubação

Todas as placas de microdiluição eram incubadas a 35°C em aerobiose e sem agitação.

4.1.10 Leitura dos resultados

Após 46 – 50 horas de incubação realizava-se a leitura dos testes. No teste convencional de microdiluição, o crescimento em cada poço era comparado com o do controle positivo com o auxílio de um espelho. A seguir, cada poço de microdiluição recebia uma distinção numérica da seguinte forma: (4) = nenhuma redução de crescimento; (3) = ligeira redução de crescimento ou aproximadamente 75% do controle positivo; (2) = redução proeminente de crescimento ou aproximadamente 50% do crescimento do controle positivo; (1) = ligeiro crescimento ou aproximadamente 25% do crescimento do controle positivo; e (0) = opticamente claro ou completa ausência de crescimento. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram determinadas entre (1) (CIM-1) e (0) (CIM-0) dependendo do antifúngico avaliado.

4.2 Ensaio *in vivo* para avaliação da eficácia de antifungoterapia na esporotricose experimental em modelo murino

4.2.1 Isolado

Isolado clínico humano de *Sporothrix schenckii* (Ss/HUSM-1568) obtido a partir de esporotricose linfocutânea pertencente à micoteca do LAPEMI (Laboratório de Pesquisas Micológicas) .

4.2.2 Inóculo

O inóculo utilizado consistiu de uma suspensão de conídios em água para injetáveis preparado a partir do cultivo em ágar batata por 7 dias a 25°C contendo um total de 3×10^6 UFC em 0,2 mL, mensurados por contagem em hemocítômetro (KONG et al, 2006).

4.2.3 Animais

Foram utilizados 80 camundongos (*Mus musculus*) Swiss – CF1/UFSM adquiridos do biotério central da UFSM, sendo 40 machos e 40 fêmeas com idade de 6 semanas e pesando aproximadamente 20,0 g. Estes foram divididos em grupos de 10 animais conforme Quadro 1.

Grupo 01	10 fêmeas tratadas com itraconazol
Grupo 02	10 machos tratados com itraconazol
Grupo 03	10 machos tratados com voriconazol
Grupo 04	10 fêmeas tratadas com voriconazol
Grupo 05	10 fêmeas tratadas com anfotericina b
Grupo 06	10 machos tratados com anfotericina b
Grupo 07	10 machos sem tratamento
Grupo 08	10 fêmeas sem tratamento

Quadro 1 - Distribuição dos animais em grupos separados por sexo e tipo de tratamento.

Todos os grupos foram mantidos a temperatura de 22°C com água e ração *ad libitum*.

Os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 0,2 mL do inóculo. A eutanásia foi realizada 31 dias após a inoculação (KAN & BENNETT, 1988)

4.2.4 Antifúngicos utilizados

Três agentes antifúngicos foram testados: itraconazol (Sporanox® - Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.) adquirido na forma de cápsulas com 100 mg , voriconazol (Vfend® - Laboratórios Pfizer Ltda.) adquirido na forma de frasco-ampola com 200 mg de pó para solução de infusão e anfotericina B (desoxicolato de sódio) (Anforicin® - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.) adquirida na forma de frasco-ampola com 50 mg de pó para solução de infusão.

O itraconazol foi diluído em PEG 300 (polietilenoglicol) com concentração final de 8mg/mL aliqüotados em frascos contendo 4,0 mL.

O voriconazol foi diluído em água para injetáveis com concentração final de 2mg/mL aliqüotados em frascos contendo 1,0 mL.

A anfotericina B foi diluída em água para injetáveis com concentração final de 0,9mg/mL aliqüotados em frascos contendo 1,0 mL.

Todos os frascos foram congelados e protegidos da luz durante o período de tratamento, sendo descongelados de acordo com a demanda diária.

4.2.5 Administração dos tratamentos

Os tratamentos iniciaram-se 3 dias após a inoculação com esquema posológico de doses únicas diárias por 28 dias. Os animais dos grupos de tratamento com itraconazol receberam dosagem equivalente a 80mg/kg em volume de 0,2 mL por gavagem. Nos grupos de tratamento com voriconazol foi administrada a dosagem equivalente a 10 mg/kg em volume de 0,1mL por via intraperitoneal. Os grupos de tratamento com anfotericina B receberam dosagem equivalente a 4,5 mg/kg em volume de 0,1mL por via intraperitoneal. Os grupos controle não receberam tratamento antifúngico (KAN & BENNETT, 1988).

Todos os grupos foram observados diariamente quanto às condições de mobilidade, coordenação motora, presença de lesões e mortalidade.

4.2.6 Avaliação micológica dos órgãos de animais necropsiados

Ao final dos 28 dias de tratamento todos os animais sofreram eutanásia por anestesia profunda com éter etílico. Realizaram-se as necropsias com retirada dos órgãos e posterior coleta de amostras do fígado, baço, pulmão, rins e testículos para cultura em ágar Mycosel®. Os órgãos foram submetidos à avaliação macroscópica.

Pequenos fragmentos dos órgãos foram semeados diretamente em tubos contendo ágar Mycosel®, permanecendo incubados por 21 dias a 25°C, para avaliação qualitativa da disseminação fúngica.

4.2.7 Análise estatística

Para comparar a eficácia dos tratamentos foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$) e o Teste de Comparações Múltiplas ($p < 0,05$). Na análise de associação entre o sexo dos animais e a extensão da infecção nos grupos tratados e não-tratados foi utilizado o Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente aos antifúngicos azólicos, terbinafina, caspofungina e anfotericina B

Os perfis de suscetibilidade *in vitro* para os 41 isolados de *S. schenckii* foram determinados frente ao miconazol, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, terbinafina, voriconazol, caspofungina e anfotericina B e encontram-se dispostos na Tabela 1. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) obtidas para as leveduras utilizadas no controle de qualidade, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, estiveram dentro dos limites estabelecidos pelos protocolos do CLSI (M38-A , M27-A2).

Tabela 1- Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM)^a de 8 antifúngicos frente a 41 isolados clínicos de *S. schenckii*.

Isolados	Antifúngicos							
	MIC	ITC	CET	FLU	TER	VOR	CAS	ANB
01	2	0,25	0,5	64	0,25	8	16	0,5
02	2	0,125	0,25	64	0,25	8	32	0,25
03	0,5	0,125	0,25	128	0,125	2	16	0,25
04	1	0,125	0,125	64	0,0625	4	32	1
05	1	0,125	0,25	64	0,25	8	8	0,0312
06	2	0,5	0,5	128	<0,0625	4	32	0,5
07	2	0,25	0,25	128	0,125	4	32	0,5
08	1	0,25	0,5	64	0,25	8	32	0,5
09	1	0,125	0,25	128	0,0625	8	32	0,0312
10	0,5	<0,0625	0,125	64	0,125	4	8	0,0625
11	1	0,125	0,125	16	<0,0312	8	16	0,25
12	2	0,5	0,5	128	0,25	8	16	0,0625
13	0,5	<0,0625	<0,0625	128	0,25	1	8	0,0312
14	1	0,25	0,25	64	0,0625	8	16	0,25
15	0,5	0,125	0,125	128	0,125	4	16	0,25
16	0,5	0,25	0,50	128	0,25	8	>32	0,5
17^b	0,5	0,125	0,125	128	0,125	16	8	0,125
18	1	0,25	0,5	128	<0,0312	4	32	0,125
19	1	0,50	2	128	0,125	16	32	0,25
20	2	0,125	0,25	128	0,25	8	8	0,5
21	1	0,25	0,5	128	0,125	16	16	0,25
22	1	0,125	0,25	128	0,0625	4	32	0,25
23	4	0,50	0,25	64	0,125	8	32	0,5
24	1	0,25	0,125	64	0,25	4	32	1
25^b	0,5	0,25	0,5	64	0,0625	4	16	0,125
26	2	0,25	1	32	0,0625	4	32	0,0625
27	16	>128	8	128	0,25	2	>32	2
28	2	0,25	0,25	32	0,125	4	32	0,125
29	1	0,125	0,5	16	0,0625	4	8	0,125
30	1	0,25	0,5	64	0,125	8	32	0,25
31^b	8	>16	4	64	0,25	2	32	0,5
32^b	8	>16	4	128	0,125	4	32	1
33	2	1	2	128	0,25	16	32	1
34	2	1	0,5	128	0,125	4	32	0,5
35	1	0,5	0,5	128	0,125	8	32	0,25
36	1	0,5	0,5	128	0,125	8	>32	1
37	2	0,5	0,25	128	0,125	16	32	0,125
38	2	1	2	128	0,125	8	32	1
39	1	0,5	0,5	128	0,25	8	32	2
40	1	<0,0625	0,25	128	0,125	8	32	1
41	1	0,25	0,5	128	0,125	8	32	2
<i>C. Krusei</i> ATCC 6258	8	0,5	0,5	32	>8	0,5	0,5	1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2	0,125	0,0625	2	1	0,125	0,5	0,5

^a CIM (µg/mL).

^b Isolados clínicos de animais; MIC = miconazol, ITC = itraconazol, CET = cetoconazol, FLU = fluconazol, TER = terbinafina, VOR = voriconazol, CAS = caspofungina, ANB = anfotericina B.

5.1.1 Suscetibilidade de *S. schenckii* aos imidazólicos: miconazol e cetoconazol

Frente ao miconazol observou-se Intervalo de Suscetibilidade (IS) entre 0,5 – 16 µg/ml com Média Geométrica (MG) de 1,333µg/ml (Tabela 4). A Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% dos isolados (CIM₅₀) foi de 1 µg/ml e a Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 90% dos isolados (CIM₉₀) foi de 2 µg/ml (Tabela 4). Frente ao cetoconazol observou-se IS entre <0,0625 – 8 µg/ml com MG de 0,422 µg/ml (Tabela 4); a CIM₅₀= 0,5 µg/ml e CIM₉₀= 2 µg/ml (Tabela 4). O valor da MG das CIMs para o miconazol foi 3 vezes superior ao valor obtido para o cetoconazol .

5.1.2 Suscetibilidade de *S. schenckii* aos triazólicos de 1ª geração: itraconazol e fluconazol

Representando os triazólicos de 1ª geração neste estudo foram incluídos o itraconazol e o fluconazol. A suscetibilidade de 41 isolados de *S. schenckii* ao itraconazol variou entre <0,0625 µg/ml a >128 µg/ml; a MG foi de 0,339 µg/ml (Tabela 4). Notadamente, um isolado apresentou resistência absoluta ao itraconazol com CIM > 128 µg/ml e outros dois isolados CIM > 16 µg/ml (Tabela 1). Os valores de CIM₅₀= 0,25 µg/ml e CIM₉₀= 1 µg/ml demonstraram a heterogeneidade entre os isolados (Tabela 4).

O IS frente ao fluconazol variou entre 16 - 128 µg/ml, com MG de 88,243 µg/ml e CIM₅₀ e CIM₉₀ >64 µg/ml (Tabela 4). Verificou-se que 25 isolados (60,98%) evidenciaram CIMs > 64 µg/ml (Tabela 2).

