

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

**COMPLEXO *Sporothrix schenckii*: INATIVAÇÃO
FOTODINÂMICA, INFLUÊNCIA DA MELANINA NA
ATIVIDADE DOS ANTIFÚNGICOS E COMBINAÇÃO
DE FÁRMACOS**

TESE DE DOUTORADO

Débora Alves Nunes Mario

Santa Maria, RS, Brasil, 2015

**COMPLEXO *Sporothrix schenckii*: INATIVAÇÃO
FOTODINÂMICA, INFLUÊNCIA DA MELANINA NA
ATIVIDADE DOS ANTIFÚNGICOS E COMBINAÇÃO DE
FÁRMACOS**

Débora Alves Nunes Mario

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

Orientador: Prof. Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**COMPLEXO *Sporothrix schenckii*: INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA,
INFLUÊNCIA DA MELANINA NA ATIVIDADE DOS ANTIFÚNGICOS
E COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS**

elaborada por
Débora Alves Nunes Mario

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Dr^a Daniela Brayer Pereira (UFPEl)

Dr. Janio Morais Santurio (UFSM)

Dr. Régis Zanette (UFRGS)

Dr. Alexandre Vargas Schwarzbald (UFSM)

Santa Maria, 12 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Ao meu namorado, Ricardo, cujo apoio e incentivo para este trabalho foram incalculáveis.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Sydney, pela acolhida desde 2006 quando me aceitou como sua aluna de iniciação científica, pela paciência e confiança em meu trabalho. Agradeço pela amizade e carinho demonstrados, pelos ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidas, e pela paixão pela pesquisa e pela docência que me despertou. Muito Obrigada.

Aos meus pais, Marta e Arnaldo, Luis Eduardo e Márcia, pelo amor, carinho, paciência e compreensão diante de tantas horas de ausência, e por simplesmente estarem ao meu lado nas escolhas mais importantes da minha vida. Serei eternamente grata a vocês.

Aos meus irmãos, João Pedro, Ighor e Melinna, pela amizade e incentivo nesta caminhada, pelos exemplos de amor e pela presença contínua em minha vida.

Ao meu namorado, Ricardo, por todo seu amor, apoio e respeito por minha dedicação a este trabalho. Agradeço por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis, por acreditar na minha capacidade, e por me incentivar a continuar sempre.

Às minhas queridas amigas, Laura, Laíssa e Thaís, pelo companheirismo, amizade e carinho constantes, pelos momentos difíceis que me ajudaram a sustentar e pelos ótimos momentos que pudemos compartilhar. Muito obrigada!

Aos amigos e colegas, Larissa e Luiz Ricardo, pela amizade e parceria na realização deste trabalho.

A todos os colegas de LAPEMI, pelos momentos de apoio, amizade e descontração. Fernanda Marks, Francielli Kunz, Marcela, Érico, Juliana, Régis, Maiara, Carine e Karine, obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar sem medir esforços.

Ao Professor Janio, pela acolhida, pela amizade e ensinamentos, os quais foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Grupo da Universitat Rovira i Virgili na Espanha, especialmente Dr. Guarro, D. Capilla, Dr. Stchigel, Dr^a Gené, Dr. Mayayo, Marta, Adela, Katy e Loida pelo acolhimento, ensinamentos, pela dedicação e amizade que a mim ofereceram.

À Sandra, pela amizade, incentivo e grande ajuda em nosso dia-a-dia laboratorial.

À Professora Margareth L. Athaíde, em nome de todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e carinho prestados e por todo o conhecimento que me foi transmitido.

À FAPERGS, pelo apoio financeiro fornecido através de bolsa de estudos, e ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

Complexo *Sporothrix schenckii*: Inativação Fotodinâmica, Influência da Melanina na Atividade dos Antifúngicos e Combinação de Fármacos

Autora: Débora Alves Nunes Mario

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de fevereiro de 2015.

A esporotricose é uma micose subcutânea que afeta homens e animais, e é causada por fungos dimórficos melanizados pertencentes ao gênero *Sporothrix*. Pode ser principalmente adquirida por implantação traumática do fungo na derme através da arranhadura de animais domésticos ou manipulação de plantas contaminadas. O presente estudo investigou: a) a suscetibilidade *in vitro* de espécies do Complexo *Sporothrix schenckii* à inativação fotodinâmica; b) a combinação de anfotericina B e posaconazol em modelo murino de infecção sistêmica por *S. brasiliensis* e *S. schenckii* stricto sensu, buscando melhorar o tratamento da esporotricose disseminada; c) a interferência da melanina fúngica na suscetibilidade *in vitro* de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* stricto sensu à anfotericina B e itraconazol. No estudo da terapia fotodinâmica foi aplicado azul de metileno como fotossensibilizador e emissão de luz diodo (InGaAlP) frente espécies do complexo *Sporothrix schenckii* em ensaio *in vitro*. A viabilidade dos conídios foi determinada através de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). A atividade da anfotericina B e posaconazol sozinhos ou combinados foi avaliada segundo a técnica de microdiluição em caldo e técnica de checkerboard. No estudo *in vivo*, camundongos OF-1 foram infectados com um inóculo de 2×10^7 UFC/animal. Foram utilizadas duas cepas de *S. brasiliensis* e duas cepas de *S. schenckii*. Os animais receberam doses de 0.3 mg/kg de anfotericina B em combinação com 2.5 mg/kg e 5 mg/kg de posaconazol. Os resultados foram comparados com as respectivas monoterapias e a eficácia foi avaliada através do prolongamento da sobrevivência e redução da carga fúngica no fígado e baço. No estudo da interferência da melanina na suscetibilidade de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* stricto sensu à anfotericina B e itraconazol, células leveduriformes foram cultivadas em meio mínimo com e sem L-DOPA. Métodos de microdiluição e tempo de morte foram utilizados para determinar a atividade dos antifúngicos frente às células com diferentes quantidades de melanina. A luz laser (InGaAlP) em conjunto com o azul de metileno foram capazes de reduzir significativamente o crescimento de todas as cepas de *Sporothrix* testadas. Os dados *in vitro* demonstraram um efeito sinérgico da combinação de posaconazol e anfotericina B, e, apesar de o posaconazol 5 mg/kg sozinho apresentar eficácia contra a esporotricose, teve sua eficiência aumentada quando combinado com anfotericina B 0,3 mg/kg. A técnica de tempo de morte mostrou que a melanização protegeu os isolados do complexo *Sporothrix schenckii* da anfotericina B, particularmente na concentração mais baixa testada. Desta forma, as conclusões do presente estudo são: a) a inibição fotodinâmica *in vitro* de isolados de *Sporothrix* merece estudos experimentais e clínicos, uma vez que pode ser um tratamento promissor para a esporotricose cutânea e subcutânea; b) o posaconazol em combinação com dose baixa de anfotericina B pode ser uma opção para o tratamento de esporotricose disseminada, especialmente quando itraconazol e anfotericina B são contraindicados; c) estudos de combinação de anfotericina B com inibidores de melanina são necessários a fim de evitar o efeito protetor da melanina contra as defesas do organismo e contra antifúngicos.

Palavras-chave: Complexo *Sporothrix schenckii*, terapia fotodinâmica, combinação de antifúngicos, melanina.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

***Sporothrix schenckii* complex: Photodynamic Inactivation, Influency of Melanin in Antifungal Activity and Drug Combination**

Author: Débora Alves Nunes Mario

Adviser: Sydney Hartz Alves

Place and Date: Santa Maria, February 12nd, 2015.

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis that affects humans and animals, and it is caused by dimorphic melanized fungi belonging to the genus *Sporothrix*. Sporotrichosis is mainly acquired by traumatic implantation of the fungus into the dermis through scratches inflicted by domestic animals or by handling plants. This study approaches: a) the *in vitro* susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex species to photodynamic inactivation using methylene blue as a photosensitizer and laser as the light source; b) the combination of amphotericin B plus posaconazole in a murine model of systemic infection by *S. brasiliensis* and *S. schenckii* sensu stricto, seeking to enhance the treatment of disseminated sporotrichosis; c) the interference of fungal melanin in the *in vitro* susceptibility of *S. brasiliensis* and *S. schenckii* sensu stricto to amphotericin B and itraconazole. In the photodynamic therapy study we have applied methylene blue as a photosensitizing agent and Light emitting diode (InGaAlP) against *Sporothrix schenckii* complex species in an *in vitro* assay. The viability of the conidia was determined through the counting of colony forming units. The activity of amphotericin B and posaconazole alone or in combination was evaluated by using a microdilution checkerboard method. For the *in vivo* study, OF-1 mice were intravenously (i.v.) infected with a lethal inoculum of 2×10^7 CFU/animal. Two strains of *S. brasiliensis* and two of *S. schenckii* were tested. Animals received amphotericin i.v. at suboptimal dose i.e., 0.3 mg/kg, in combination with oral posaconazole at 2.5 mg/kg, 5 mg/kg or 10 mg/kg BID. Results were compared with their respective monotherapies and efficacy was evaluated by prolongation of survival and reduction of tissue burden in spleen and liver. In the study of the interference of melanin in the susceptibility of *S. brasiliensis* and *S. schenckii* sensu stricto, yeast cells were cultivated in minimal medium with or without L-DOPA in order to induce the production of melanin. Microdilution and time-kill methods were used to determine the antifungal activity against yeast cells with different amounts of melanin. The laser light (InGaAlP) together with a methylene blue photosensitizer were able to significantly reduce the growth of all the tested *Sporothrix* strains. *In vitro* data demonstrated a synergistic effect of the combination and although posaconazole alone was effective against sporotrichosis, efficacy was increased when combined with amphotericin B. The maximum efficacy of the combinations was obtained with posaconazole 5 mg/kg. The killing assay showed that melanization protected isolates within the *Sporothrix schenckii* complex from amphotericin B, particularly in the lower concentrations tested. The conclusions of the present study are: a) the *in vitro* inhibition of *Sporothrix* spp. isolates by laser light deserves *in vivo* experimental and clinical studies since it may be a promising treatment for cutaneous and subcutaneous sporotrichosis; b) posaconazole in combination with suboptimal doses of amphotericin B could be an option in the treatment of disseminated sporotrichosis especially when itraconazole amphotericin B at optimal doses are contraindicated; c) combination studies of amphotericin B with inhibitors of melanin are required in order to avoid this effect.

Keywords: *Sporothrix schenckii* complex, photodynamic therapy, antifungal combination, melanin.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMB- Anfotericina B
CIM- Concentração Inibitória Mínima
DCFH₂-DA- diclorodihidrofluoresceína-diacetato
EO- Estresse Oxidativo
ERO- Espécies Reativas de Oxigênio
ERN- Espécies Reativas de Nitrogênio
GPx- Glutathione Peroxidase
GR- Glutathione Redutase
GSH- Glutathione
GSSG- Glutathione Oxidada
InGaAlP- Índio Gálio Alumínio Fósforo
ITZ- Itraconazol
MDA- Malondialdeído
MTT- 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico brometo
NADPH- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
ON- Óxido Nítrico
-SH- Grupo tiol
TBA- Ácido Tiobarbitúrico
TBARS- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TFD- Terapia Fotodinâmica
TRB- Terbinafina
UFC- Unidade Formadora de Colônia
VCZ- Voriconazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Epecíficos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Histórico e etiologia	13
3.2. Epidemiologia.....	14
3.3. Manifestações clínicas.....	15
3.4. Fatores de virulência.....	16
3.5. Resposta imunológica do hospedeiro.....	18
3.6. As novas espécies do gênero <i>Sporothrix</i>	20
3.7. Suscetibilidade aos agentes antifúngicos.....	21
3.8. Combinações terapêuticas	22
3.9. Terapia fotodinâmica.....	25
4. ARTIGOS.....	28
4.1. Artigo 1.....	29
4.2. Artigo 2.....	40
4.3. Artigo 3.....	52
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos dimórficos do gênero *Sporothrix* que acomete o homem e uma grande variedade de animais como cães, gatos, bovinos e equinos (NOBRE *et al.*, 2002). Solo rico em matéria orgânica e em vegetação, casca de árvores e ambientes quentes e úmidos são o habitat deste fungo na forma saprófita (FINDLAY & VISMER, 1986).

A esporotricose é adquirida através do implante traumático do fungo do gênero *Sporothrix* na derme, provocado pelo manuseio de plantas, terra, animais e também pela contaminação de feridas (LOPES *et al.*, 1999; HADDAD *et al.*, 2002). Nas últimas décadas o felino doméstico vem ganhando evidência na transmissão da esporotricose através da arranhadura e mordedura (SCHUBACH & SCHUBACH, 2000). O desenvolvimento de lesões no local de inoculação do fungo está relacionado com o sistema imunológico do hospedeiro, quantidade e virulência do agente inoculado (DONADEL *et al.*, 1993). Clinicamente, esta infecção pode ser classificada em cutânea (fixa, linfocutânea e disseminada) e extracutânea (articular, óssea, ocular, pulmonar e sistêmica) (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; SCHUBACH & SCHUBACH, 2000).

Até pouco tempo pensava-se haver somente uma espécie representante do gênero *Sporothrix*: *Sporothrix schenckii*. No entanto, estudos moleculares recentes demonstraram que o gênero *Sporothrix* engloba pelo menos seis espécies distintas (MARIMON *et al.*, 2006). A partir daí, novas investigações vêm sendo realizadas com o propósito de identificar diferenças fenotípicas entre as espécies e suas repercussões no desenvolvimento da doença.

No Brasil, a esporotricose em animais era considerada rara, com poucos casos descritos até o ano de 1997 (LARSSON *et al.*, 1989; MARQUES *et al.*, 1993). Posteriormente, o número de casos desta micose aumentou, tanto em felinos domésticos quanto em humanos, o que alertou para a importância da esporotricose em saúde pública (FLEURY *et al.*, 2001; NOBRE *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2004). Em vista desta realidade, pesquisas relacionadas a fatores de virulência do fungo têm sido desenvolvidas, com o intuito de compreender a patogenia e a resposta do hospedeiro frente a esta infecção fúngica. Neste contexto, a presença de melanina na célula fúngica representa um dos principais fatores de virulência do gênero *Sporothrix* (LANGFELDER *et al.*, 2003; NOBRE *et al.*, 2004).

A presença da melanina no Complexo *Sporothrix schenckii* evidencia variações que podem ser detectadas mesmo a olho nu; este pigmento pode interferir na suscetibilidade aos

antifúngicos (atividade fungistática e fungicida), o que poderá comprometer os tratamentos; por outro lado interfere também no incremento da virulência, repercutindo no estresse oxidativo causados nesta micose.

As diversas espécies do Complexo *Sporothrix schenckii* mostram também diferentes respostas aos agentes antifúngicos convencionais (TRILLES *et al.*, 2005), o que explica as disparidades encontradas na suscetibilidade antes da diferenciação das espécies. Além disso, *S. albicans*, *S. globosa* e *S. mexicana* já demonstraram marcante perfil de resistência ao itraconazol, exibindo também resistência cruzada aos demais azólicos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Nos casos de esporotricose disseminada, o tratamento é realizado com anfotericina B e manutenção terapêutica com itraconazol (KAUFFMAN *et al.*, 2007; BUNCE *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2012). Entretanto, há pacientes que não respondem ou se tornam intolerantes à anfotericina B (CHAMILOS & KONTOYIANNIS, 2006). O posaconazol parece ser uma boa alternativa terapêutica para casos de esporotricose, apresenta aparente eficácia *in vivo* e nenhuma toxicidade (BUNCE *et al.*, 2012; FERNADEZ-SILVA *et al.*, 2012), entretanto não melhor que monoterapia com anfotericina B. Estudos *in vivo* de combinações de antifúngicos ainda não foram conduzidos para esporotricose disseminada, no mesmo momento que a busca por alternativas terapêuticas torna-se relevante.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada para o tratamento de diversos tipos de tumores (HUANG, 2005). Apesar desta técnica ter maior utilização no tratamento de neoplasias, a TFD tem mostrado potencial para o tratamento de infecções microbianas. Vários estudos têm demonstrado a eficiência desta terapia para a inativação de bactérias, sobretudo porque constitui-se numa importante ferramenta frente a infecções causadas por agentes infecciosos resistentes a antimicrobianos (WAINWRIGHT & GIDDENS, 2003). Está bem comprovada a eficácia da TFD no tratamento de micoses superficiais e subcutâneas (LYON *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012). No contexto da esporotricose, a TFD ainda não foi avaliada e pode também se constituir numa importante alternativa de tratamento, sobretudo quando envolver espécies resistentes ao itraconazol.

Finalmente, tendo em vista a necessidade de melhor compreensão da patogenia da esporotricose e, considerando a presença de melanina na célula fúngica um importante fator de virulência do fungo (FERNANDES *et al.*, 1999; MORRIS-JONES *et al.*, 2003), este estudo tem como finalidade avaliar aspectos da variação de virulência e suscetibilidade à TFD de isolados de *Sporothrix* agentes da esporotricose, constituintes do Complexo *Sporothrix schenckii*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade *in vitro* da TFD, a combinação de antifúngicos *in vivo* e as variações na suscetibilidade *in vitro* após incremento de melanina entre as espécies constituintes do Complexo *Sporothrix schenckii*.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Verificar se a TFD *in vitro* com azul de metileno e laser InGaAlP, na dosimetria de 100 J/cm², exerce inativação de conídios de diferentes espécies de *Sporothrix*;

2.2.2 Avaliar a atividade *in vitro* da combinação de anfotericina B e posaconazol frente isolados de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* stricto sensu.

2.2.3 Avaliar a eficácia da combinação de anfotericina B e posaconazol em modelo murino de infecção sistêmica por *S. brasiliensis* e *S. schenckii* stricto sensu.

2.2.4 Avaliar a interferência da melanina na suscetibilidade *in vitro* de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* stricto sensu frente ao itraconazol e à anfotericina B através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI M38-A2, M27-A3);

2.2.5 Avaliar a interferência da melanina no tempo de morte *in vitro* de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* stricto sensu frente ao itraconazol e à anfotericina B;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico e etiologia

A esporotricose foi primeiramente descrita por Benjamin Schenck, em 1898 nos Estados Unidos (EUA), que isolou o agente etiológico a partir de lesão de um paciente humano. Em 1927, Pijper e Pullinger reportaram um surto envolvendo 14 mineiros em Witwatersrand, cidade próxima à capital Johannesburgo, África do Sul. No mesmo local, entre 1941 e 1944, registou-se o maior surto 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 da doença ocorreu em 1907 por Lutz e Splendore, os quais descreveram a micose em ratos e humanos. No Rio Grande do Sul os primeiros casos em cães foram descritos em 1964 (LONDERO *et al.*, 1964).

O agente etiológico da esporotricose tanto no homem como em animais é o fungo dimórfico do gênero *Sporothrix*. 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). Há poucos anos, somente uma espécie do gênero *Sporothrix* – *Sporothrix schenckii* - tinha importância médica, a qual era classificada na divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales e família Moniliaceae (LACAZ *et al.*, 1998). Recentemente, após o aprofundamento dos estudos moleculares, um grupo espanhol propôs que a espécie *S. schenckii*, na verdade, se tratava de um complexo envolvendo pelo menos seis espécies distintas (MARIMON *et al.*, 2006). Anteriormente a esta proposta, Guarro e colaboradores (1999) já haviam reclassificado *Sporothrix schenckii* na divisão Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae.

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

Em temperaturas de até 35°C o fungo apresenta, macroscopicamente, colônias filamentosas de aspecto membranoso com coloração que varia entre creme e marrom-escuro.

Microscopicamente, são visualizadas hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas com conidióforos delgados e conídios dematiáceos ao longo das hifas. No ápice do conidióforo são observados dentículos simpodialmente dispostos, que produzem conídios hialinos com diâmetro entre 2 e 4 μm , os quais conferem a forma de “margarida”. Em temperatura de 37°C e nos meios adequados, são observadas colônias leveduriformes com aspecto cremoso e de coloração branco-amarelada, que na microscopia são representadas por células ovais a alongadas, medindo entre 2,5 e 5 μm , semelhantes a “charutos” ou “navetes” (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992).

3.2 Epidemiologia

A esporotricose está amplamente distribuída pelo mundo, ocorrendo com mais frequência em regiões de clima temperado e tropical, afetando homens e animais como cães, gatos, cavalos, bovinos, suínos, aves, cabras, ratos, mulas, golfinhos, chipanzés e camelos (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992). *S. schenckii* é um fungo com características ubíquas sendo encontrado no solo associado a material orgânico de plantas (espinhos, folhas secas e madeira) e em decomposição. Ocupações como jardinagem, manejo rural, agricultura, construção civil são relacionadas à maior predisposição a infecção (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006). A esporotricose também tem sido associada à arranhadura e mordedura durante a captura de animais silvestres, onde a caça a tatus é um fator de risco bem estabelecido (ALVES *et al.*, 2010).

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

Uma análise retrospectiva dos casos de esporotricose registrados no Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre reportou 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 foi de 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. A terapia com solução saturada de iodeto de potássio durante 16 semanas permitiu a remissão das lesões na maioria dos pacientes. Em relação à procedência, 72% eram da região metropolitana de Porto Alegre sendo os demais oriundos de diversas regiões do interior do estado (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. No Rio Grande do Sul, a esporotricose continua sendo a mais frequente das micoses subcutâneas do homem (MADRID *et al.*, 2012).

3.3 Manifestações clínicas

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 nasal e anal, denominadas mucocutâneas, além da forma conjuntival. Nas manifestações extracutâneas da micose podem ser relatados casos como esporotricose pulmonar, osteoarticular, meníngea ou sistêmica (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006).

A forma linfocutânea é a mais prevalente, representando 80% dos casos. Inicia-se como um nódulo ou lesão ulcerada no local da inoculação fúngica; tais lesões seguem o trajeto linfático regional, contíguo a lesão inicial, formando novos nódulos que ulceram, fistulam e tendem a regressão. Estes sinais clínicos permitiram a denominação de “linfangite nodular ascendente” como sinônimo da forma linfocutânea. O comprometimento de mucosas não é comum mas pode ocorrer na forma de lesões orofaciais (AARESTRUP *et al.*, 2001), de sinusites (MORGAN & REVES, 1996) e endoftalmite (KUROSAWA *et al.*, 1988).

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 à regressão espontânea havendo casos descritos com até 26 anos de evolução. Localiza-se com maior frequência 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 frequentes em áreas de alta endemicidade (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

A esporotricose pulmonar é uma condição primariamente relacionada com a inalação de conídios ou, em alguns casos, consequência de disseminação hematogênica. Há somente três casos na literatura relatando esporotricose pulmonar entre pacientes infectados pelo vírus HIV (GORI *et al.*, 1997; LOSMAN & CAVANAUGH, 2004; CALLENS *et al.*, 2005).

3.4 Fatores de virulência

Os fungos possuem fatores de virulência que aumentam suas chances de sobrevivência no hospedeiro, levando ao desenvolvimento da doença. Dentre os principais fatores de patogenicidade do *S. schenckii*, se destacam a presença de enzimas extracelulares, termotolerância, composição da parede celular e presença de grânulos de melanina (HOGAN *et al.*, 1996; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006). Esses fatores auxiliam na invasão tecidual e interferem na eficácia da resposta imune, propiciando a instalação do micro-organismo no tecido e sua transição para a forma leveduriforme. O tempo de transição micélio-levedura requer aproximadamente 13 dias, sendo que 24 – 48 horas após a inoculação da fase filamentosa do fungo ocorre o desaparecimento das hifas e inicia-se a conversão dos conídios para leveduras (CORREA *et al.*, 1991).