5.1.3 Suscetibilidade de *S. schenckii* aos triazólicos de 2ª geração: voriconazol

A suscetibilidade frente ao voriconazol dos isolados de *S. schenckii* estudados variou entre 1 – 16 µg/ml; a MG foi de 5,901 µg/ml (Tabela 4). A CIM₅₀=8 µg/ml e

CIM₉₀= 16 µg/ml (Tabela 4). Trinta e dois isolados (78,05%) evidenciaram CIMs entre 4 e 8 µg/ml (Tabela 2).

5.1.4 Suscetibilidade de *S. schenckii* às alilaminas: terbinafina

A terbinafina foi o agente antifúngico com maior atividade *in vitro* frente ao *S. schenckii*. O perfil de suscetibilidade variou entre <0,0312 – 0,25 µg/ml com MG de 0,127 µg/ml (Tabela 4). A CIM₅₀ foi de 0,125 µg/ml e a CIM₉₀ foi de 0,25 µg/ml (Tabela 4). A concentração de 0,125µg/ml foi capaz de inibir 28 isolados (68,29%) (Tabela 3).

5.1.5 Suscetibilidade de *S. schenckii* às equinocandinas: caspofungina

A caspofungina foi testada como padrão da classe das equinocandinas. Esta apresentou baixa atividade *in vitro* com faixa de suscetibilidade variando entre 8 µg/ml a >32 µg/ml e MG de 22,819 µg/ml (Tabela 4). Verificou-se homogeneidade no perfil de suscetibilidade dos isolados frente à caspofungina com CIM₅₀ e CIM₉₀ de 32 µg/ml (Tabela 4). Vinte e sete isolados (65,85%) apresentaram CIM= 32 µg/ml (Tabela 3).

5.1.6 Suscetibilidade de *S. schenckii* aos poliênicos: anfotericina B

A maioria dos 41 isolados de *S. schenckii* avaliados demonstrou alta sensibilidade a anfotericina B. O intervalo de suscetibilidade variou entre 0,0312 – 2 µg/ml com MG de 0,301 µg/ml (Tabela 4). Para a CIM₅₀ o valor foi de 0,25 µg/ml e CIM₉₀ foi de 1 µg/ml (Tabela 4). Vinte e dois isolados (54%) apresentaram CIM < 0,5 µg/ml (Tabela 3).

Tabela 2 - Suscetibilidade de *S. schenkii* frente aos antifúngicos azólicos, com base nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs).

Antifúngico	Número e percentual de isolados suscetíveis a concentrações (µg/ml) de:											
	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
MIC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (17,07%)	18 (43,90%)	12 (29,27%)	1 (2,44%)	2 (4,88%)	1 (2,44%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ITC	3 (7,32%)	11 (26,83%)	13 (31,71%)	8 (19,51%)	3 (7,32%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4,88%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,44%)
CET	1 (2,44%)	6 (14,63%)	12 (29,27%)	15 (36,59%)	1 (2,44%)	3 (7,32%)	2 (4,88%)	1 (2,44%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
FLU	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4,88%)	2 (4,88%)	12 (29,27%)	25 (60,98%)
VOR	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,44%)	3 (7,32%)	14 (34,15%)	18 (43,90%)	5 (12,20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

MIC = miconazol, ITC = itraconazol, CET = cetoconazol, FLU = fluconazol, VOR = voriconazol.

n=41.

Tabela 3 - Suscetibilidade de *S. schenkii* frente à terbinafina, caspofungina e anfotericina B, com base nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs).

Antifúngico	Número e percentual de isolados suscetíveis a concentrações (µg/ml) de:											
	0,0312	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
TER	2 (4,88%)	8 (19,51%)	18 (43,90%)	13 (31,71%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CAS	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (14,63%)	8 (19,51%)	27 (65,85%)	0 (0%)
ANB	3 (7,32%)	3 (7,32%)	6 (14,63%)	10 (24,39%)	9 (21,95%)	7 (17,07%)	3 (7,32%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

TER = terbinafina, CAS = caspofungina, ANB = anfotericina B.

n=41.

Tabela 4 – Parâmetros de suscetibilidade de *S. schenckii* frente a 8 antifúngicos.

Antifúngicos	Intervalo de suscetibilidade (CIMs)	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Média Geométrica
miconazol	0,5 – 16	1	2	1,333
itraconazol	<0,0625 – >128	0,25	1	0,339
cetoconazol	<0,0625 – 8	0,5	2	0,422
fluconazol	16 - >64	128	128	88,243
terbinafina	<0,0312 - 0,25	0,125	0,25	0,127
voriconazol	1 – 16	8	16	5,901
casposungina	8 - >32	32	32	22,819
anfotericina B	0,0312 - 2	0,25	1	0,301

CIM ($\mu\text{g/mL}$).

CIM₅₀: Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados testados.

CIM₉₀: Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados testados.
n=41.

5.2 Avaliação da antifungoterapia na esporotricose experimental em modelo murino

Os resultados deste estudo estão baseados na avaliação microbiológica dos órgãos infectados (extensão da infecção) e não no perfil de sobrevivência dos animais.

Dos 80 camundongos utilizados no estudo, 60 receberam tratamento e 20 foram definidos como grupos controle.

A distribuição da positividade encontrada nos cultivos dos órgãos dos animais após 31 dias de infecção e 28 dias de tratamento (grupos submetidos às terapias antifúngicas) estão dispostas nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

Nos grupos controles foram incluídos camundongos machos e fêmeas divididos em dois grupos de 10 animais. Os animais receberam água e ração *ad libitum* sem nenhuma intervenção farmacológica sobre a infecção por *S. schenckii*. Ao final de 31 dias do curso de infecção os animais demonstravam alguma apatia mas sem lesões externas que pudessem estar relacionadas com a infecção. Os órgãos apresentaram alterações morfológicas com destaque para hepatoesplenomegalia e multiplicidade de lesões granulomatosas encontradas no fígado, baço e peritônio. O grupo dos

camundongos machos também apresentou claramente uma maior amplitude e intensidade de infecção nos órgãos avaliados por simples observação visual. Os testículos apresentaram intensa infecção com presença de granulomas e áreas necróticas.

Nos grupos controle, os cultivos fúngicos obtidos a partir dos tecidos necropsiados evidenciaram 68,9% de positividade. Os percentuais de infecção dos fragmentos de órgãos submetidos a cultivo pós-necropsia foram de 75% para o fígado, 80% para o baço, 55% para o pulmão e 55% para o rim. Nos machos foi encontrada uma positividade de 90% para os cultivos de fragmentos de testículos (Tabela 5).

Tabela 5 – Cultivos positivos de órgãos de camundongos infectados com *S. schenckii* e não tratados com antifúngicos (grupos controle).

camundongos	Nº. (%) de órgãos positivos					Total
	Fígado	Baço	Pulmão	Rim	Testículo	
machos^a	8 (80)	9 (90)	8 (80)	9 (90)	9 (90)	43 (86)
fêmeas^a	7 (70)	7 (70)	3 (30)	2 (20)	-	19 (47,5)
Total	15 (75)	16 (80)	11 (55)	11 (55)	9 (90)	62 (68,9)

^a Nenhum tratamento no curso de 28 dias de infecção.

5.2.1 Avaliação da atividade de itraconazol

O itraconazol foi testado neste modelo experimental na dosagem de 80 mg/kg e administrado por gavagem uma vez ao dia. Neste esquema de tratamento foram incluídos 20 animais, 10 machos e 10 fêmeas. No curso de tratamento os animais não manifestaram lesões externas, tampouco anormalidades comportamentais severas ou alterações de movimentação e coordenação tais como ataxia. A dose foi bem tolerada apesar da observação de alguma apatia nos animais. Não houve registro de mortes ou

traumas graves decorrentes do procedimento de gavagem. Alguns animais apresentaram fígado e/ou baço aumentados com presença de lesões granulomatosas.

Dos 90 órgãos investigados pós-necropsia, englobando os grupos de machos e fêmeas, 46 evidenciaram cultura positiva para *S. schenckii* perfazendo 51,1% do total. Os percentuais de positividade verificados nos fragmentos dos órgãos cultivados dos animais tratados com itraconazol foram de 60% para o fígado, 50% para o baço, 45% para o pulmão e 35% para o rim. A positividade encontrada nos cultivos de fragmentos de testículos foi de 80% (Tabela 6).

Tabela 6 – Cultivos positivos de órgãos de camundongos infectados com *S. schenckii* após tratamento com itraconazol.

camundongos	Nº. (%) de órgãos positivos					Total
	Fígado	Baço	Pulmão	Rim	Testículo	
machos^a	6 (60)	7 (70)	6 (60)	6 (60)	8 (80)	33 (66)
fêmeas^a	6 (60)	3 (30)	3 (30)	1 (10)	-	13 (32,5)
Total	12 (60)	10 (50)	9 (45)	7 (35)	8 (80)	46 (51,1)

^a Dose = 80mg/kg/24h via gavagem em 28 dias de tratamento.

5.2.2 Avaliação da atividade de voriconazol

O voriconazol foi administrado aos animais de ambos os grupos (machos e fêmeas) na dosagem de 10 mg/kg por via intraperitoneal uma vez ao dia. Não foram observadas lesões externas, anormalidades comportamentais ou alterações motoras significativas. Alguns animais apresentaram nódulos reacionais às aplicações intraperitoneais do medicamento. Nenhuma morte foi observada no curso do tratamento e destaca-se como relevante a hepatoesplenomegalia e multiplicidade de lesões granulomatosas encontradas em fígado e baço dos animais com maior

comprometimento claramente definido para os camundongos machos. Nos testículos pode ser verificado um comprometimento total do órgão causado pela infecção com presença de múltiplas lesões granulomatosas e amplas áreas de necrose.

Um total de 90 órgãos representando o somatório de todos os animais tratados com voriconazol, foi submetido a cultivo, resultando em 48 positivos (53,3%) para *S. schenckii*. Entre os órgãos avaliados através de culturas os percentuais de positividade foram de 60% para o fígado, 55% para o baço, 40% para o pulmão e 40% para o rim. Neste grupo de tratamento, os fragmentos de testículos submetidos à cultura evidenciaram 90% de positividade (Tabela 7).

Tabela 7 – Cultivos positivos de órgãos de camundongos infectados com *S. schenckii* após tratamento com voriconazol.

camundongos	Nº. (%) de órgãos positivos					Total
	Fígado	Baço	Pulmão	Rim	Testículo	
machos^a	9 (90)	7 (70)	7 (70)	5 (50)	9 (90)	37 (74)
fêmeas^a	3 (30)	4 (40)	1 (10)	3 (30)	-	11 (27,5)
Total	12 (60)	11 (55)	8 (40)	8 (40)	9 (90)	48 (53,3)

^a Dose = 10mg/kg/24h via intraperitoneal em 28 dias de tratamento.

5.2.3 Avaliação da atividade de anfotericina B

A anfotericina B foi administrada por via intraperitoneal na dosagem de 4,5 mg/kg uma vez ao dia. O grupo constituído por camundongos machos tratados com anfotericina B apresentou anormalidades comportamentais relacionadas à agressividade quando comparados com outros grupos. Lesões externas foram observadas nos animais deste grupo resultantes das constantes brigas. Não foram visualizadas lesões linfocutâneas ou cutâneas relacionadas com a infecção

disseminada por *S. schenckii*. A dose administrada foi bem tolerada; não houve alterações de coordenação e movimentação ou outros efeitos adversos observáveis em nenhum dos grupos tratados com anfotericina B. Após as necropsias, os órgãos apresentavam-se com morfologia normal, sem lesões granulomatosas ou alterações macroscópicas.

O tratamento com anfotericina B foi claramente eficaz no controle da infecção experimental por *S. schenckii* em ambos os grupos tratados. Apenas um animal macho tratado apresentou cultura de órgãos positiva e neste caso, o óbito ocorreu no início do tratamento, em decorrência de brigas. Após as necropsias, fragmentos teciduais de fígado, baço, pulmão e rim dos grupos machos e fêmeas bem como testículos dos machos foram submetidos a exame cultural em ágar Mycosel®, assim como realizado para os outros grupos. Os resultados obtidos demonstram que apenas 5,5% dos órgãos cultivados deste grupo foram positivos (Tabela 8).

Tabela 8 – Cultivos positivos de órgãos de camundongos infectados com *S. schenckii* após tratamento com anfotericina B.

camundongos	Nº. (%) de órgãos positivos					
	Fígado	Baço	Pulmão	Rim	Testículo	Total
machos^a	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	5 (10)
fêmeas^a	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)
Total	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (10)	5 (5,5)

^a Dose = 4,5mg/kg/24h via intraperitoneal em 28 dias de tratamento.

5.2.4 Avaliação cultural dos tecidos de animais infectados experimentalmente com *S. schenckii* submetidos a diferentes tratamentos antifúngicos

As avaliações de positividade do número de órgãos infectados (1 até 4) foram efetuadas considerando os animais individualmente. Nos grupos que não receberam nenhum tratamento antifúngico os percentuais foram de 15% nos animais com apenas 1 órgão infectado, 20% para 2 órgãos infectados, 30% para 3 órgãos infectados e 30% para 4 órgãos infectados por *S. schenckii* nos cultivos efetuados com fragmentos de órgãos pós-necropsia (Tabela 9).

Nos grupos tratados com itraconazol os percentuais foram de 40% nos animais com apenas 1 órgão infectado, 10% para 2 órgãos infectados, 10% para 3 órgãos infectados e 25% para 4 órgãos infectados. Entre os 20 animais tratados com itraconazol, 17 (85%) apresentaram ao menos 1 órgão positivo para *S. schenckii* nos cultivos pós-necropsia (Tabela 9).

Nos grupos tratados com voriconazol os percentuais foram de 20% nos animais com apenas 1 órgão, 5% para 2 órgãos infectados, 30% para 3 órgãos infectados e 20% para 4 órgãos infectados. Entre os 20 animais tratados com voriconazol, 15 (75%) demonstraram ao menos 1 órgão positivo para *S. schenckii* quando submetidos aos exames culturais (Tabela 9).

Nos grupos que receberam antifungioterapia com anfotericina B, apenas 1 animal evidenciou crescimento fúngico nas culturas de fragmentos dos órgãos investigados. Os cultivos dos fragmentos de órgãos dos animais tratados com anfotericina B demonstraram que 95% não apresentaram qualquer órgão infectado por *S. schenckii*, enquanto 95% dos animais que não receberam qualquer terapia antifúngica apresentaram ao menos 1 órgão positivo para *S. schenckii* (Tabela 9).

Tabela 9 – Relação entre os diferentes tratamentos antifúngicos com o número de órgãos evidenciando cultivos positivos para *S. schenckii*.

Tratamentos	Nº. / % (% cumulativo) de animais com cultivos positivos de:			
	1 órgão	2 órgãos	3 órgãos	4 órgãos
ITC	8 / 40 (40)	2 / 10 (50)	2 / 10 (60)	5 / 25 (85)
VOR	4 / 20 (20)	1 / 5 (25)	6 / 30 (55)	4 / 20 (75)
ANB	0	0	0	1 / 5 (5)
controle	3 / 15 (15)	4 / 20 (35)	6 / 30 (65)	6 / 30 (95)

ITC = itraconazol, VOR = voriconazol, ANB = anfotericina B.

5.2.5 Comparações estatísticas entre os tratamentos

Quando se comparou a eficácia dos tratamentos com itraconazol, voriconazol e anfotericina B, com base nos cultivos dos órgãos necropsiados, os tratamentos com anfotericina B foram significativamente mais efetivos do que os demais (Teste de Comparações Múltiplas; $p < 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis evidenciou haver diferença significativa entre pelo menos 2 grupos, o grupo tratado com anfotericina B e o grupo controle ($p < 0,001$) (Tabela 10).

O Teste de Comparações Múltiplas e o Teste de Kruskal-Wallis não puderam evidenciar diferença significativa na eficácia de tratamento entre os grupos tratados com itraconazol e voriconazol. Estes testes demonstraram que não houve significância estatística quando se comparou os grupos tratados com itraconazol e voriconazol com os grupos controles (Tabela 10).

Tabela 10 - Percentuais de positividade em cultivos fúngicos obtidos de necropsias de camundongos infectados com *S. schenckii* e submetidos a diferentes terapêuticas fúngicas.

Terapêuticas com:	Nº. de órgãos	% de cultivos positivos
itraconazol	90	51,1
voriconazol	90	53,3
anfotericina B	90	5,5 ^{a,b}
Sem tratamento (controle)	90	68,9

^a Significância estatística evidenciada pelo teste de Comparações Múltiplas ($p < 0,05$).

^b Significância estatística evidenciada pelo teste de Kruskal-Wallis entre controle e grupo tratado com anfotericina B ($p < 0,001$).

5.2.6 Avaliação da variável sexo na esporotricose experimental em modelo murino sob diferentes tratamentos

Para se avaliar a relação entre sexo dos animais e a magnitude da infecção esporotricótica experimental bem como os tratamentos administrados, foi utilizado o Teste Exato de Fischer. O referido teste foi aplicado para cruzamentos com tabelas 2x2 onde, cada indivíduo foi classificado pelo sexo (macho ou fêmea) e pela resposta ao tratamento (cultivo positivo ou negativo).

Nos grupos controles o Teste Exato de Fisher pôde constatar que o tecido pulmonar dos machos foi significativamente mais infectado (80% de cultivos positivos) que o tecido pulmonar das fêmeas (apenas 30% de cultivos positivos). De forma similar, o Teste Exato de Fisher também permitiu detectar que o tecido renal dos machos resultou em 90% de cultivos fúngicos positivos para *S. schenckii* enquanto apenas 20% dos tecidos renais das fêmeas evidenciaram a presença deste fungo.

Constatou-se associação significativa entre o sexo feminino e o tecido renal; com base no crescimento fúngico das necropsias, o itraconazol foi significativamente mais ativo no tecido renal das fêmeas (apenas 10% de positividade) do que no mesmo tecido dos machos (60% de cultivos positivos).

Da mesma forma, constatou-se que os tratamentos com voriconazol foram significativamente mais efetivos no fígado das fêmeas (apenas 30% de positividade dos

cultivos) do que no mesmo tecido dos machos (90% dos cultivos positivos). Similarmente, quando se relacionou sexo com tecido pulmonar, o voriconazol foi mais efetivo no pulmão das fêmeas (apenas 10% de cultivos positivos) do que no pulmão de camundongos machos infectados pelo *S. schenckii* (70% dos cultivos positivos).

Tabela 11 - Valores de (p) encontrados para associação entre sexo dos camundongos com o número de órgãos evidenciando cultivos positivos para *S. schenckii*, frente a diferentes tratamentos.

Tratamento	Fígado			Baço			Pulmão			Rim		
	M	F	(p)	M	F	(p)	M	F	(p)	M	F	(p)
Itraconazol	6	6	0,675	7	3	0,089	6	3	0,185	6	1	0,029 ^a
voriconazol	9	3	0,010 ^a	7	4	0,185	7	1	0,010 ^a	5	3	0,325
Controle	8	7	0,500	9	7	0,297	8	3	0,035 ^a	9	2	0,003 ^a

M = machos, F = fêmeas.

^a Associação significativa relacionando sexo dos camundongos e a positividade nos órgãos investigados aplicando o Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Perfil de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente aos antifúngicos azólicos, terbinafina, caspofungina e anfotericina B

Na esporotricose, após a definição da etiologia fúngica da infecção, a escolha do fármaco adequado para o tratamento torna-se o foco principal visto que a esporotricose raramente apresenta remissão espontânea. Um protocolo terapêutico atualizado foi publicado recentemente por Kauffman et al (2007) sugerindo as condutas terapêuticas para as diferentes formas clínicas de esporotricose.

O sucesso das terapêuticas antimicrobianas, incluindo as antifúngicas, depende de fatores do hospedeiro, do antimicrobiano e do microrganismo; este último pode evidenciar variações na suscetibilidade ao fármaco eleito, comprometendo a terapêutica. Em bacteriologia o fenômeno da resistência aos antibacterianos é frequente e bem estudado; todavia a resistência em fungos ainda se constitui em área pouco avaliada, uma vez que somente testes *in vitro* com *Candida spp.* permitem a clara classificação dos microrganismos em sensíveis ou resistentes. Uma das principais razões para este contexto é a dificuldade de padronização dos testes de suscetibilidade aos fungos filamentosos (ESPINEL-INGROFF et al, 1998; SULLIVAN et al, 2004)

Espinell-Ingroff et al (1995) avaliaram condições para realização de testes de suscetibilidade aos antifúngicos para fungos filamentosos utilizando o protocolo M27-P com algumas modificações. Este estudo demonstrava o progresso na padronização dos testes de suscetibilidade para leveduras e o interesse em normatizar um protocolo também para os fungos filamentosos patogênicos. Os autores sugeriram então o desenvolvimento de uma metodologia padrão para fungos filamentosos sendo possível a utilização de macro ou microdiluição. Logo, os esforços dos pesquisadores resultaram na aprovação do protocolo M38-A (2002) referido como padrão para ensaios de suscetibilidade para alguns fungos filamentosos incluindo *Sporothrix schenckii*.

No presente estudo, 41 isolados de *Sporothrix schenckii* foram avaliados quanto a suscetibilidade frente a 8 antifúngicos pertencentes a diferentes classes .