Dentre as enzimas extracelulares, as proteinases desempenham importante função na invasão tecidual, hidrolizando o estrato córneo, colágeno tipo I e elastina da pele, permitindo desta forma, a invasão fúngica. As fosfatases atuam na membrana celular, sendo capazes de catalisar e liberar fosfato de fosfoproteínas, apresentando também, importante papel na interação das células leveduriformes com macrófagos (ARNOLD *et al.*, 1986; YOSHIKE *et al.*, 1993; HOGAN *et al.*, 1996).

A termotolerância de isolados do gênero *Sporothrix* é um dos fatores que determinam o desenvolvimento de formas clínicas extracutâneas e sistêmicas. Isolados de lesões cutâneas normalmente não são capazes de crescer em temperatura de 37 °C; entretanto, alguns isolados

conseguem se multiplicar nesta temperatura, podendo desenvolver a doença na forma sistêmica ou extracutânea (ALBORNOZ *et al.*, 1986; TACHIBANA *et al.*, 2001).

A parede celular de *S. schenckii* é composta por β -glucanas e peptídeo-ramnomanana (33,5% de ramnose, 57% de manose e 14,2% de proteína). Várias pesquisas já demonstraram que cepas com maior proporção de ramnose em relação à manose em sua superfície, foram mais virulentas, causando a morte de todos os animais experimentais (FERNANDES *et al.*, 1999). A peptídeo-ramnomanana estimula a mitose de linfócitos, incitando reações de hipersensibilidade tardia assim como a produção de anticorpos. Esta fração antigênica também é responsável pela adesão das células de *S. schenckii* a proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, laminina e colágeno tipo II (LIMA *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

Há mais de 50 anos é conhecida a capacidade dos fungos em produzir melanina. Em geral, melaninas são macromoléculas formadas através de polimerização oxidativa de compostos indólicos e fenólicos. 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). Nos fungos causadores de micoses humanas, a melanina está relacionada com a função de proteção da célula fúngica frente aos sistemas de defesa do hospedeiro tais como peptídeos microbicidas, processos oxidativos, fagocitose e atividade lítica intracelular. A melanina é também citada como um fator de resistência fúngica aos fármacos, principalmente poliênicos e equinocandinas (LANGFELDER *et al.*, 2003, NOSANCHUK & CASADEVALL, 2006).

A grande quantidade de melanina encontrada em micro-organismos que habitam ambientes promotores de estresse sugere que tais pigmentos possam ser essenciais para a proteção do fungo frente à radiação ultra-violeta (UV), dissecação e temperaturas extremas, onde, o grau de proteção é diretamente proporcional à concentração de melanina na célula fúngica (BELL & WHEELER, 1986). A melanina confere resistência à célula fúngica frente às células efectoras do sistema imune, através da redução da fagocitose, proteção contra derivados de oxigênio e nitrogênio, e frente a enzimas hidrolíticas, como quitinase e glucanase (JACOBSON, 2000; ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000; NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003).

Ambos os estágios morfológicos de *S. schenckii* são capazes de sintetizar melanina. Os grânulos de melanina podem ser sintetizados por diversas vias metabólicas, no entanto, a mais bem caracterizada é a via pentacetídeo que sintetiza melanina DHN (dihidroxi-naftaleno), a

qual está presente nos conídios deste fungo. Estudos *in vitro* demonstraram que conídios albinos são até duas vezes mais fagocitados em relação aos conídios pigmentados, indicando que a melanina contribui para a sobrevivência do fungo no hospedeiro (ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000). Também já foi evidenciado que as espécies do Complexo *Sporothrix schenckii* pode produzir melanina através de compostos fenólicos como 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-dopa) como substrato (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009).

A melanização do fungo repercute também na patogênese da esporotricose cutânea, uma vez que isolados pigmentados mostraram maior habilidade de invasão que cepas mutantes “albinas” em um modelo experimental de esporotricose (MADRID *et al.*, 2010).

A demonstração histológica da melanina do Complexo *Sporothrix schenckii* pode ser confirmada através da detecção de “melanina fantasma” (melanina isolada da célula) em tecidos de animais infectados e também pela detecção de anticorpos antimelanina no soro de pacientes com esporotricose (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009; MORRIS-JONES *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* demonstraram que a melanização diminui a suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans* e de *Histoplasma capsulatum* à anfotericina B e caspofungina (IKEDA *et al.*, 2003; VAN DUIN *et al.*, 2002). Assim, pode-se hipotetizar que dificuldades ou falhas terapêuticas possam ocorrer em casos de esporotricose, determinadas pela interferência da melanina; se desconhece qual o papel da melanina no incremento da patogênese das infecções extracutâneas em pacientes imunocomprometidos (MORRIS-JONES, 2003).

3.5 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. Foi demonstrado que o soro imune (anticorpos *S. schenckii*-específicos) possui pouco efeito sobre a resistência contra *S. schenckii* (SETHI & SCHWARZ, 1965). Os linfócitos T desenvolvem papel fundamental na defesa contra infecções fúngicas, especialmente os linfócitos T CD₄⁺ (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 CD₄⁺ fenótipo Th1, fenótipo Th2 com pequena contribuição de linfócitos T CD₈⁺ (T-citotóxico) (TACHIBANA *et al.*, 1999; MAIA *et al.*, 2006).

A atividade fagocítica desempenhada pelos macrófagos pode ser comprometida devido às variações na composição química da parede celular dos fungos (CORBELLINI *et al.*, 1996). As frações lipídicas, a proporção glicídica (ramnose : manose) e a 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).

As células leveduriformes de fungos dimórficos virulentos, ao contrário dos fungos oportunistas, sobrevivem à fagocitose *in vitro* por neutrófilos. Apesar de leveduras virulentas ingeridas por polimorfonucleares (PMN) provocarem uma explosão respiratória comparável à induzida pelos organismos oportunistas, elas são menos suscetíveis ao peróxido de hidrogênio e a outros produtos microbicidas produzidos pelos leucócitos. Sgarbi e colaboradores (1997) identificaram o peróxido de ergosterol, como um suposto produto da oxidação enzimática do ergosterol H₂O₂-dependente, a partir de formas leveduriformes de *S. schenckii* através de métodos espectroscópicos. Este produto foi revertido a ergosterol quando em contato com enzimas do *S. schenckii*. Assim, é aceitável que o peróxido de ergosterol seja formado pelo *S. schenckii* como mecanismo protetor para evitar espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a fagocitose. A presença de peróxido de hidrogênio em fungos patogênicos, além de sugerir uma possível reação de detoxificação, também pode representar um fator de virulência (CARLOS *et al.*, 2009).

A morte de micro-organismos patogênicos intracelulares e extracelulares por fagócitos é devido, em parte, à produção de radicais livres oxigenados. Sob condições fisiológicas normais, o H₂O₂ é gerado em pequenas quantidades, e rapidamente utilizado ou degradado, mas a exposição prolongada a altas concentrações de H₂O₂ pode destruir estruturas biológicas e causar danos irreversíveis nas células do hospedeiro (RAMASARMA, 1990). Angelova e colaboradores (2005) demonstraram que a exposição de esporos fúngicos ou micélios ao paraquat e H₂O₂ promove o estresse oxidativo, evidenciado pela notável inibição da germinação de esporos e produção de biomassa. As respostas das células fúngicas contra o estresse promovido pelo radical superóxido e pelo peróxido de hidrogênio incluem aumento da expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase.

Tem sido relatado que o óxido nítrico (ON), produzido pelos macrófagos ativa um mecanismo primário contra diversos agentes patogênicos, tais como *Penicillium marneffei* (KUDEKEN *et al.*, 1998), *H. capsulatum* (BRUMMER & STEVENS, 1995), *C. neoformans* (WANG & CASADEVALL, 1994) e *Candida albicans* (BLASI *et al.*, 1995). Em geral, o acúmulo de nitrito está relacionado com atividade fungicida de macrófagos. Fernandes e colaboradores (2000) demonstraram que a capacidade dos macrófagos em matar *S. schenckii* poderia ser atribuído a produção de ON, sugerindo que este é um mediador citotóxico presente nos macrófagos de murinos defendendo-o contra este patógeno. Além disso, os autores puderam notar que havia uma relação entre a virulência da cepa e o nível de ON no soro dos animais infectados.

3.6 As novas espécies do gênero *Sporothrix*

Uma análise filogenética realizada com isolados de *S. schenckii* a partir de diferentes partes do mundo constatou variações na sequência de nucleótidos dos três genes, quitina sintase, β -tubulina e calmodulina. Desse modo, foi possível distinguir três grupos principais dentro do gênero *Sporothrix* associados com regiões específicas do mundo. Portanto, essas novas espécies foram denominadas como *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* (MARIMON *et al.*, 2007a).

Na sequência, as espécies de *Sporothrix* foram classificadas em grupos de acordo com a distribuição geográfica. O Grupo 1 inclui as cepas de *S. brasiliensis* relacionadas à epidemia zoonótica de esporotricose no Rio de Janeiro (Brasil); O Grupo 2 inclui *S. schenckii stricto sensu* isolado principalmente dos Estados Unidos e América do Sul; O Grupo 3 a espécie *S. globosa* com distribuição mundial; O Grupo 4 é restrito ao México (*S. mexicana*); O Grupo 5 inclui *S. albicans*, mais relacionado com isolados da Europa. A espécie *S. luriei* é rara, havendo apenas quatro casos relatados de infecção em humanos (MARIMON *et al.*, 2007b).

Tornou-se evidente que as novas espécies do complexo *S. schenckii* descritas - *S. albicans*, *S. luriei*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii* “stricto sensu” - possuem características fenotípicas e genotípicas distintas (MARIMON *et al.*, 2007a; MARIMON *et al.*, 2008) e são de interesse clínico.

Marimon e colaboradores (2007a) sugerem que o gene da calmodulina nuclear é um bom marcador para o reconhecimento das novas espécies. Os autores relataram também que

as diferentes espécies dentro do complexo podem ser facilmente e confiavelmente identificados através de técnicas fenotípicas. Características macroscópicas, assimilação de sacarose e rafinose, o diâmetro das colônias, a presença de conídios sésseis pigmentados e a capacidade de crescer a 37 ° C são métodos fenotípicos capazes de diferenciar as espécies.

3.7 Suscetibilidade aos agentes antifúngicos

A suscetibilidade aos antifúngicos varia consideravelmente dentro do Complexo *Sporothrix schenckii* (MARIMON *et al.*, 2007a; MARIMON *et al.*, 2008) fato que era, até pouco tempo, escassamente esclarecido. As espécies do Complexo *Sporothrix schenckii* evidenciam variações biológicas que podem explicar aquelas variações de suscetibilidade; a melanina é um fator de virulência fúngico que também interfere na suscetibilidade.

O iodeto de potássio foi o tratamento de escolha da esporotricose desde 1903 e ainda é utilizado para o tratamento da esporotricose em regiões endêmicas e de baixo poder econômico. Entretanto, seus efeitos adversos estão o levando ao desuso (XUE *et al.*, 2009). A substituição do iodeto de potássio pelos azólicos, evidenciou as variações de suscetibilidade do gênero *Sporothrix*, o que ficara oculto pelo tratamento anterior. A este fato deve-se acrescentar que a esporotricose não é causada somente por um agente (*S. schenckii*) mas por seis espécies deste gênero (Complexo *Sporothrix schenckii*). Estes fatos requerem atenção e investigações a fim de melhor reconhecemos as reais possibilidades de sucesso ou fracasso das terapêuticas instituídas.