6.1.1 Suscetibilidade de *S. schenckii* aos imidazólicos: miconazol e cetoconazol

O miconazol, mesmo não sendo mais disponível para uso oral ou intravenoso, foi avaliado. Mais de 80% dos isolados demonstraram reduzida sensibilidade ao miconazol (CIM $\geq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$). O intervalo de suscetibilidade encontrado foi 0,5 – 16 $\mu\text{g/ml}$ e média geométrica de 1,333; a CIM₅₀= 1 $\mu\text{g/ml}$ e a CIM₉₀= 2 $\mu\text{g/ml}$.

Este perfil de reduzida sensibilidade, é sugerido com base em um caso de esporotricose osteoarticular reportado onde ocorreu falha terapêutica utilizando-se miconazol endovenoso com dose de 10mg/kg durante 25 dias e seqüência de administração oral de 20 mg/kg por mais 7 dias. As concentrações séricas estiveram sempre bem acima da CIM (0,78 $\mu\text{g/mL}$) durante o curso do tratamento sem nenhuma melhora observada. A resolução ocorreu após tratamento com anfotericina B (FISHER et al, 1978).

O miconazol foi avaliado por se constituir como primeiro azólico utilizado na clínica para tratamento de micoses sistêmicas.

Para o cetoconazol foi verificado um perfil inverso quando comparado com miconazol, com sensibilidade *in vitro* detectada em mais de 80% dos isolados (CIM $< 1,0$ $\mu\text{g/mL}$). A faixa de suscetibilidade variou entre $<0,0625$ $\mu\text{g/ml}$ e 8 $\mu\text{g/ml}$ com média geométrica de 0,422 $\mu\text{g/ml}$; a CIM₅₀= 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e CIM₉₀= 2 $\mu\text{g/ml}$.

A média geométrica das CIM encontrada neste estudo foi menor que a verificada por Trilles et al (2005) (0,84 $\mu\text{g/mL}$) e por Marimon et al (2007) (0,81 $\mu\text{g/mL}$), possivelmente porque estes autores utilizaram menor temperatura e maior tempo de incubação do que os parâmetros determinados pelo protocolo M38-A. Por outro lado, Alvarado-Ramírez & Torres-Rodríguez (2007) verificaram uma média geométrica das CIMs de cetoconazol mais baixa (0,2 $\mu\text{g/mL}$) utilizando o *kit* comercial SYO (*Sensititre YeastOne*) para avaliação de suscetibilidade.

A detecção de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* para o cetoconazol deve ser interpretada com cuidado, pois, muitas vezes não se correlaciona com a atividade terapêutica, principalmente para as formas extracutâneas (CUADROS et al, 1990). Calhoun et al (1991) apresentaram casos de cura e remissão de esporotricose tratada com cetoconazol, o que sustenta o aspecto contraditório para este fármaco.

6.1.2 Suscetibilidade de *S. schenckii* aos triazólicos de 1ª geração: itraconazol e fluconazol

O perfil de suscetibilidade de *S. schenckii* ao itraconazol obtido no presente estudo foi caracterizado por faixa de suscetibilidade de $<0,0625 \mu\text{g/ml}$ a $>128 \mu\text{g/ml}$ com média geométrica de $0,339 \mu\text{g/ml}$; a $\text{CIM}_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$ e $\text{CIM}_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$.

Tomando por base a concentração de $1 \mu\text{g/ml}$, 85% dos isolados aqui estudados são sensíveis a este triazólico. Kohler et al (2006) observaram que 24% de seus isolados evidenciaram $\text{CIM} \geq 1,0 \mu\text{g/ml}$ ao itraconazol o que sugeriram como “redução da sensibilidade”. Segundo Meinerz et al (2007) $\text{CIM} \leq 1,0 \mu\text{g/ml}$ de itraconazol estão associadas a sensibilidade do *S. schenckii* a este triazólico. Os resultados de suscetibilidade obtidos frente ao itraconazol no presente estudo estiveram de acordo com outros estudos anteriores (SABATELLI et al, 2006; MEINERZ et al, 2007; ALVARADO-RAMÍREZ & TORRES-RODRÍGUEZ, 2007). No entanto, alguns autores observaram uma menor suscetibilidade de *S. schenckii* ao itraconazol com médias geométricas das CIMs calculadas em $1,56 \mu\text{g/mL}$ (MCGINNIS et al, 2001), $1,0 \mu\text{g/mL}$ (LÓPEZ et al, 2005), $4,08 \mu\text{g/mL}$ (TRILLES et al, 2005) e $4,65 \mu\text{g/mL}$ (MARIMON et al, 2007). Como mencionado anteriormente, o perfil de resistência verificado por tais estudos ($\text{MG} \geq 4 \mu\text{g/mL}$) pode não necessariamente representar a resistência do fungo, mas ser decorrente de alterações de parâmetros como tempo e temperatura de incubação diferentes daqueles estabelecidos pelo protocolo M38-A. A prévia exposição de *Aspergillus fumigatus* ao fluconazol determina a redução de suscetibilidade ao itraconazol (LIU et al, 2003); se mecanismos similares ocorrem com *S. schenckii* são hipóteses ainda não estudadas, mas que poderiam justificar CIMs mais elevadas nos estudos citados.

A suscetibilidade do *S. schenckii* sugere tratar-se de um fenômeno complexo com base em observações relativas à forma clínica da esporotricose ou a procedência dos isolados: Trilles et al (2005) observaram que os isolados da forma disseminada eram menos sensíveis ao itraconazol quando comparados com isolados da esporotricose cutânea. Meinerz et al (2007) observaram que os isolados clínicos de animais (cães e gatos) eram menos sensíveis (CIMs mais elevadas) do que isolados de

esporotricose humana. Confirmando tais achados, Kohler et al (2004) constataram 9 cepas de *S. schenckii* resistentes ao itraconazol (CIM \geq 4 $\mu\text{g/mL}$), todos isolados de felinos. Nossos resultados permitiram detectar 2 isolados de felinos cujas CIMs ao itraconazol foram superiores a 16 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1) o que está de acordo com as observações descritas.

Apesar da ausência de estudos clínicos comparativos (randomizados e duplo-cego), o itraconazol é considerado como primeira escolha de tratamento para esporotricose cutânea, linfocutânea e osteoarticular com eficiência estimada entre 84 a 100% utilizando-se o esquema posológico de 200 mg duas vezes ao dia (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004). Nas formas disseminadas o tratamento inicial é com anfotericina B sendo recomendado o uso de itraconazol somente duas semanas após o início do tratamento para se evitar recidivas da infecção (KAUFFMAN et al, 2007). Bolão et al (1994) relataram um caso de paciente com SIDA com quadro de esporotricose cutânea que respondeu apenas à terapia com itraconazol depois de seguidas falhas com cetoconazol, solução saturada de iodeto de potássio (SSKI), fluconazol e anfotericina B. No entanto, Silva-Vergara et al (2005) relataram um caso inicialmente diagnosticado como esporotricose cutânea disseminada em paciente com SIDA tratado com itraconazol e posterior recidiva na forma meníngea seguida de óbito após interrupção do tratamento.

Frente ao fluconazol os ensaios de suscetibilidade deste estudo evidenciaram uma faixa de suscetibilidade de 16 $\mu\text{g/ml}$ a 128 $\mu\text{g/ml}$ com média geométrica de 88,243 $\mu\text{g/ml}$; a CIM₅₀ e CIM₉₀ foram superiores a 64 $\mu\text{g/ml}$.

O perfil de suscetibilidade de *S. schenckii* evidenciou mais de 60% dos nossos isolados com CIMs de 128 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados estão de acordo com outros autores (ESPINEL-INGROFF et al, 1995; GONZÁLEZ et al, 2005). Apesar deste perfil de suscetibilidade, o fluconazol é considerado uma possível opção terapêutica em casos de esporotricose linfocutânea ou cutânea. O tratamento de esporotricose com altas doses (até 800 mg/dia) de fluconazol resulta em taxas de cura de no máximo 64% (KAUFFMAN et al, 2007).

Callens et al (2005) relataram o caso de um menino infectado pelo vírus HIV que desenvolveu esporotricose pulmonar a qual foi eficientemente debelada após

tratamento com fluconazol 200mg/dia. Entretanto, registra-se que pacientes com SIDA recebendo terapia profilática para meningite criptocócica (GOLDANI et al, 1999) ou tratamento para candidíase orofaríngea (LOSMAN & CAVANAUGH, 2004) com fluconazol ainda podem desenvolver esporotricose nas formas disseminada e pulmonar. A possibilidade da indução de resistência de *S. schenckii* aos azólicos com o uso prolongado de fluconazol é desconhecida. Apesar de o fluconazol demonstrar boa penetração na barreira hematoencefálica ao sistema nervoso central, sua utilização terapêutica é desaconselhada para casos de infecção esporotricótica neste sítios anatômicos (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004).

6.1.3 Suscetibilidade de *S. schenckii* aos triazólicos de 2ª geração: voriconazol

As avaliações de suscetibilidade de *S. schenckii* frente ao voriconazol puderam evidenciar uma faixa de suscetibilidade de 1 µg/ml a 16 µg/ml e média geométrica de 5,901 µg/ml; a CIM₅₀= 8 µg/ml e CIM₉₀= 16 µg/ml.

Outros autores já investigaram o perfil de suscetibilidade a este agente e relataram CIMs mais altas das aqui constatadas com base nas médias geométricas encontradas: 16 µg/mL (ESPINEL-INGROF, 1998), 6,5 µg/mL (MCGINNIS et al, 2001), 9,8 µg/mL (TRILLES et al, 2005), 13,2 µg/mL (MARIMON et al, 2007) e 9,3 µg/mL (ALVARADO-RAMÍREZ & TORRES-RODRÍGUEZ, 2007). No entanto, González et al (2005) declararam como potente a atividade *in vitro* do voriconazol contra *S. schenckii* com média geométrica das CIMs em 1,44 µg/mL. Estes autores sustentam que o voriconazol, além da aspergilose, seja avaliado clinicamente para outras micoses causadas por fungos filamentosos.

Não há nenhuma experiência clínica documentada sobre o uso de voriconazol na esporotricose. A maior parte dos estudos evidencia escassa atividade *in vitro* do voriconazol contra *S. schenckii*, apesar do fabricante mencionar atividade relevante deste fármaco *in vitro*. Um estudo recente referiu atividade *in vitro* do voriconazol sobre a redução de melanina em *Cryptococcus neoformans* através da inibição de enzima lacase (MARTINEZ et al, 2007). Os autores sugerem que este mecanismo poderia

incrementar a ação deste antifúngico contra fungos demáceos, o que também sustentaria e instiga as investigações desta atividade em *S. schenckii*.

6.1.4 Suscetibilidade de *S. schenckii* às alilaminas: terbinafina

Entre todos os antifúngicos avaliados, *S. schenckii* demonstrou maior sensibilidade *in vitro* à terbinafina. A faixa de suscetibilidade variou entre $<0,0312 \mu\text{g/mL}$ a $0,25 \mu\text{g/mL}$ com média geométrica de $0,127 \mu\text{g/mL}$; a $\text{CIM}_{50}=0,125 \mu\text{g/mL}$ e $\text{CIM}_{90}=0,25 \mu\text{g/mL}$.