O tratamento de escolha para esporotricose cutânea e linfocutânea é o itraconazol. Para a esporotricose osteoarticular o itraconazol também é recomendado, entretanto, exige terapia mais longa (KAUFFMAN *et al.*, 2000).

Estudos mostram que a terbinafina possui elevada atividade contra todas as espécies do gênero (MARIMON *et al.*, 2007b; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Entretanto, seu potencial terapêutico tem sido confirmado somente para esporotricose cutânea e linfocutânea (HAY, 1999; RYDER, 1999). Na esporotricose linfocutânea em modelo murino observa-se ausência de atividade desta alilamina (KAN & BENETT, 1988).

O grande número de relatos da eficácia do itraconazol na esporotricose cutânea e extracutânea (CONTI DÍAZ, 1992; SHARKEY-MATHIS *et al.*, 1993; XAVIER *et al.*, 2013) foram realizados anteriormente a caracterização das espécies do complexo *S. schenckii*.

Recentemente, porém, tem-se constatado variações de suscetibilidade entre algumas espécies como *S. albicans*, *S. globosa* e *S. mexicana* as quais têm demonstrado reduzida suscetibilidade ao itraconazol e ainda exibindo resistência cruzada aos demais antifúngicos azólicos (MARIMON *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; FISCHMAN *et al.*, 2012). Outros antifúngicos como fluconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina têm evidenciado fraca atividade antifúngica frente às espécies do Complexo *Sporothrix schenckii* (MARIMON *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Um estudo recente mostrou que o posaconazol possui alto potencial para o tratamento da esporotricose, sendo ativo frente a *S. schenckii* stricto sensu e *S. brasiliensis*. A anfotericina B é o tratamento mais utilizado para esporotricose sistêmica, sua forma lipossomal já mostrou ser eficaz no tratamento de esporotricose cutânea disseminada (NETO *et al.*, 1999), mas o posaconazol já é sugerido como uma alternativa à anfotericina B devido à sua eficácia e reduzida toxicidade (FERNÁNDEZ-SILVA *et al.*, 2012).

3.8 Combinações terapêuticas

As infecções fúngicas invasivas contituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade infecciosa em pacientes imunossuprimidos (DENNING, 1996; EDMOND *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2001). A eficácia de terapias com antifúngicos atuais está abaixo do ideal, e as taxas de mortalidade se aproximam de 60-80% em pacientes com leucemia aguda ou transplantados de células hematopoiéticas (DENNING, 1996; LIN *et al.*, 2001). Devido a estes resultados insatisfatórios, a terapia de combinação de fármacos antifúngicos, administrados concomitantemente ou sequencialmente, é cada vez mais utilizada como uma estratégia empírica, na tentativa de melhorar os resultados do tratamento de micoses refratárias. Em revisão sobre o assunto, Vazquez (2003) aponta as principais razões para a utilização da associação de dois ou mais antifúngicos, entre elas: (1) a obtenção de atividade fungicida através da associação de dois agentes fungistáticos; (2) a possibilidade de diminuição da dosagem dos fármacos, diminuindo os efeitos colaterais e a toxicidade, mantendo a eficácia, e conseqüentemente retardando a emergência de mutantes resistentes ao fármaco; (3) a obtenção de um amplo espectro de tratamento para pacientes seriamente doentes suspeitos de estarem acometidos por infecções mistas ou infecções por patógenos resistentes. Por outro lado, o mesmo autor ainda salienta que a combinação de

antifúngicos no tratamento das micoses pode acarretar desvantagens como: (1) a redução na eficácia clínica através da interação antagonista dos agentes; (2) aumento do potencial para interações e toxicidades medicamentosas; (3) elevação dos gastos com medicamentos que juntos podem não possuir benefício clínico comprovado.

Com a finalidade de prever a potencial eficácia terapêutica das combinações de antifúngicos, foram desenvolvidos métodos para quantificar seus efeitos sobre o crescimento fúngico *in vitro*. Um dos mais conhecidos e mais simples utilizados na detecção da interação entre os fármacos é o método de “checkerboard”. Como em um tabuleiro de xadrez, diluições seriadas de antifúngicos em caldo são distribuídas bidimensionalmente em microplacas e são inoculadas com uma concentração padrão do micro-organismo a ser testado, de modo que um grande número de concentrações de antifúngicos, em diferentes proporções, possa ser avaliado simultaneamente. Essa técnica baseia-se no cálculo do índice da concentração inibitória fracionária (ICIF) para demonstrar se a concentração inibitória mínima (CIM) de um fármaco está reduzida (sinergismo), inalterada (indiferença) ou aumentada (antagonismo) na presença de outro fármaco (CHAMBERS & SANDE, 1996; ODDS, 2003).

Todavia, a técnica de “checkerboard” fornece apenas uma medida relativa de potência para a combinação e ainda deixa a desejar quanto à dinâmica da interação dos antifúngicos. Estudos de curva de ação fungicida podem ajudar na elucidação da farmacodinâmica da combinação de antifúngicos através da medição dos efeitos da interação entre os fármacos sobre a velocidade e a extensão da ação fungicida sobre as células fúngicas (LEWIS *et al.*, 2002). Nesse método, culturas idênticas são incubadas simultaneamente com antifúngicos adicionados isoladamente ou em combinação. Se, por exemplo, uma combinação de antifúngicos tiver ação fungicida mais rápida do que qualquer fármaco isoladamente, o resultado é denominado sinergismo (CHAMBERS & SANDE, 1996).

Enquanto alguns estudos demonstram uma excelente concordância entre esses dois métodos (LEWIS *et al.*, 2002), a maior parte não a demonstra, e controvérsias sobre a comparabilidade dos resultados gerados por essas técnicas existem. Nesse sentido, estudos avaliando as interações da combinação de anfotericina B com azólicos têm fornecido resultados conflitantes, incluindo antagonismo, indiferença e aditividade, ou mesmo sinergismo. Além de meios de cultura, pH, temperatura e concentração do inóculo empregados, a ordem de administração (LEWIS *et al.*, 1998), a duração da exposição e a concentração dos agentes (ERNST *et al.*, 1998) bem como a natureza lipofílica do azólico (SCHEVEN & SCHWEGLER, 1995) e a suscetibilidade dos isolados ao fluconazol (LOUIE

et al., 1999) parecem ser importantes parâmetros a influenciar na atividade dessas combinações.

Devido às limitações dos testes de combinações de antifúngicos na prática clínica, os modelos animais têm ganhado preferência para a triagem dos efeitos combinados no tratamento antifúngico. Os estudos em animais parecem ser mais preditivos de interações farmacológicas em seres humanos se comparado com estudos *in vitro*, uma vez que os fatores farmacocinéticos e toxicológicos, os quais influenciam na eficácia global das combinações, somente podem ser observados *in vivo* (LEWIS & KONTOYIANNIS, 2001). No entanto, como em estudos *in vitro*, os dados de estudos com animais podem ser difíceis de interpretar devido à variabilidade no delineamento e métodos de estudo. A divergência farmacocinética é provavelmente o fator mais importante na errônea interpretação da eficácia antifúngica em modelos animais (COZENS, 1999; O'REILLY *et al.*, 1996). Devido à depuração antimicrobiana ser normalmente mais rápida em roedores do que em humanos (O'REILLY *et al.*, 1996), o perfil de concentração plasmático de cada um dos agentes utilizados na combinação deve ser documentado para assegurar que as concentrações clinicamente relevantes dos fármacos estão sendo testadas no modelo animal. Além disso, a monitorização das concentrações dos antifúngicos nos órgãos-alvo específicos pode ser importante para estudos de combinações utilizadas no tratamento de infecções em locais anatomicamente privilegiados (por exemplo, aspergilose no SNC), para prever se a eficácia melhorada é devida à farmacocinética (ex. a penetração mais rápida pelo segundo fármaco) ou por efeitos farmacodinâmicos (ex. sinergia).

Diversos mecanismos têm sido sugeridos para os diferentes tipos de interação observados nas combinações de poliênicos com azólicos. O efeito antagonista, observado pela maior parte dos estudos (DUPONT & DROUHET, 1979; SUD & FEINGOLD, 1983; VAN ETTEN *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 1994; VAZQUEZ *et al.*, 1996; SAMARANAYAKE *et al.*, 2001; SHIN & PYUN, 2004), é sugerido como o resultado do bloqueio da síntese do ergosterol da membrana celular fúngica pelos azólicos, potencialmente eliminando o sítio de ação da anfotericina B. Isso aumenta a suscetibilidade das células fúngicas à morte pelos fagócitos (SHIMOKAWA & NAKAYAMA, 1992). Vazquez *et al.* (1996) ainda propõe que a exposição das células leveduriformes ao fluconazol ativa as bombas de efluxo, as quais direta ou indiretamente reduziriam a afinidade ou o impacto de anfotericina B na membrana celular. Além disso, a anfotericina B interage com o ergosterol e causa a inibição irreversível da ATPase da membrana.

Por outro lado, a ausência de antagonismo entre poliênicos e azólicos (BOLARD, 1986) é explicada pelo fato de que a anfotericina B, além de ligar-se ao ergosterol e aumentar a porosidade da membrana fúngica, também parece induzir o extravasamento do material citoplasmático das células fúngicas sem a participação direta da ligação ao ergosterol. Além do mais, a suscetibilidade das células fúngicas à anfotericina B dependeria não somente da quantidade de ergosterol, mas também da composição total de fosfolipídios da membrana fúngica. Segundo Sanati et al (1997), a saturação das cadeias de ácidos graxos associada à peroxidação lipídica pode representar um papel na interação da anfotericina B com a membrana fúngica já que o fluconazol apenas inibe parcialmente a síntese de ergosterol. Portanto, o ergosterol residual da membrana que ficaria presente nas células pré-tratadas com fluconazol poderia servir de alvo para a ligação da anfotericina B.

Além disso, sugere-se que os efeitos aditivos ou mesmo sinérgicos observados pela combinação desses agentes (ODDS, 1982; SUGAR 1991) sejam resultantes da desestabilização da membrana fúngica pela ligação do poliênico, facilitando assim a entrada do azólico. Uma vez internalizado, o azólico poderia provocar outros efeitos no metabolismo fúngico além da mera inibição da síntese do ergosterol.

3.9 Terapia fotodinâmica

A TFD consiste basicamente na aplicação de um agente fotossensibilizador sobre uma célula, seguida da ativação do mesmo pela luz em presença de oxigênio. Este processo resulta em uma sequência de reações fotoquímicas e fotobiológicas que levam à destruição da célula-alvo (BLISS *et al.*, 2004). A primeira utilização da técnica data de 1900 quando Raab e von Tappeiner em Munique observaram que baixas concentrações de acridina associada à exposição da luz normal do dia, determinavam a inativação de *Paramecium* sp. (AKROYD *et al.*, 2001). Mais tarde, foi empregada a luz branca através de lâmpadas convencionais, com as desvantagens da alta temperatura associada e da dificuldade em se calcular a dosagem da luz (TOREZAN *et al.*, 2009). Posteriormente, os lasers tiveram maior aplicabilidade devido à monocromaticidade, unidirecionalidade e facilidade de cálculo da dosimetria (BRUGNERA JÚNIOR *et al.*, 2007). Suas propriedades terapêuticas vêm sendo estudadas desde sua descoberta por Einstein, em 1917, quando o mesmo formulou a teoria da emissão estimulada (PINHEIRO, 1998).

A TFD tem sido utilizada numa vasta gama de doenças cutâneas malignas com excelente resposta clínica e estética (WILSON *et al.*, 1989; 1992). O agente fotossensibilizador, por várias razões, acumula-se preferencialmente em tecido maligno e/ou é depurado mais rapidamente de tecidos normais. Uma série de estudos investigou a aplicação de derivados da hematoporfirina (DHP) na TFD em uma ampla gama de malignidades com ensaios pré-clínicos e clínicos. Estes estudos focaram em determinar o sítio de ação, toxicidade, concentração da droga, dosimetria da luz e a eficácia da TFD com DHP (DOUGHERTY & MARCUS, 1992). Devido ao sucesso do estudo, a TFD tornou-se uma modalidade emergente para o tratamento do câncer nos dias de hoje.

O laser terapêutico, ou laser não-cirúrgico, é considerado laser de baixa potência. Os mais comumente empregados são o He-Ne (Hélio-Neônio) e o diodo. O He-Ne emite raios com comprimento de onda de 632,8 nm (vermelho) e 543,5 nm (verde). O laser diodo é considerado um semiconductor, com comprimento de onda que varia entre 620 nm e 1500 nm nos espectros vermelho e infravermelho. Em semicondutores constituídos de materiais como gálio, alumínio e arsênio a energia é liberada na forma de fótons. Assim, o laser de fosfeto arseneto de gálio-índio (InGaAsP) emite espectro visível de luz vermelha ($\lambda=600-680$ nm) com potência entre 10 e 50 mW (PINHEIRO, 1998).

A fotodestruição dos tecidos pode ocorrer através de dois mecanismos distintos. No mecanismo tipo I o fotossensibilizador no estado ativado reage com um substrato orgânico produzindo radicais ou íons radicais. Esses radicais interagem instantaneamente com o oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxila, os quais possuem potencial de oxidar diversas moléculas biológicas (ZHU & FINLAY, 2008; ZHU *et al* 2008).

A reação fotodinâmica que ocorre com os fotossensibilizadores atuais segue principalmente o mecanismo tipo II. Nele, há formação do oxigênio singlete, altamente reativo, através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio (ZUH & FINLAY, 2008). Quando gerado, o oxigênio singlete pode reagir com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácidos nucleicos. Desta forma, as membranas celulares incluindo a citoplasmática, a mitocondrial, a lisossomal e a nuclear têm sua permeabilidade alterada, com conseqüente morte do tecido alvo através de necrose ou apoptose (KONAN *et al.*, 2002). Como o oxigênio singlete tem vida muito curta, o fotossensibilizador não ligado à célula não é fototóxico. Isso somado à sua alta reatividade faz com que apenas moléculas e estruturas próximas à área de sua produção (onde há o fotossensibilizador) sejam diretamente afetadas pela TFD (NYMAN & HYNNIEN, 2004). As

células não possuem mecanismos de defesa contra as moléculas de oxigênio singlete por ele ser um agente oxidante não-específico. Desta forma, não deve haver, teoricamente, desenvolvimento de resistência inerente dos micro-organismos.

O fotossensibilizador ideal para ser empregado na TFD deve congrega características como seletividade pelas células-alvo, absorver a luz no espectro vermelho ou vermelho-distante, ser hidrossolúvel e apresentar resposta biológica desejada (CASTANO *et al.*, 2004). A maioria dos fotossensibilizadores deriva de corantes vitais e caracterizam-se por não apresentarem “*a priori*” toxicidade às células humanas nas concentrações requeridas para a técnica. Os corantes, de modo geral, possuem a propriedade de absorver luz visível eficientemente e possuem a habilidade de induzir ou participar de reações fotoquímicas (MACHADO, 2000). Podem ser administrados por via tópica, intralesional ou sistêmica antes da consecutiva exposição à luz (ORTH *et al.*, 2000).

Os corantes fenotiazínicos possuem grande propensão à formação de EROs. Seu principal representante é o azul de metileno, que absorve luz na região de 620 a 700 nm (FERNANDEZ *et al.*, 1997). Este corante possui boa penetração nos tecidos, baixa toxicidade e potencial antimicrobiano fotoativo (TEICHERT *et al.*, 2002). O azul de metileno e o azul de toluidina têm sido empregados em tratamentos fotodinâmicos contra infecções bacterianas, tuberculose, tripanossomíase, infecções por leveduras, vírus e no tratamento do câncer (WAINWRIGHT & GIDDENS, 2003). O azul de metileno também já mostrou ser eficiente *in vitro* contra fungos filamentosos como *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* (LYON *et al.*, 2013). A aplicação da TFD com azul de metileno foi realizada no Brasil em casos de cromoblastomicose em humanos e se mostrou eficiente, pois reduziu as lesões em 80-90%, tanto no aspecto clínico como microscopicamente (LYON *et al.*, 2011). Dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* também foram sensíveis à TFD *in vitro* com compostos fenotiazínicos (RODRIGUES *et al.*, 2012).

4. ARTIGOS

Os resultados que compõem esta tese estão apresentados sob forma de Manuscrito, os quais estão organizados nas seções Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. Os manuscritos estão formatados segundo as normas exigidas pelas Revistas Científicas aos quais serão (ou foram) submetidos.

4.1. In vitro Photodynamic Inactivation of *Sporothrix schenckii* Complex Species

Artigo 1

***In vitro* Photodynamic Inactivation of *Sporothrix schenckii* Complex Species**

Débora Alves Nunes Mario*¹, Laura Bedin Denardi¹, Daniela Isabel Brayer Pereira², Janio
Morais Santurio¹ and Sydney Hartz Alves¹

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author

Phone/Fax.: +55 55 32208906

E-mail address: debora_alves6@hotmail.com

Postal address: Rua Andradas 1985/201 – Santa Maria – RS – Brasil – 97010-033

Artigo publicado na revista Medical Mycology (ISSN 1369-3786)

doi: 10.1093/mmy/myu041

Abstract

Photodynamic therapy has been applied successfully against cutaneous and subcutaneous mycoses. We have applied methylene blue as a photosensitizing agent and Light emitting diode (InGaAlP) against *Sporothrix schenckii* complex species in an *in vitro* assay. The viability of the conidia was determined through the counting of colony forming units. Methylene blue in conjunction with laser irradiation was able to inhibit the growth of all tested samples. The *in vitro* inhibition of *Sporothrix* spp isolates by laser light deserves *in vivo* experimental and clinical studies since it may be a promising treatment for cutaneous and subcutaneous sporotrichosis.

Keywords: sporotrichosis; mycosis; PDT; laser; methylene blue

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a widely used treatment modality for many tumors [1]. Researchers have previously shown that PDT inactivates bacteria, including antibiotic-resistant strains, parasites, viruses, and pathogenic fungi [2,3,4]. PDT is based on the ability of photosensitizing compounds after laser-light exposure to generate highly reactive singlet oxygen. The singlet oxygen attacks the biological membranes and the resulting changes in cellular permeability induce microbial damage [5]. Among the photosensitizers investigated for antimicrobial PDT purposes, methylene blue has shown efficient inactivation against *Candida* species, *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus nidulans* [4,6,7]. Phenothiazine compounds, such as methylene blue, are dyes

with a great ability to generate reactive oxygen species (ROS), which are responsible for irreversible cell membrane injury [8].

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis that affects humans and a wide variety of animals, and it is caused by dimorphic fungi belonging to the genus *Sporothrix*. Sporotrichosis is mainly acquired by traumatic implantation of the fungus into the dermis through scratches inflicted by domestic animals, such as cats, or by handling plants [9]. Molecular studies have shown that the genus *Sporothrix* encompasses at least six distinct species [10]. The newly discovered *Sporothrix* species show a different response to conventional antifungal agents [11,12], explaining the variation in susceptibility found before the species were differentiated [13]. Itraconazole is the treatment of choice for cutaneous and lymphocutaneous sporotrichosis. However, there are reports of failure since the *in vitro* resistance to this drug and the cross-resistance with other azole agents have been observed [11,12,14]. Given that sporotrichosis may require a lengthy therapy with itraconazole, the investigation of such alternatives appears to be worthy.

Here, we evaluated the *in vitro* susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex species to photodynamic inactivation using methylene blue as a photosensitizer and laser as the light source.

2. Materials and Methods

The following microorganisms were studied: *S. schenckii* sensu stricto Ss 02, *S. schenckii* sensu stricto Ss 09, *S. albicans* PG 3 and *S. brasiliensis* PG 1. The reference strains *S. brasiliensis* CBS 1330, *S. globosa* CBS 132922 and *S. mexicana* CBS 120341 were also included. Cultures were used after 7 days of growth on potato dextrose agar. For inoculum standardization, the conidia were suspended in sterile distilled water and diluted to a concentration of $1-5 \times 10^6$ cells/mL, as determined with a hemocytometer counting [15]. The

photodynamic inactivation technique utilized was described by Lyon et al. [15] with modifications in the volume used, in the incubation time, and in the concentrations of methylene blue. The methylene blue was tested at the concentrations of 0.5 (T1), 1.0 (T2), and 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (T3). The volume of 100 μL of each concentration was mixed with 100 μL of the standardized inocula pre-aliquoted into sterile 96-well microtiter plates. The suspensions were incubated for 30 min at 37 °C and protected from light. After this period, the inocula were irradiated using a diode laser (InGaAlP, Theralase, DMC, São Carlos, Brazil) with an output of 35 mW at a wavelength of 685 nm and at a distance of 1 cm for 110 sec. The irradiated area was 0.38 cm^2 , resulting in an energy dose of 28 J/cm^2 . The following controls were included: a) fungal suspension in saline without irradiation (C1); b) fungal suspension with methylene blue (1 $\mu\text{g/ml}$) and without irradiation (C2); and c) fungal suspension in saline and irradiated (C3). After the irradiation period, 10- μL aliquots from each group were inoculated on Sabouraud dextrose agar and incubated at 30°C for 7 days, at which point the colonies were counted. All tests were performed in triplicate. The photodynamic inactivation efficiency was evaluated by comparing the colony numbers after treatments T1, T2 and T3 with non-irradiated and methylene blue-free control colony counts (C1). The chi-square test was used to compare the differences between the control groups (C1) with the T1, T2 and T3 treatment groups, considering a significance level of 0.1%.

3. Results

Our results show that laser light (InGaAlP) together with a methylene blue photosensitizer were able to significantly reduce the growth of all the tested *Sporothrix* strains (Table 1). The growth in the control groups (C1, C2 and C3) were similar, with no significant difference, demonstrating that the growth reduction in the treatment groups (T1, T2 and T3) was due to photodynamic action and not due to methylene blue or laser effects alone. There

were no significant differences between species or between the methylene blue concentrations tested ($p > 0.001$), except for one *S. schenckii* (Ss02) strain, for which the T3 treatment was more effective than the T1 and T2 treatments ($p < 0.001$).

4. Discussion

The use of PDT for mycosis treatment has not been deeply explored. In 1962, Dickey [16] showed a fungicidal effect of PDT using neutral red, methylene blue and other dyes against *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. Since then, a few number of studies with pathogenic fungi has been reported, and some of them focused on the photosensitizing agents against *Candida* species and oral candidosis [17,18,19]. Such findings were important because they demonstrated that *Candida* spp isolated from AIDS patients and that showed resistance to amphotericin B and fluconazole were equally sensitive to photodynamic inactivation [20,21], similarly those already known with multidrug-resistant strains of bacteria [3].

Investigations with filamentous fungi gained interest due to the promising results obtained against superficial and cutaneous mycosis using PDT. *Trichophyton rubrum*, the main agent of dermatophytosis was also studied [7,22], and clinical trials have demonstrated the effectiveness of PDT for superficial mycoses presenting as dermatophytosis [23]. PDT has also achieved a desirable outcome against refractory fingernail onychomycosis caused by nondermatophytes moulds [24]. However, *in vivo* studies with subcutaneous mycosis or *in vitro* with its etiologic agents are incipient. Recently, PDT was applied to a clinical case of chromoblastomycosis, reducing the injured area by 80-90% [2]; the same authors demonstrated the *in vitro* antifungal activity of laser light against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii* using methylene blue (32 mg/mL) as the photosensitizing agent [15]. Regarding *Pythium insidiosum*, a fungus-like organism that shows primary resistance to

antifungal agents, the inhibition rates for PDT *in vitro* ranged from 60 to 100% and showed better results compared with amphotericin B [25]. Recently Gilaberte et al. [26] reported the successful application of PDT in clinical cases of human sporotrichosis. There are no reports communicating the development of resistance to PDT applied to mycoses, and the treatment is not associated with genotoxicity or mutagenic effects in fungi or in human cells [17].