Estudos avaliando a suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* à terbinafina reportam potente atividade deste fármaco. Jessup et al (1999) encontraram intervalo de suscetibilidade entre $0,03 \mu\text{g/mL}$ e $0,13 \mu\text{g/mL}$, similar ao observado no presente estudo. Kohler et al (2006) descrevem 65% dos isolados com $\text{CIM} \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$, enquanto constatamos em nosso estudo 68% nesta condição. Trilles et al (2005) encontraram valores mais elevados para as CIMs de terbinafina (MG= $0,8 \mu\text{g/mL}$) assim como Marimon et al (2007) (MG= $0,23 \mu\text{g/mL}$) quando comparados aos resultados do presente trabalho. Não foi possível evidenciar variações na suscetibilidade à terbinafina entre os isolados de origem humana e os de origem felina, fato também observado por outros autores (KOHLENER et al, 2004; MEINERZ et al, 2007).

Mesmo sendo restrita a experiência clínica no tratamento de esporotricose com terbinafina, este fármaco está indicado como segunda escolha de tratamento para esporotricose linfocutânea e cutânea (KAUFFMAN et al, 2007). Chapman et al (2006) avaliaram o tratamento com terbinafina em esporotricose linfocutânea e cutânea utilizando dois esquemas posológicos: 500 mg e 1000 mg ao dia. O esquema com 1000 mg/dia apresentou maior eficácia terapêutica (87%) em relação à dose mais baixa (52%). Coskun et al (2004) relataram sucesso terapêutico na esporotricose linfocutânea com 250 mg de terbinafina duas vezes ao dia durante 6 meses quando associada à solução saturada de iodeto de potássio (SSKI) nos dois meses iniciais. Estes autores sugerem esta associação como sinérgica e mais efetiva que a monoterapia com terbinafina.

6.1.5 Suscetibilidade de *S. schenckii* às equinocandinas: caspofungina

Verificou-se entre 41 isolados de *S. schenckii* estudados um intervalo de suscetibilidade entre 8 µg/mL e >32 µg/mL com média geométrica de 22,819 µg/mL; a CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de 32 µg/mL. Com base nas CIMs de caspofungina para *Candida sp.* e *Aspergillus sp.*, as CIMs obtidas para *S. schenckii* sugerem reduzida sensibilidade a esta equinocandina.

Em 1998, um trabalho avaliou a atividade *in vitro* de caspofungina contra diferentes fungos filamentosos oportunistas, dimórficos e leveduras (ESPINEL-INGROFF, 1998). Este estudo constituiu-se na única publicação que incluiu *S. schenckii* nos ensaios de suscetibilidade envolvendo caspofungina. Foram testados apenas 5 isolados que apresentaram intervalo de suscetibilidade entre 1,0 µg/mL e > 16 µg/mL com média geométrica das CIMs de 5,4 µg/mL. A autora do referido estudo realizou leitura de CIM-2 (aproximadamente 50% do crescimento do controle positivo) enquanto utilizamos CIM-1 (aproximadamente 25% do crescimento do controle positivo). Provavelmente, isto seja um fator relevante que justifique a diferença entre os resultados.

A leitura de ponto final para determinação da CIM em testes com caspofungina é um fator problemático para reprodutibilidade em ensaios de suscetibilidade com fungos filamentosos, sendo sugerida a concentração efetiva mínima (CEM) como alternativa viável (ODDS et al, 2004). A CEM é definida como a menor concentração de caspofungina capaz de produzir compactação de crescimento (visualização macroscópica) e presença de hifas aberrantes (visualização microscópica) em *Aspergillus sp.* Imhof et al (2003) desenvolveram uma nova metodologia para avaliação de suscetibilidade de *Aspergillus sp.* frente à caspofungina utilizando diluições do fármaco em ágar RPMI e avaliação macroscópica das colônias para determinação da CEM. Não se dispõe ainda de nenhuma experiência documentada sobre CEM de caspofungina em *S. schenckii*. A metodologia desenvolvida por Imhof et al (2003) sustenta possibilidades para futuras investigações sobre sua aplicabilidade na determinação da CEM de caspofungina em *S. schenckii*.

Até o momento não há estudos *in vivo* para avaliar a eficácia terapêutica de caspofungina na infecção experimental por *S. schenckii*.

6.1.6 Suscetibilidade de *S. schenckii* aos poliênicos: anfotericina B

Neste estudo, os ensaios de suscetibilidade de *S. schenckii* frente à anfotericina B evidenciaram sensibilidade para a maioria dos isolados. O intervalo de suscetibilidade variou entre 0,0312 µg/ml a 2 µg/ml com média geométrica de 0,301 µg/ml; a CIM₅₀ = 0,25 µg/ml e CIM₉₀ = 1 µg/ml.

Verificamos apenas 7,32% dos isolados com CIM = 2,0 µg/mL, enquanto Kohler et al (2006) encontraram 41% dos isolados nesta condição. Porém quando estes autores utilizaram inóculo na forma leveduriforme verificaram um percentual de apenas 5% dos isolados com CIM = 2,0 µg/mL. Espinel-Ingroff (1995) verificaram que 1,0 µg/mL era a CIM mais frequente nos ensaios de suscetibilidade com *S. schenckii*. Outros autores demonstraram um perfil de suscetibilidade com valores mais elevados de médias geométricas : 1,23 µg/mL (MCGINNIS et al, 2001), 1,73 µg/mL (TRILLES et al, 2005) e 3,1 µg/mL (MARIMON et al, 2007). Alvarado-Ramírez & Torres-Rodrigues (2007) comparando diferentes metodologias descreveram CIMs mais elevadas utilizando o protocolo M38-A (MG de 1,2 µg/mL) do que utilizando-se o *kit* comercial SYO (MG de 0,4 µg/mL). Alguns isolados clínicos de *S. schenckii* podem demonstrar resistência *in vitro* frequentemente associados à CIM > 2,0 µg/mL (ELLIS, 2002).

Recentemente, Marimon et al (2007) reavaliaram a espécie *S. schenckii* concluindo, com base em testes genotípicos e fenotípicos, que a mesma trata-se de um complexo; estes autores propõem que os agentes de esporotricose são: *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix albicans*. Estes autores sugerem que as suscetibilidades detectadas para *S. schenckii* frente à anfotericina B podem variar de acordo com as diferentes espécies que formam o “complexo *Sporothrix schenckii*”. Estas diferenças relacionadas às espécies podem também ser verificadas frente a todos os antifúngicos.

A anfotericina B, preferencialmente na forma lipídica, é o fármaco de eleição para terapia inicial das formas pulmonares, meníngeas e disseminadas de esporotricose (KAUFFMAN et al, 2007). Wroblewska et al (2005) verificaram resistência *in vitro* (CIM 8,0 µg/mL) após falha de tratamento empírico iniciado com anfotericina B. Baker et al (1989) também relataram detecção de resistência *in vitro* em isolado de *S. schenckii*, obtido por hemocultura, correlacionando-se com a falha terapêutica posteriormente verificada com anfotericina B. Este contexto de achados sensíveis e resistentes impõe a necessidade e a importância de estudos do perfil de suscetibilidade de *S. schenckii*.

6.2 Avaliação da antifungoterapia na esporotricose experimental em modelo murino

Os avanços conquistados pela micologia médica, no que tange aos conhecimentos agregados por esta ciência, são inegavelmente provenientes de estudos em modelos animais. Vários tipos de modelos têm sido utilizados, sendo mais comum o modelo murino, para estudos de patogênese, virulência, imunologia, diagnóstico e terapia. A realização de testes *in vitro* para avaliar atividade de fármacos antifúngicos permite definir concentrações efetivas em meios de cultura previamente definidos. Porém, pela limitação dos testes em simular os aspectos complexos envolvidos no estudo *in vivo* faz-se necessário determinar a eficácia destes fármacos utilizando-se modelos animais disponíveis para experimentação (CAPILLA et al, 2007).

Neste estudo, três terapias antifúngicas distintas foram avaliadas com base no controle de infecção mensurada através do cultivo das vísceras dos animais, ao final do tratamento. As características de cada isolado assim como as vias de inoculação são fatores críticos para o estabelecimento de uma infecção sistêmica por *S. schenckii* em camundongos (TACHIBANA et al, 1998). Kong et al (2006) observaram que isolados clínicos humanos de *S. schenckii* obtidos de formas linfocutâneas e inoculados via intraperitoneal em camundongos não são capazes de produzir infecção sistêmica fatal mesmo com inóculo contendo 3×10^6 UFC.

O metabolismo dos triazólicos em camundongos apresenta algumas particularidades relevantes quanto aos aspectos farmacocinéticos, não verificados no metabolismo humano e que foram considerados neste estudo. Tanto itraconazol (MACCALLUM & ODDS, 2002) como voriconazol (ROFFEY et al, 2003) promovem auto-indução de metabolismo por enzimas do citocromo P450, especialmente pela isoenzima CYP34A, presentes na mucosa intestinal de camundongos. Isto prejudica sobremaneira a biodisponibilidade oral do fármaco, principalmente do voriconazol, comprometendo desta forma a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos necessários para execução do experimento (SERENA et al, 2007). Muitos autores sugerem a administração do suco de toranja (*grapefruit juice*) concomitante ao tratamento com voriconazol no intuito de inibir a auto-indução do metabolismo (SUGAR & LIU, 2000; SUGAR & LIU, 2001; GRAYBILL et al, 2003). O suco de toranja, extraído de uma fruta híbrida (*Citrus x paradisi*), contém bioflavonóides (naringina) e furanocumarinas (6',7'-dihydroxibergamotina) que atuam inibindo a isoenzima CYP34A, logo contribuem para o aumento dos níveis séricos dos fármacos que normalmente são metabolizados por esta enzima. O fenômeno de auto-indução do metabolismo não é verificado na administração intravenosa ou intraperitoneal de voriconazol.

A partir do exposto utilizamos tratamento com itraconazol em alta dosagem (80 mg/kg) e voriconazol (10 mg/kg), por via intraperitoneal, com o objetivo de minimizar os efeitos na biodisponibilidade dos triazólicos utilizados neste experimento.

Kan & Bennett (1988) realizaram o único estudo que compara diferentes tipos de tratamentos antifúngicos (terbinafina, itraconazol e anfotericina B) em modelo murino de esporotricose sistêmica. Estes autores avaliaram a eficácia dos tratamentos com base no percentual de sobrevivência e resultados das culturas (cérebro, fígado e baço) ao final de 28 dias de tratamento .