Here, we have shown the *in vitro* photodynamic inactivation of all *Sporothrix schenckii* complex species studied. Our results corroborate the applicability of PDT against sporotrichosis reported by Gilaberte et al [26]. Furthermore, the outcomes of using PDT towards *Sporothrix* spp were similar to those described for *Candida* spp, dermatophytes, *Pythium insidiosum* and chromoblastomycosis agents. In general, our results expanded the knowledge regarding the laser-light inhibition of fungi that causes subcutaneous mycosis. This is even more relevant considering that some species among the *Sporothrix schenckii* complex, such as *S. albicans*, *S. globosa* and *S. mexicana* may exhibit itraconazole-resistance [11,12,13,14]. All of the strains in this study were sensitive to photodynamic inactivation, including the itraconazole-resistant strain *S. albicans*. This is in accordance with the principles of the action of nonspecific oxidizing agents, which oxidize the electron-rich double bonds in biological molecules of the fungi cells in multiple targets. This may explain why PDT is active against microorganisms resistant to antimicrobial agents [27]

In light of such facts, PDT may arise as an important alternative to the existing therapies, once the saturated solution of potassium iodide carries considerable adverse effects, and posaconazole is often costly and not available worldwide.

Finally, we understand that there is still insufficient evidence to suggest that PDT will replace conventional agents in the future. Nonetheless, PDT paves a new way for sporotrichosis and other subcutaneous mycosis managements. Our *in vitro* findings require complementary *in vivo* and clinical studies.

Acknowledgments

We thank Prof. Dr. Zoilo P Carmargo and Dr. Anderson M Rodrigues from UNIFESP (Brazil) for kindly supplying the strains.

Financial support: Mario DAN thanks the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for grant support and Alves SH thanks the financial support provided by CNPq (Grant Proc. 470229/2012-8).

Conflict of Interest: None.

References

1. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res T.* 2005; 4: 283-293. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1317568/>
2. Lyon JP, Azevedo CMPS, Moreira LM, Lima CJ, Resende MA. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. *Mycopathologia.* 2011; 172: 293-297. **doi: 10.1007/s11046-011-9434-6**
3. Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. *Laser Med Sci.* 2011; 26: 341-348. **doi: 10.1007/s10103-010-0852-3**
4. Pereira Gonzales F, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infection. *Fungal Biol.* 2012; 116: 1-10. **doi:10.1016/j.funbio.2011.10.001**
5. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-2006. **doi: 10.1128/AAC.48.6.2000-2006.2004**

6. Gonzales FP, da Silva SH, Roberts, DW, Braga GU. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. *Photochem Photobiol.* 2010; 86: 653-661. **doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00689.x**
7. Baltazar LM, Soares BM, Carneiro HC, Avila TV, Gouveia LF, Souza DG, Ferreira MV, Pinotti M, Santos DA, Cisalpino PS. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 354-361. **doi: 10.1093/jac/dks414**
8. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2004; 47: 3897-3915. **doi: abs/10.1021/jm040074b**
9. Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *An Acad Bras Ciênc.* 2006; 78: 293-308. **doi: org/10.1590/S0001-37652006000200009**
10. Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Lázera MS, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3251-3256. **doi: 10.1128/JCM.00081-06**
11. Oliveira DC, Lopes PG, Spader TB, Mahl CD, Tronco-Alves GR, Lara VM, Santurio JM, Alves SH. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:3047-3049. **doi: 10.1128/JCM.00255-11**
12. Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibility of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 732-734. **doi: 10.1128/AAC.01012-07**
13. Trilles L, Fernández-Torres B, Lázera MS, Wanke B, Schubach AO, Paes RA, Inza I, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases.

- Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 3952-3954. doi: **10.1128/AAC.49.9.3952-3954.2005**
14. Fischman O, Bentubo HDL, Camargo ZP, Rodrigues AM, Pires DC, Petri V. Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to itraconazole. *Mycoses.* 2012; 55: 207-208. doi: **10.1111/j.1439-0507.2012.02206.x**
15. Lyon JP, Moreira LM, Carvalho VS, Santos FV, Lima CJ, Resende MA. In vitro photodynamic therapy against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii*. *Mycoses.* 2013; 56: 157-161. doi: **10.1111/j.1439-0507.2012.02226.x**
16. Dickey RF. Investigative studies in fungicidal powers of photodynamic action. *J Invest Dermatol.* 1962; 39: 7-19. doi: **10.1038/jid.1962.75**
17. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, Woolfson AD. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue. *J Photochem Photobiol.* 2007; 86: 59-69. doi: **10.1016/j.jphotobiol.2006.07.011**
18. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 155-160. doi: **10.1067/moe.2002.120051**
19. Dovigo LN, Pavarina AC, Oliveira M, Garcia E, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *C. albicans* and *C. glabrata*. *Mycoses.* 2009; 54: 123–130. doi: **10.1111/j.1439-0507.2009.01769.x**
20. Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010; 7: 98-105. doi: **10.1016/j.pdpdt.2010.03.001**

21. Paz-Cristobal MP, Royo D, Rezusta A, André-Ciriano E, Alejandro MC, Meis JF, Revillo MJ, Aspiroz C, Nonell S, Gilaberte Y. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*. 2014; 57: 35-42. doi: **10.1111/myc.12099**
22. Rodrigues GB, Ferreira LK, Wainwright M, Braga GU. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. *J Photochem Photobiol B*. 2012; 5: 89-94. doi: **10.1016/j.jphotobiol.2012.08.010**
23. Sotiriou E, Koussidou-Eremonti T, Chaidemenos G, Apalla Z, Ioannides D. Photodynamic therapy for distal and lateral subungual toenail onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*: Preliminary results of a single-centre open trial. *Acta Dermato-Venereol*. 2010; 90: 216-217. doi: **10.2340/00015555-0811**.
24. Gilaberte Y, Aspiroz C, Martes MP, Alcalde V, Espinel-Ingroff A, Rezusta A. Treatment of refractory fingernail onychomycosis caused by nondermatophyte molds with methylaminolevulinate photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 65: 669-71. doi: **10.1016/j.jaad.2010.06.008**
25. Pires L, Bosco SMG, Silva JR NF, Kurachi C. Photodynamic therapy for pythiosis. *Vet Dermatol*. 2013; 24: 130-136.e30. doi: **10.1111/j.1365-3164.2012.01112.x**
26. Gilaberte Y, Aspiroz C, Alejandro C, Andres-Ciriano E, Fortuño B, Charlez L, Revillo MJ, Hamblin MR, Rezusta A. Cutaneous Sporotrichosis Treated with Photodynamic Therapy: An *in Vitro* and *in Vivo* Study. *Photomed Laser Surg*. 2014; 32: 1-4. doi: **10.1089/pho.2013.3590**
27. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral

candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 392-401.

doi: 10.1016/j.tripleo.2009.10.006

Table

Isolates	Colony Forming Unit (UFC)					
	C1	C2	C3	T1	T2	T3
<i>S. albicans</i>	1,27x10 ⁶	1,18x10 ⁶	1,07x10 ⁶	*1,75x10 ²	*0,5x10 ²	*0,5x10 ²
<i>S. brasiliensis</i> (PG1)	1,73x10 ⁵	0,9x10 ⁵	1,87x10 ⁵	*0,7x10 ²	*0,2x10 ²	*0,5x10 ²
<i>S. brasiliensis</i> (CBS1330)	1,9x10 ⁵	1,4x10 ⁵	1,8x10 ⁵	*3,5x10 ²	*0,5x10 ²	*1,0x10 ²
<i>S. globosa</i>	1,6x10 ⁵	1,6x10 ⁵	2,7x10 ⁵	*1,0x10 ²	*1,3x10 ²	*1,25x10 ²
<i>S. mexicana</i>	1,6x10 ⁵	1,25x10 ⁵	3,45x10 ⁵	*2,0x10 ²	*3,0x10 ²	*1,0x10 ²
<i>S. schenckii</i> (Ss02)	1,13x10 ⁶	1,6x10 ⁶	1,4x10 ⁶	*1,1 x10 ⁴	*1,2x10 ³	*0,6x10 ²
<i>S. schenckii</i> (Ss09)	1,4x10 ⁶	1,35x10 ⁶	1,4x10 ⁶	*0,5x10 ²	*0,8x10 ²	*0,6x10 ²

Table 1. Effect of photodynamic inactivation with methylene blue and laser (InGaAIP, 100 mW/cm²) in *Sporothrix schenckii* complex species.

C1, growth in Sabouraud Dextrose Agar without irradiation or methylene blue;

C2 isolates exposed to 1µg/mL of methylene blue without irradiation;

C3 isolates exposed to irradiation without methylene blue;

T1 photodynamic treatment with 0.5 mg/ml of methylene blue;

T2 photodynamic treatment with 1 mg/ml of methylene blue;

T3, photodynamic treatment with 2 mg/ml of methylene blue.

* The growth reduction was statistically significant (p <0.001)

4.2. *In vitro* and *in vivo* efficacy of amphotericin B combined with posaconazole against experimental disseminated sporotrichosis

Artigo 2

***In vitro* and *in vivo* efficacy of amphotericin B combined with posaconazole
against experimental disseminated sporotrichosis**

Débora Nunes Mario, Javier Capilla, Janio Morais Santurio,
Sydney Hartz Alves, Josep Guarro

Artigo submetido à revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy

ABSTRACT

Cutaneous and subcutaneous sporotrichosis are usually successfully treated; however, the management of visceral and disseminated forms is difficult. The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* activity of posaconazole in combination with amphotericin B and its efficacy in a murine model of systemic infections by *Sporothrix brasiliensis* and *S. schenckii* sensu stricto. The activity of both drugs alone or in combination was evaluated by using a microdilution checkerboard method. For the *in vivo* study, OF-1 mice were intravenously (i.v.) infected with a lethal inoculum of 2×10^7 CFU/animal. Two strains of *S. brasiliensis* and two of *S. schenckii* were tested. Animals received amphotericin i.v. at suboptimal dose i.e., 0.3 mg/kg, in combination with oral posaconazole at 2.5 mg/kg, 5 mg/kg or 10 mg/kg BID. Results were compared with their respective monotherapies and efficacy was evaluated by prolongation of survival and reduction of tissue burden in spleen and liver. *In vitro* data demonstrated a synergistic effect of the combination and although posaconazole alone was effective against sporotrichosis, efficacy was increased when combined with amphotericin B. The maximum efficacy was obtained with posaconazole 5 mg/kg combined with amphotericin B which could be an option in the treatment of disseminated sporotrichosis especially when itraconazole or amphotericin B at optimal doses are contraindicated.

INTRODUCTION

Disseminated sporotrichosis is the most severe manifestation of sporotrichosis, occurring mainly in immunocompromised patients and especially in those under corticosteroid therapy, patients with AIDS, diabetes and alcoholics [1-5] although dissemination has also been reported occasionally in immunocompetent patients [6, 7]. The *Sporothrix schenckii* complex encompasses six species [8] with different susceptibility profiles to the antifungal agents [9], which explains the variations in the susceptibility reported when *S. schenckii* was considered a single species [10]. Itraconazole and potassium iodine are the treatments of choice for lymphocutaneous sporotrichosis [11]; however, there has been failure due to the *in vitro* resistance to this azole and cross-resistance with other azoles has been observed [9, 12], while adverse effects related to the potassium iodine treatment lead patients to abandon the therapy [13]. In cases of disseminated sporotrichosis, treatment is carried out with amphotericin B (AMB) and maintenance treatment with itraconazole [1, 4, 11]. Posaconazole (PSC) appears to be a good choice due to its low MIC values against *Sporothrix* spp. [14], its safety and its apparent efficacy as shown in one clinical report published and in animal models [1, 15]. In experimental sporotrichosis, PSC has shown efficacy against *S. brasiliensis* and *S. schenckii sensu stricto*, but it was not better than AMB [15]. Moreover, *in vivo* studies with antifungal combinations have not yet been conducted against systemic sporotrichosis. In the present study the *in vitro* activity of AMB plus PSC was evaluated as well as the efficacy of the combination in a murine model of systemic infection by *S. brasiliensis* and *S. schenckii sensu stricto*, seeking to enhance the treatment of disseminated sporotrichosis.