Nossos resultados, obtidos pelo tratamento com itraconazol foram semelhantes aos obtidos por Kan & Bennett (1988). Estes autores detectaram 80% de culturas positivas em pelo menos um dos órgãos investigados e 90% de sobrevivência. Verificamos que o itraconazol não foi capaz de proteger adequadamente os animais da infecção sistêmica mesmo sendo administrado em altas doses; a positividade total dos órgãos investigados em cultivos fúngicos foi de 51,1% (Tabela 6). Na avaliação de

suscetibilidade *in vitro*, o isolado utilizado na inoculação dos animais apresentou CIM= 0,25 µg/ml frente ao itraconazol.

O presente estudo foi o primeiro a realizar uma avaliação *in vivo* da eficácia de tratamento do voriconazol em esporotricose sistêmica experimental. Ficou evidenciado que com doses diárias de 10 mg/kg via intraperitoneal o voriconazol não foi capaz de impedir o progresso da infecção sistêmica apresentando resultados inferiores ao itraconazol. A positividade total verificada nos órgãos submetidos à cultura foi de 53,3% (Tabela 7). A avaliação cultural das vísceras dos animais utilizados no experimento, não indicou haver diferenças significativas entre os grupos tratados com voriconazol e itraconazol conforme demonstrado na Tabela 10. Na avaliação de suscetibilidade *in vitro*, o isolado utilizado na inoculação dos animais apresentou CIM= 4,0 µg/ml frente ao voriconazol.

Na avaliação da anfotericina B, Kan & Bennett (1988) definiram um grupo recebendo 4,5 mg/kg e obtiveram 100% de sobrevivência e 40% de culturas positivas para pelo menos um dos órgãos investigados. Utilizamos o mesmo esquema terapêutico em 20 animais e foi verificado apenas 5,5% de culturas positivas (Tabela 8). Portanto, confirma-se a potente atividade antifúngica da anfotericina B e sua utilidade no tratamento das formas disseminadas de esporotricose. No presente estudo, a destacada atividade antifúngica da anfotericina B foi estatisticamente comprovada em relação aos dois outros tratamentos e aos controles (teste de Comparações Múltiplas e teste de Kruskal-Wallis, Tabela 10). Na avaliação da suscetibilidade *in vitro*, o isolado utilizado na inoculação dos animais apresentou CIM= 1,0 µg/ml frente à anfotericina B.

No presente estudo, os grupos foram divididos em machos e fêmeas, tanto nos animais tratados quanto nos não tratados, o que permitiu a observação de variações da extensão da infecção em relação aos sexos. As análises estatísticas definiram como significativas 5 das 12 associações estudadas entre cada sexo e as respostas à infecção nos grupos tratados e não tratados (Tabela 11). Notadamente, para os órgãos que pertencem ao sistema reticuloendotelial (pulmão e rim) foi encontrada associação significativa em duas das três análises estudadas (Tabela 11). Há escassos relatos na literatura de observação similar envolvendo estas variações em estudos experimentais com *S. schenckii*. Por outro lado, com base nos estudos epidemiológicos em felinos,

Schubach et al (2001) observaram que os felinos machos em idade reprodutiva e não castrados, eram mais propensos em adquirir esporotricose do que machos castrados e fêmeas. Tais achados sugerem que os andrógenos desempenham alguma função que, de forma ainda desconhecida, favorecem o desenvolvimento da esporotricose. Este binômio *S. schenckii* versus hormônios sexuais requer aprofundamento, pois, em outras micoses endêmicas esta relação já é bem conhecida (ARISTIZABAL et al, 1998).

Na paracoccidiodomicose é sabido que os homens são mais afetados que mulheres quando a doença se apresenta na forma sintomática. Alguns estudos *in vitro* suportam a hipótese de que os estrógenos possam inibir a transição dos conídios infectantes para formas leveduriformes, influenciando na patogênese da paracoccidiodomicose em humanos (SALAZAR et al, 1988). Aristizabal et al (1998) conduziram uma investigação *in vivo* com *Paracoccidioides brasiliensis* utilizando camundongos machos e fêmeas e foram capazes de verificar a resistência das fêmeas desafiadas por instilação nasal do inóculo. Estes autores sugerem que os estrógenos bloqueiam a transição e protegem as fêmeas da infecção pulmonar. Outros autores observaram que estrógenos podem incrementar a atividade de macrófagos sobre *Leishmania mexicana* (LEZAMA-DÁVILA, 2007). Por outro lado, Liu et al (2006) referem que a testosterona inibe fatores de regulação da resposta imune fagocítica aumentando o tempo de sobrevivência de *Leishmania donovani* no interior de macrófagos. A literatura registra também um caso de paracoccidiodomicose em uma mulher com hirsutismo idiopático onde os autores sugerem que fatores hormonais podem estar envolvidos na patogênese desta micose, notadamente a 5 alfa-dehidrotestosterona (5-DHT), frequentemente aumentada nos pacientes com hirsutismo (DOS SANTOS et al, 2004). Estas constatações sugerem que a influência de hormônios sexuais na patogênese da esporotricose merece atenção para investigações em estudos posteriores.

6.3 Considerações finais

Uma definição clara sobre quais concentrações inibitórias mínimas possam correlacionar suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* aos antifúngicos com a resposta clínica da infecção, ainda é uma lacuna a ser preenchida. Apesar do protocolo M38-A definir uma padronização para os ensaios *in vitro* com este fungo, não há consenso para estabelecer o significado dos conceitos relacionados com sensibilidade ou resistência dos isolados testados se não por comparação com leveduras, onde tais parâmetros já foram definidos. O registro de surtos epidêmicos entre felinos, o aumento dos casos de transmissão zoonótica da esporotricose, as variações de suscetibilidade entre isolados humanos e de animais e, a emergência de casos em pacientes imunossuprimidos, reforça a importância dos estudos da suscetibilidade de *S. schenckii*. Considerando as recentes proposições de novas espécies para o “complexo *S. schenckii*” e as variações importantes nas suscetibilidades entre elas, é incontestável a relevância em correlacionar-se os perfis de suscetibilidade observados *in vitro* com as respostas de terapia antifúngica.

O presente estudo, desenvolveu-se com o objetivo de contribuir para o esclarecimento de algumas questões pertinentes ao perfil de suscetibilidade de *S. schenckii*. Constatamos que, frente a alguns antifúngicos azólicos há relevantes variações na suscetibilidade. Na avaliação da eficácia dos tratamentos, os resultados aqui obtidos confirmam a potente atividade da anfotericina B para a esporotricose disseminada em modelo experimental, o que pode ser correlacionado com as observações clínicas. Por outro lado, ficou demonstrada a fraca atividade da antifungoterapia com triazólicos (itraconazol e voriconazol) no controle da infecção disseminada por *S. schenckii* em modelo experimental, possivelmente desaconselhando a utilização destes antifúngicos como terapia inicial em formas clínicas sistêmicas da esporotricose. As variações na extensão de disseminação da infecção experimental observada entre os sexos, sugerem que para avaliar a eficácia de tratamentos em modelo murino com esporotricose disseminada os delineamentos experimentais devem considerar como relevante a variável sexo dos animais.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- Nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente aos imidazólicos foram observadas CIM mais baixas para o cetoconazol em relação ao miconazol.
- Nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente ao itraconazol observou-se um perfil de sensibilidade para a maior parte dos isolados avaliados.
- Três isolados evidenciaram redução de suscetibilidade ao itraconazol, sugerindo resistência a este fármaco.
- Nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente ao fluconazol constatou-se um perfil de reduzida suscetibilidade para os isolados avaliados.
- Nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente ao voriconazol verificou-se um perfil de reduzida suscetibilidade para a maior parte dos isolados avaliados.
- Nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente à terbinafina evidenciou-se um perfil de elevada sensibilidade para os isolados avaliados.
- Nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente à caspofungina verificou-se CIMs elevadas para os isolados avaliados.
- Nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* frente à anfotericina B observou-se que a maioria dos isolados foi inibida com baixas CIMs.
- Nas comparações da eficácia de diferentes terapias antifúngicas em modelo experimental murino de esporotricose sistêmica evidenciou-se superior atividade do tratamento com anfotericina B em relação à antifungioterapia com itraconazol e voriconazol.
- A extensão da esporotricose sistêmica em modelo murino demonstrou diferenças significativas entre machos e fêmeas, onde verificou-se maior comprometimento das vísceras de machos do que de fêmeas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; GUERRA, R.O.; VIEIRA, B.J.; CUNHA, R.MC. Oral manifestation of sporotrichosis in AIDS patients. **Oral Diseases**, 7: 134-136, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **ANVISA** – Ministério da saúde - Brasil, 2002. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/cateme/parecer/20020514.htm>

Acesso em: 27 jan. 2008.

AIXIA, W.; YINGYUAN, Z.; LIXIAN, H.; ZHIXIANG, S.; WANQING, L.; MINGZHE, H.; RUOYU, L.; DERONG, L.; SHAOXI, W.; CORINNA, H.-A.; AXEL, G.; ALBERT, L.W. Clinical study on the efficacy and safety of intravenous itraconazole infusion for the treatment of invasive fungal infection in China. **Japan Journal of Infectious Diseases**, 59: 370-376, 2006.

ALVARADO-RAMÍREZ, E.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 51(7): 2420-2423, 2007.

ALVIANO, D.S.; FRANZEN, A.J.; TRAVASSOS, L.R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUES, M.L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infection and Immunity**, 72(1): 229- 237, 2004.

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infection and Immunity**, 66(11): 5587-5591, 1998.

BAKER, J.H.; GOODPASTURE, H.C.; KUHNS, H.R.; RINALDI, M.G. Fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Sporothrix schenckii*. successful treatment with itraconazole. **Archives of Pathology and Laboratorial Medicine**, 113(11): 1279-1281, 1989.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, T.M.P.; GALHARDO, M.C.G.; SCHUBACH, A.O.; MONTEIRO, P.C.F.; REIS, R.S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; LAZÉRA, M.S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T.C.M.; MARZOCHI, K.B.F.; WANKE, B.; VALLE, A.C.F.

Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96(6): 777-779, 2001.

BATES, D.W.; SU, L.; YU, D.T.; CHERTOW, G.M.; SEGER, D.L.; GOMES, D.R.; DASBACH, E.J.; PLATT, R. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. **Clinical Infectious Diseases**, 32(5): 686-693, 2001.

BENNETT, J.E. Fármacos Antimicrobianos: fármacos antifúngicos In: _____. **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10 ed., Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2003. cap. 43, p. 859-875.

BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, 5(2): 159-172, 2004.

BOLAO, F.; PODZAMCZER, D.; VENTIN, M.; GUDIOL, F. Efficacy of acute phase and maintenance therapy with itraconazole in an AIDS patient with sporotrichosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 13: 609-611, 1994.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P.E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. **Expert Reviews Anti-infective Therapy**, 2(1): 85-94, 2004.

BUTLER, M.J.; DAY, A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, 44: 115-136, 1998.

CALHOUN, D.L.; WASKIN, H.; WHITE, M.P.; BONNER, J.R.; MULHOLLAND, J.H.; RUMANS, L.W.; STEVENS, D.A.; GALGANI, J.N. Treatment of systemic sporotrichosis with ketoconazole. **Reviews of Infectious Diseases**, 13(1): 47-51, 1991.

CALLENS, S.F.J.; KITETELE, F.; LUKUN, P.; LELO, P.; VAN RIE, A.; BEHETS, F.; COLEBUNDERS, R. Pulmonary *Sporothrix schenckii* infection in a HIV positive child. **Journal of Tropical Pediatrics**, 16: 1-3, 2005.

CAMPBELL, I.T.; ZAITZ, C; SIDRIM, J.J.C. (Edit); ROCHA, M.F.G. (Edit) Esporotricose In: _____. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, 1ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 2004. cap. 17, p. 177-203.

CANCIDAS IV: pó para solução para infusão. Responsável Técnico Alexandre T. Caria – CRF-SP 14027 , MS – 1.0029.0033 . Campinas/SP : **Laboratórios Merck Sharp & Dohme Farmacêutica**, 2007. Bula de remédio.

CAPILLA, J; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Animal models: an important tool in mycology. **Medical Mycology**, 45(8): 657-684, 2007.

CARLOS, I.Z.; SGARBI, D.B.G; SANTOS, G.C.; PLACERES, M.C.P. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . **Scandinavian Journal of Immunology**, 57: 214-220, 2003.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; BRIÓ, S.; QUINDÓS, G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, 18: 2-5, 2001.

CARVALHO, M.T.M.; CASTRO, A.P.; BABY, C.; WERNER, B.; NETO, J.F.; QUEIROZ-TELLES, F. Esporotricose cutânea disseminada em paciente com AIDS: relato de um caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(6): 655-659, 2002.

CHAPMAN, S.W.; PAPPAS, P.; KAUFFMANN, C.; SMITH, E.B.; DIETZE, R.; TIRABOSCHI-FOSS, N.; RESTREPO, A.; BUSTAMANTE, A.B.; OPPER, C.; EMADY-AZAR, S.; BAKSHI, R. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day(-1)) in the treatment of cutaneous or lymphocutaneous sporotrichosis. **Mycoses**, 47(1-2): 62-68, 2004.

CHEN, S.C.A.; SORRELL, T.C. Antifungal agents. **The Medical Journal of Australia**, 187(7): 404-409, 2007.

COPETTI, M.V.; SANTÚRIO, J.M.; ARGENTA, J.S.; LEAL, A.B.M.; GONÇALVES, L.M.; ALVES, S.H. Esporotricose equina. **Acta Scientiae Veterinariae**, 30: 135-138, 2002.

CORBELLINI, V.A.; ANICET, K.L.; SCROFERNEKER, M.L. Imunologia dos fungos. In: _____. **Notas de imunologia**, 1ª ed., Porto Alegre, Ed. Universidade/UFRGS, 1996, cap. 21, p. 317-323.

COSKUN, B.; SARAL, Y.; AKPOLAT, N.; ATASEVEN, A.; ÇIÇEK, D. Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: case report and review of the literature. **Mycopathologia**, 158: 53-56, 2004.

CUADROS, R.G.; VIDOTTP, V.; BRUATTO, M. Sporotrichosis in the metropolitan area of Cusco, Peru, and in its region. **Mycoses**, 33(5): 231-240, 1990.

DEF - **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**, 34ª Edição, Editora de Publicações Científicas, 2007/2008.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49(Suppl. 1): 37-41, 2002.

DIXON, D.M.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp.* from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 30(4): 951-954, 1992.

DIXON, D.M.; MCNEIL, M.M.; COHEN, M.L.; GELLIN, B.G.; LA MONTAGNE, J.R. Fungal infections: a growing threat. **Public Health Reports**, 111: 226-235, 1996.

DONABEDIAN, H.; O'DONNELL, E.; OLSZEWSKI, C.; MACARTHUR, R.D.; BUDD, N. Disseminated cutaneous and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, 18: 111-115, 1994.

DOS SANTOS, R.P.; MAIA, A.L.; GOLDANI, L.Z. Paracoccidioidomycosis in a woman with idiopathic hirsutism. **Mycopathologia**, 158(1): 57- 59, 2004.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49(Suppl.1): 31-36, 2002.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49(Suppl. 1): 7-10, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A.; DAWSON, K.; PFALLER, M.; ANAISSE, E.; BRESLIN, B.; DIXON, D.; FOTHERGILL, A.; PAETZNICK, V.; PETER, J.; RINALDI, M.; WALSH, T. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39(2): 314-319, 1995.

ESPINEL-INGROFF, A. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(1): 198-202, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(10): 2950-2956, 1998.

FERNANDES, K.S.S.; MATHEWS, H.L., LOPES-BEZERRA, L.M. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. **Journal of Medical Microbiology**, 48 (2): 195-203, 1999.

FERNANDES, K.S.S.; COELHO, A.L.J.; LOPES-BEZERRA, L.M.; BARJA-FIDALGO, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. **Immunology**, 101: 563-569, 2000.

FISCHER, J.F.; DUMA, R.J.; MARKOWITZ, S.M.; SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CHEW, W.H. Therapeutic failures with miconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 13(6): 965-968, 1978.

FITZPATRICK, J.E.; EUBANKS, S. Acquired immunodeficiency syndrome presenting as disseminated cutaneous sporotrichosis. **Cutis**, 27(6): 406-407, 1988.

FLEURY, R.N.; TABORDA, P.R.; GRUPTA, A.K.; FUJITA, M.S.; ROSA, P.S.; WECKWERTH, A.C.; NEGRÃO, M.S.; BASTAZINI, I. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. **International Journal Dermatology**, 40: 318-322, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA** – Department of Health and Human Services - United States, 2001. Disponível em:
http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2001/21227_cancidas_approv.pdf
Acesso em: 27 jan. 2008.

GEZUELE, E.; DA ROSA, D. Relevancia del cuerpo asteroide esporotricósico en el diagnóstico rápido de la esporotricosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, 22: 147-150, 2005.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4): 501-517, 1999.

GOLDANI, L.Z.; AQUINO, V.R.; DARGEL, A.A. Disseminated cutaneous sporotrichosis in an AIDS patient receiving maintenance therapy with fluconazole for previous cryptococcal meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, 28: 1337-1338, 1999.

GONZÁLEZ, G.M.; FOTHERGILL, A.W.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G.; LOEBENBERG, D. *In vitro* activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. **Medical Mycology**, 43(3): 281-284, 2005.

GORI, S.; LUPETTI, A.; MOSCATO, G.; PARENTI, M.; LOFARO, A. Pulmonary sporotrichosis with hyphae in a human immunodeficiency virus-infected. **Acta Cytologica**, 41: 519-521, 1997.

GRAYBILL, J.R.; NAJVAR, L.K.; GONZALEZ, G.M.; HERNANDEZ, S.; BOCANEGRA, R. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 51: 1373-1376, 2003.

GUBBINS, P.O.; ANAISSIE, E. Overview of antifungal agents. **Infectious Disease Special Edition**, 5: 65-70, 2002.

HARDMAN, S.; STEPHENSON, I.; JENKINS, D.R.; WISELKA, M.J.; JOHNSON, E.M. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. **Journal of Infection**, 51: 73-77, 2005.

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, 9(4): 469-488, 1996.

HOWARD, D.H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. **Journal of Bacteriology**, 81: 464-469, 1961.

IMHOF, A.; BALAJEE, S.A.; MARR, K.A. New Methods to Assess Susceptibilities of *Aspergillus* Isolates to Caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(12): 5683-5688, 2003.

JESSUP, C.J.; RYDER, N.S.; GHANNOUM, M.A. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. **Medical Mycology**, 38(2): 155-159, 2000.

KAN, V.L.; BENNETT, J.E. Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 32(11): 1619-1623, 1988.

KAUFFMAN, C.A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S.W.; PAPPAS, P.G. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, 45: 1255-1265, 2007.

KOHLER, L.M.; MONTEIRO, P.C.F.; HAHN, R.C.; HAMDAN, J.S. *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. **Journal of Clinical Microbiology**, 42 (9): 4319-4320, 2004.

KOHLER, L.M.; SOARES, B.M.; SANTOS, D.A.; BARROS, M.E.S.; HAMDAN, J.S. *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms. **Canadian Journal of Microbiology**, 52 (9): 843-847, 2006.

KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J; WANG, Y.; CHEN, H.-D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, 12(11): 1077-1081, 2006.

KUROSAWA, A.; POLLOCK, S.C.; COLLINS, M.P.; KRAFF, C.R.; TSO, M.O.M. *Sporothrix schenckii* endophthalmitis in a patient with human immunodeficiency virus infection. **Archives Ophthalmology**, 106: 376-380, 1988.

KWON-CHUNG, K-J. & BENNETT, J.E. Subcutaneous and Deep Mycoses - Sporotrichosis. In: **Medical Mycology**, Malvern: Lee & Febiger, 1992. Cap. 26, p. 707-729.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Identificação dos fungos. In: _____. **Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 1ª ed., São Paulo, Sarvier/Fapesp, 1998. Cap. 19, p. 349-353.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, 38: 143-158, 2003.

LEZAMA-DÁVILA, C.M.; ISAAC-MÁRQUEZ, A.P.; BARBI, J.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A.R. 17-beta-estradiol increases *Leishmania mexicana* killing in macrophages from DBA/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 76(6): 1125-1127, 2007.

LIMA, R.F.; SCHÄFFER, G.V.; BORBA, C.M. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. **Microbes Infection**, 5(11): 933-938, 2003.

LIPSTEIN-KRESCH, E.; ISENBERG, H.D.; SINGER, C.; COOKE, O.; GREENWALD, R.A. Disseminated *Sporothrix schenckii* infection with arthritis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of Rheumatology**, 12: 805-808, 1985.

LIU, L.; WANG, L.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; WANG, Z.; QIAO, Z. Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during *Leishmania donovani* infection of macrophages. **Parasitology Research**, 99(2): 189-93, 2006.

LIU, W.; LIONAKIS, M.S.; LEWIS, R.E.; WIEDERHOLD, N.; MAY, G.S.; KONTOYIANNIS, D.P. Attenuation of itraconazole fungicidal activity following preexposure of *Aspergillus fumigatus* to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47(11): 3592-3597, 2003.

LONDERO, A.T.; CASTRO, R.M.; FISCHMAN, O. Two cases of sporotrichosis in dog in Brazil. **Sabouraudia**, 3: 273-274, 1964.

LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R.; BRUM, L.M.; WESTPHALEN, J.B.; ALTERNMANN, M.J.; PRATES, F.B. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32(5): 541-545, 1999.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 78(2): 293-308, 2006.

LÓPEZ, Y.M.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; CABELLO, T.J. Estudio de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de mohos y levaduras a itraconazol y voriconazol.

Revista Iberoamericana de Micología, 22: 105-109, 2005.