MATERIALS AND METHODS

Strains. Two strains of *S. brasiliensis* (FMR 8319 and FMR 8326) and two of *S. schenckii sensu stricto* (FMR 8606 and FMR 8609) were included in the study. Fungi were stored in slant cultures covered with sterile paraffin oil and subcultured on potato dextrose agar (PDA) plates at 30°C for 7 days.

In vitro assays. MICs of AMB (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, USA) and PSC (Schering-Plough, Kenilworth, USA) were determined by following the CLSI guidelines [16]. A combination of the drugs was tested using the checkerboard method. Tests were carried out in duplicate. To evaluate the interaction of agents, the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated and combination was defined as synergistic when $FICI \leq 0.5$, indifferent when $0.5 < FICI < 4.0$, and antagonist when $FICI \geq 4.0$ [17].

In vivo assays. Four-week-old OF-1 male mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) with a mean weight of 30 g were used. Animals were housed in standard boxes with corncob bedding and free access to food and water. Inoculum size, chosen based upon previous studies [15], was 2×10^7 CFU/animal administered intravenously (i.v.) in 0.2 ml of sterile saline via the lateral tail vein. Six groups of 15 animals/group were established for each strain. Treatment groups received AMB as Fungizone (Squibb Industria Farmacéutica S. A., Barcelona, Spain) at 0.3 mg/kg given i.v., or PSC (Noxafil, Schering-Plough Ltd., Hertfordshire, United Kingdom) at 2.5 or 5 mg/kg twice a day (BID) by gavage. Combined treatments consisted on PSC at 2.5 or 5 mg/kg BID together with AMB at 0.3 mg/kg. Additionally, two groups infected with *S. brasiliensis* (FMR 8319) received PSC at 10 mg/kg alone or combined with AMB 0.3 mg/kg. All treatments began 1 day after infection and lasted for 18 days with control groups receiving no treatment. Efficacy was evaluated by prolongation of survival and reduction in tissue burden.

Fungal load was determined after 12 days of treatment in order to compare the results

with the control mice which started to die on that day. Five mice from each group were euthanized and the liver and the spleen, which are the most affected organs in experimental systemic sporotrichosis [18], were aseptically removed, weighed and homogenized in 1ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were placed on PDA and incubated for 72 h at 30°C. The number of CFU/g of tissue was calculated. The rest of the animals were checked twice daily for 30 days for survival records.

RESULTS

As shown in Table 1, the *in vitro* combination of PSC with AMB was in synergistic for all isolates studied (FICI = 0.5 for *S. brasiliensis* and ≤ 0.28 for *S. schenckii*). All the fungal strains tested caused systemic infection with 100% mortality in control animals (MST ≤ 17 and ≤ 15 days, for *S. brasiliensis* and *S. schenckii* strains, respectively) and in those receiving AMB 0.3 mg/ml (MST ≤ 26 and ≤ 22 days, respectively). No significant differences were found between control and AMB-treated animals ($p > 0.8$). However, all animals receiving PSC alone at any concentration or in combination with AMB 0.3 mg/kg survived through the experimental period (30 days).

Tissue burden studies demonstrated the efficacy of PSC in those animals infected with either *S. brasiliensis* (Figure 1) or *S. schenckii* (Figure 2) being PSC at 5 mg/kg more effective in reducing fungal loads from both organs than at 2.5 mg/kg. The assayed dose of PSC 10 mg/kg against one strain of *S. brasiliensis* (FMR 8319) showed no benefit over 5 mg/kg. The efficacy of the treatments was increased when PSC was combined with AMB, PSC 5 + AMB being the treatment showing the highest burden reduction since the combination PSC 10 + AMB did not further increase efficacy. Interestingly, the data obtained demonstrated an equivalent efficacy in fungal reduction between PSC 5 mg/kg alone and PSC 2.5 mg/kg plus AMB against *S. schenckii* and a trend to equivalence against *S. brasiliensis*.

DISCUSSION

Previously, we demonstrated the efficacy of PSC 5 mg/kg against *S. brasiliensis* in a murine model, although such efficacy was not superior to the obtained administering AMB at optimal dose in murine models i.e., 0.8 mg/kg. We also demonstrated that higher doses of PSC (10 and 20 mg/kg) do not improve efficacy over the treatment with 5 mg/kg [15]. In the present study doses of 5 mg/kg resulted in higher efficacy than 2.5 mg/kg but as previously reported, 10 mg/kg of PSC does not further efficacy. Combined therapy might be an option for those patients who do not respond to the treatment or when toxic effects makes it desirable to reduce the drug dosage as in the case of AMB [19]. Given the limitations of testing antifungal combinations in clinical settings, animal models are the preferred method for screening the combined effects of antifungal therapy. Animal studies are more predictive of antifungal interactions in humans than the *in vitro* studies are because pharmacokinetic and toxicological factors influencing the overall efficacy of the combinations can only be observed in animals [20]. However, in this study the FICI values obtained showed some correlation with the *in vivo* results. The *S. schenckii* strains had lower FICI values than the *S. brasiliensis* strains and the combination was more effective against the strains of the former species than against *S. brasiliensis*. This was more clearly observed in the tissue burden studies than in survival since no animal treated with the combinations succumbed to the infection. *S. brasiliensis* has been shown to be the most virulent species in the complex and is less sensitive to the treatment than *S. schenckii* [9, 18]. There are several reported cases of systemic sporotrichosis having a fatal outcome despite having used the recommended treatments [3, 21, 22] which makes it desirable to explore new therapeutic options. In experimental murine infections, voriconazole

was shown to have potential as treatment against disseminated infections by *S. schenckii* but not by *S. brasiliensis* [23]; however, PSC showed efficacy against both species with doses of 5 mg/kg being as efficient as 10 or 20 mg/kg [15]. In a clinical case of disseminated sporotrichosis [1], treatment with AMB plus itraconazole failed due to renal impairment and to gastrointestinal intolerance. Therapy was then substituted for AMB in combination with PSC for 4 months followed by PSC monotherapy, resulting in a dramatic clinical improvement. The patient remained stable, thus demonstrating the positive effects of PSC alone and in combination with AMB against disseminated sporotrichosis. In the present study, we have demonstrated that efficacy of PSC can be enhanced by combining it with AMB at low doses, an alternative that deserves attention especially in those patients suffering disseminated sporotrichosis who do not respond to the treatment or when itraconazole or high doses of AMB are contraindicated.

Table 1. *In vitro* interaction of amphotericin B (AMB) and posaconazol (PSC) against *S. brasiliensis* and *S. schenckii*.

Species	Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) AMB / PSC		FICI	Effect
		Alone	In combination		
<i>S. brasiliensis</i>	8314	2 / 4	1 / 0.03	0.50	Synergism
	8319	0.5 / 4	0.125 / 1	0.50	Synergism
<i>S. schenckii</i>	8606	1 / 4	0.03 / 1	0.28	Synergism
	8609	2 / 4	0.03 / 1	0.26	Synergism

Fig 1.

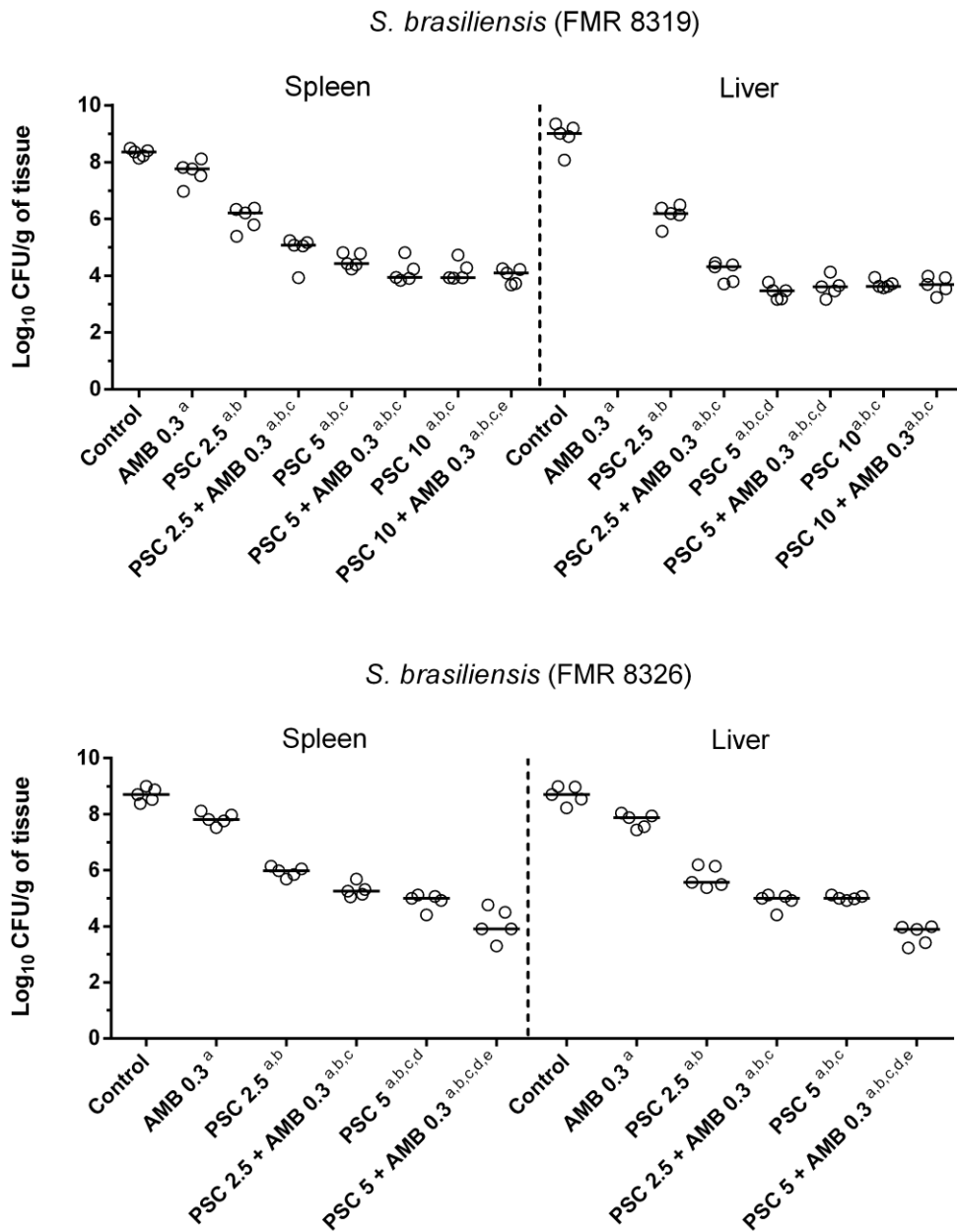


Figure 1. Effect of posaconazole (PSC) and amphotericin B, both alone and in combination, on fungal loads of mice 12 days after intravenous infection with 2×10^7 CFU/animal of *S. brasiliensis*. Horizontal bars represent the median. Significant ($p < 0.05$) in comparison to ^aControl, ^bAMB 0.3, ^cPSC 2.5, ^dPSC 2.5+AMB 0.3, ^ePSC 5.