LOSMAN, J.A.; CAVANAUGH, K. Cases from the Osler Medical Service at Johns Hopkins University. Diagnosis: *P. carinii* pneumonia and primary pulmonary sporotrichosis. **American Journal of Medicine**, 117(5): 353-356, 2004.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos (Contribuição para o conhecimento das assim chamadas sporotricoses). **Revista de medicina**, 10: 443-450, 1907.

MACCALLUM, D.M.; ODDS, F.C. Influence of grapefruit juice on itraconazole plasma levels in mice and guinea pigs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, (50): 219-224, 2002.

MAIA, D.C.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M.C.; CARLOS, I.Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, 161(1): 11-19, 2006.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; LÁZERA, M.S.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, 44(9): 3251-3256, 2006.

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

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of 5 species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** (in press), 2007.

MARQUES, S.A.; FRANCO, S.R.V.S.; CAMARGO, R.M.P.; DIAS, L.D.F.; HADDAD-JÚNIOR, V.; FABRIS, V.E. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 35(4): 327-330, 1993.

MARTINEZ, L.R.; NTIAMOAH, P.; GÁCSEA, A.; CASADEWALL, A.; NOSANCHUK, J. Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 51(12): 4396-4400, 2007.

MCGINNIS, M.R., NORDOFF, N.; PASARELL, L.; WARNOCK, D.W. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. **Medical Mycology**, 39(4): 369-371, 2001.

MEINERZ, A.R.M; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.D.; CLEFF, M.B.; SANTIN, R; BRUM, C.S.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Suscetibilidade *In vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40 (1): 60-62, 2007.

MORGAN, M.; REVES, R. Invasive sinusitis due to *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, 23: 1319-1320, 1996.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B.L.; AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEWALL, A.; HAMILTON, A. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 71(7): 4026-4033, 2003.

MÜLLER, F.M.C.; STAUDIGEL, A.; SALVENMOSER, S.; TREDUP, A.; MILTENBERGER, R.; HERRMANN, J.V. Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx of human immunodeficiency virus patients and from environmental Bavarian vine grapes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 51(8): 3014-3016, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of moulds; Approved Standard: document M38-A. Wayne, P.A: **NCCLS**, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard: document M27-A2. Wayne, P.A: **NCCLS**, 2002.

NEELY, M.N.; GHANNOUM, M.A. The exciting future of antifungal therapy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 19: 887-914, 2000.

NETO, R.J.P.; MACHADO, A.A.; CASTRO, G.; QUAGLIO, A.S.S.; MARTINEZ, R. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome de imunodeficiência adquirida – relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32(1) : 57-61, 1999.

NEYRA, E.; FONTEYNE, P-A.; SWINNE, D.; FAUCHE, F.; BUSTAMANTE, B.; NOLARD, N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(3): 1348-1352, 2005.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; CAETANO, D.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Recurrencia de esporotricosis en gatos con implicaciones zoonóticas. **Revista Iberoamericana de Micología**, 18: 137-140, 2001.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; CAETANO, D.T.; FAÉ, F.; CORDEIRO, J.M.C.; MEIRELES, R.M.; APPELT, C.E.; FERREIRO, L. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 9(1): 36-41, 2002.

NOSANCHUK, J.D.; CASADEWALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50(11): 3519-3528, 2006.

ODDS, F.C.; MOTYL, M.; ANDRADE, R.; BILLE, J.; CANTÓN, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DAVIDSON, A.; DURUSSEL, C.; ELLIS, D.; FORAKER, E.; FOTHREGILL, A.W.; GHANNOUM, M.A.; GIACOBÉ, R.A.; GOBERNADO, M.; HANDKE, R.; LAVERDIÈRE, M.; LEE-YANG, W.; MERZ, W.G.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PEMÁN, J.; PEREA, S.; PERFECT, J.R.; PFALLER, M.A.; PROIA, L.; REX, J.H.; RINALDI, M.G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; SCHELL, W.A.; SHIELDS, C.; SUTTON, D.A.; VERWEIJ, P.E.; WARNOCK, D.W. Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(8): 3475-3482, 2004.

PADILLA, M.C.; LA ROCHE, E.O. Cuerpos asteroides en el examen directo de un paciente con esporotricosis linfangítica. **Revista del Centro Dermatológico Pascua**, 8(2): 105-108, 2000.

PAPPAS, P.; TELLEZ, I.; DEEP, A.; NOLASCO, D.; HOLGADO, H.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hiperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, 30: 65-70, 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Fármacos antifúngicos. In: _____ **Farmacología**, 5ª ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2004. Cap. 47, p. 758-763.

READ, S.I.; SPERLING, L.C. Feline sporotrichosis transmission to man. **Archives of Dermatology**, 188: 429-431, 1982.

REED, K.D.; MOORE, F. M.; GEIGER, G.E.; STEMPER, M.E. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, 16: 384-387, 1993.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; WALSH, T.J.; CHATURVEDI, V.; ESQINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M.A.; GOSEY, L.L.; ODDS, F.C.; RINALDI, M.G.; SHEEHAN, D.J.; WARNOCK, D.W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(4): 643-658, 2001.

ROCHA, M.M.; DASSIN, T.; LIRA, R.; LIMA, E.L.; SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Esporotricosis en un paciente con SIDA: descripción de un caso y revisión. **Revista Iberoamericana de Micología**, 18: 133-136, 2001.

ROFFEY, S.J.; COLE, S.; COMBY, P.; GIBSON, D.; JEZEQUEL, S.G.; NEDDERMAN, A.N.R.; SMITH, D.A.; WALKER, D.K.; WOOD, N. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. **Drug Metabolism and Disposition**, 31(6): 731-741, 2003.

ROMERO-MARTÍNEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-RODRÍGUEZ, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, 68(6): 3696-3703, 2000.

ROSA, A.C.M.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R.L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of American Academy of Dermatology**, 52(3): 451-459, 2005.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P.A.; MENDRICK, C.A.; NORRIS, C.C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T.A.; MCNICHOLAS, P.M. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50(6): 2009-2015, 2006.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, 56: 711-713, 1988.

SCHENCK, B.R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. **Bulletin of Johns Hopkins Hospital**, 9: 286-290, 1898.

SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; BARROS, M.B.L.; WANKE, B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 11(12): 1952-1954, 2005.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O. Esporotricose em gatos e cães – revisão. **Clínica Veterinária**, 5: 21-24, 2000.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O.; REIS, R.S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T.C.M.; MONTEIRO, D.F.; BARROS, M.B.L.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; MONTEIRO, P.C.F.; WANKE. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, 153: 83-86, 2001.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O.; CUZZI-MAYA, T.; OKAMOTO, T.; REIS, R.S.; MONTEIRO, P.C.M.; GALHARDO, M.C.G.; WANKE, B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Record**, 152: 172-175, 2003.

SERENA, C.; PASTOR, F.J.; MARINÉ, M.; MAR RODRÍGUEZ, M.; GUARRO, J. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, (60): 162-165, 2007.

SERRA-BALDRICH, E. Esporotricose cutânea. **Actualidad Dermatológica**, 1: 239-244, 1994.

SILVA-VERGARA, M.L.; MANEIRA, F.R.Z.; OLIVEIRA, R.M.; SANTOS, C.T.B.; ETCHEBEHERE, M.; ADAD, S.J. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. **Medical Mycology**, 43: 187-190, 2005.

SOLTYS, M.A.; SUMNER-SMITH, G. Systemic mycoses in dogs and cats. **Canadian Veterinary Journal**, 12(10): 191-199, 1971.

STERLING, J.B. & HEYMANN, W.R. Potassium iodide in dermatology: a 19th century drug for the 21st century – Uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. **Journal American Academy Dermatology**, 4 (43): 691-697, 2000.

SUGAR, A.M.; LIU, X.P. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. **Medical Mycology**, (38): 209-212, 2000.

SUGAR, A.M.; LIU, X.P. Efficacy of voriconazole in treatment of murine pulmonary blastomycosis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, (45): 601-604, 2001.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C.; COLEMAN, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, 4: 369-376, 2004.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. **Medical Mycology**, 36(1): 21-27, 1998.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Involvement of CD4⁺ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii*. **Medical Mycology**, 37 (6): 397-404, 1999.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Medical Mycology**, 39 (3): 295-298, 2001.

TERRELL, C.L. Antifungal agents. Part II. The azoles. **Mayo Clinical Procedures**, 74: 78-100, 1999.

TOLEDO, M.S.; LEVERY, S.B.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K. Dimorphic expression of cerebrosides in the mycopathogen *Sporothrix schenckii*. **Journal of Lipid Research**, 41: 797-806, 2000.

TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; PALÁCIO-HERNANZ, A.; NEGRONI-BRIZ, R.; PEREIRO-MIGUENS, M. Esporotricosis In: _____ **Micología Médica**, Barcelona, Marron S.A., 1993. Cap. 16, p. 157-166.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; SHUBACH, A.O.; PAES, R.A.; INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49 (9): 3952-3954, 2005.

TSUBOI, R.; SANADA, T.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. **Journal of Bacteriology** 169(9): 4104-4109, 1987.

UENOTSUCHI, T.; TAKEUCHI, S.; MATSUDA, T.; URABE, K.; KOGA, T.; UCHI, H.; NAKAHARA, T.; FUKAGAWA, S.; KAWASAKI, M.; KAJIWARA, H.; YOSHIDA, S.; MOROI, Y.; FURUE, M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. **International Immunology**, 18(12): 1637-1646, 2006.

URABE, H. Sporotrichosis. **Japan Journal of Medical Mycology**, 11: 1-6, 1970.

VFEND IV: pó para solução para infusão. Responsável Técnico José Francisco Bomfim – CRF-SP 7009 , MS – 1.0216.0090 . Guarulhos/SP : **Laboratórios Pfizer Ltda.**, 2007. Bula de remédio.

WARE, A.J.; COCKERELL, C.J.; SKIEST, D.J.; KUSSMAN, H.M. Disseminated sporotrichosis with extensive cutaneous involvement in a patient with AIDS. **Journal of American Academy of Dermatology**, 40: 350-355, 1999.

WATANABE, S.; KAWASAKI, M.; MOCHIZUKI, T.; ISHIZAKI, H. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. **Japan Journal of Medical Mycology**, 45: 165-175, 2004.

WENKER, C.J.; KAUFFMAN, L; BACCIARIN, C.N.; ROBERT, N. Sporotrichosis in a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Journal of Zoo and Wild Life Medicine**, 29(4): 474-478, 1998.

WHITTEMORE, J.C.; WEBB, C.B. Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, 48: 411-414, 2007.

WROBLEWSKA, M.; SWOBODA-KOPEC, E.; KAWECKI, D.; SAWICKA-GRZELAK, A.; STELMACH, E.; LUCZAK, M. Infection by a dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* in an immunocompromised patient. **Infection**, 33(4): 289-291, 2005.

YOSHIIKE, T.; LEI, P.C.; KOMATSUZAKI, H.; OGAWA, H. Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* in *S. schenckii* inoculated hairless mice. **Mycopathologia**, 123(2): 69-73, 1993.