Fig 2.

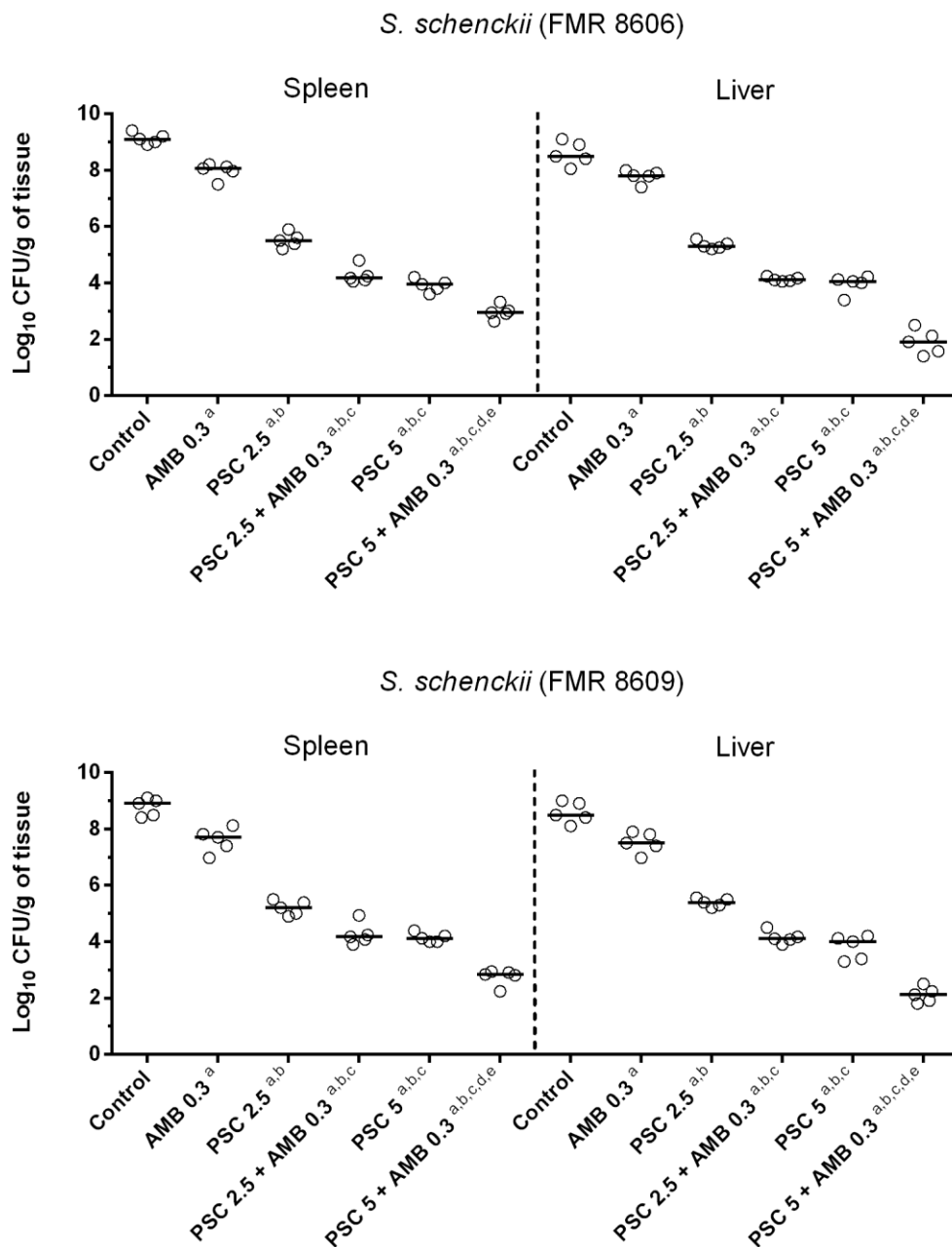


Figure 2. Effect of posaconazole (PSC) and amphotericin B, both alone and in combination, on fungal loads of mice 12 days after intravenous infection with 2×10^7 2×10^7 CFU/animal of *S. schenckii*. Horizontal bars represent the median. Significant ($p < 0.05$) in comparison to ^a Control, ^b AMB 0.3, ^c PSC 2.5, ^d PSC 2.5+AMB 0.3, ^e PSC 5

REFERENCES

- [1] Bunce PE, Yang L, Chun S, Zhang SX, Trinkaus MA, Matukas LM (2012) Disseminated sporotrichosis in a patient with hairy cell leukemia treated with amphotericin B and posaconazole. *Med Mycol* 50:197-201
- [2] da Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A (2005) Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol* 52:451-459
- [3] Fonseca-Reyes S, Lopez Maldonado FJ, Miranda-Ackerman RC, Velez-Gomez E, Alvarez-Iniguez P, Velarde-Rivera FA, Ascensio-Esparza EP (2007) Extracutaneous sporotrichosis in a patient with liver cirrhosis. *Rev Iberoam Micol* 24 (1):41-43
- [4] Freitas DF, de Siqueira Hoagland B, do Valle AC, Fraga BB, de Barros MB, de Oliveira Schubach A, de Almeida-Paes R, Cuzzi T, Rosalino CM, Zancope-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC (2012) Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol* 50:170-178
- [5] Gutierrez-Galhardo MC, do Valle AC, Fraga BL, Schubach AO, Hoagland BR, Monteiro PC, Barros MB (2010) Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Mycoses* 53:78-80
- [6] Romero-Cabello R, Bonifaz A, Romero-Feregrino R, Sanchez CJ, Linares Y, Zavala JT, Romero LC, Romero-Feregrino R, Vega JT (2011) Disseminated sporotrichosis. *BMJ Case Rep*. doi:10.1133/bcr.10.2010.3404
- [7] Yap FB Disseminated cutaneous sporotrichosis in an immunocompetent individual. *Int J Infect Dis* 15:e727-729
- [8] Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J (2007) *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 45:3198-3206
- [9] Marimon R, Serena C, Gene J, Cano J, Guarro J (2008) In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:732-734
- [10] Trilles L, Fernandez-Torres B, Dos Santos Lazera M, Wanke B, de Oliveira Schubach A, de Almeida Paes R, Inza I, Guarro J (2005) In vitro antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3952-3954
- [11] Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG (2007) Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 45:1255-1265

- [12] Zhang X, Huang H, Feng P, Zhang J, Zhong Y, Xue R, Xie Z, Li M, Xi L (2011) In vitro activity of itraconazole in combination with terbinafine against clinical strains of itraconazole-insensitive *Sporothrix schenckii*. *Eur J Dermatol* 21:573-576
- [13] Sharma NL, Mehta KI, Mahajan VK, Kanga AK, Sharma VC, Tegta GR (2007) Cutaneous sporotrichosis of face: polymorphism and reactivation after intralesional triamcinolone. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73:188-190
- [14] Rodrigues AM, de Hoog GS, de Cassia Pires D, Brihante RS, Sidrim JJ, Gadelha MF, Colombo AL, de Camargo ZP (2014) Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect Dis* 14:219
- [15] Fernandez-Silva F, Capilla J, Mayayo E, Guarro J (2012) Efficacy of posaconazole in murine experimental sporotrichosis. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2273-2277
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard—second edition. CLSI document M38-A2 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- [17] Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F (2004) In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:970-978
- [18] Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Marine M, Gene J, Cano J, Guarro J (2009) Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect* 15:651-655
- [19] Chamilos G, Kontoyiannis DP (2006) The rationale of combination antifungal therapy in severely immunocompromised patients: empiricism versus evidence-based medicine. *Curr Opin Infect Dis* 19:380-385
- [20] Lewis RE, Kontoyiannis DP (2001) Rationale for combination antifungal therapy. *Pharmacotherapy* 21:149S-164S
- [21] Hardman S, Stephenson I, Jenkins DR, Wiselka MJ, Johnson EM (2005) Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. *J Infect* 51:e73-77
- [22] Yelverton CB, Stetson CL, Bang RH, Clark JW, Butler DF (2006) Fatal sporotrichosis. *Cutis* 78:253-256
- [23] Fernandez-Silva F, Capilla J, Mayayo E, Guarro J (2014) Modest efficacy of voriconazole against murine infections by *Sporothrix schenckii* and lack of efficacy against *Sporothrix brasiliensis*. *Mycoses* 57:121-124

4.3. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B

Artigo 3

Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B

Débora Nunes Mario, Roberto Christ Vianna Santos, Rodrigo de Almeida Vaucher,
Laura Bedin Denardi, Janio Morais Santurio, Sydney Hartz Alves

ABSTRACT

Background: The presence of melanin in the fungal cell is a major virulence factor of the genus *Sporothrix*. In the host, it protects the fungal cells against the defense systems.

Aims: The present study aimed to investigate the interference of melanin in the susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* and *S. schenckii* sensu stricto to amphotericin B and itraconazole, drugs recommended as therapy for disseminated and subcutaneous sporotrichosis, respectively.

Methods: Yeast cells were cultivated in minimal medium with or without L-DOPA in order to induce the production of melanin. Microdilution and time-kill methods were used to determine the antifungal activity against yeast cells with different amounts of melanin.

Results: The killing assay showed that melanization protected isolates within the *Sporothrix schenckii* complex from amphotericin B, particularly in the lower concentrations tested.

Conclusion: Combination studies of amphotericin B with inhibitors of melanin are required in order to avoid this effect.

RESUMEN

Antecedentes: La presencia de melanina en la célula fúngica es un importante factor de virulencia del género *Sporothrix*, en huéspedes protege el hongo contra los sistemas de defensa.

Objetivos: El presente estudio tuvo como objetivo investigar la interferencia de la melanina en la susceptibilidad de *Sporothrix brasiliensis* y *Sporothrix schenckii* stricto sensu a la anfotericina B e itraconazol, fármacos recomendados como terapia para la esporotricosis diseminada y subcutánea, respectivamente.

Métodos: Células en la fase de levaduras fueron cultivadas en medio mínimo con o sin L-DOPA con el fin de inducir la producción de melanina. Métodos de microdilución y el ensayo

de time kill fueron aplicados para determinar la actividad antifúngica contra las células de levaduras con diferentes cantidades de melanina.

Resultados: El ensayo de time kill demostró que la melanización protege aislado del complejo *Sporothrix schenckii* de la anfotericina B, particularmente en las concentraciones más bajas probadas.

Conclusiones: Se requieren estudios de combinación de anfotericina B con inhibidores de la melanina con el fin de evitar este efecto.

Key words: *Sporothrix*; melanin; resistance; susceptibility; amphotericin B.

Palabras clave: *Sporothrix*; melanina; resistência; susceptibilidad; anfotericina B.

Introduction

Sporotrichosis is a fungal disease caused by dimorphic and thermotolerant fungi belonging to the *Sporothrix schenckii* complex that occurs in both subacute and chronic forms. This fungus primarily affects the skin and subcutaneous tissue and most frequently manifests as a lymphocutaneous infection [16]. Most cases occur due to traumatic implantation of the fungus through the skin by handling plants, soil and infected animals [33]. Disseminated sporotrichosis has been described in immunocompromised patients, especially in those under corticosteroid treatment, patients with AIDS, diabetes and alcoholics [6, 8-11], and, although rare, dissemination has also been reported in immunocompetent patients [30, 36]. The *Sporothrix schenckii* complex encompasses six species capable of causing sporotrichosis [19]. These species show different susceptibility profiles to antifungal agents *in vitro* [20], as well as different levels of virulence *in vivo* [4].

Melanin is a requirement for fungal cells to persist when faced with host defense systems [3, 14, 25, 31] and is also considered a factor of fungal drug resistance, mainly for polyene and echinocandin class antifungals. Both morphological stages of *Sporothrix* are able to synthesize melanin via the polyketide pathway to produce DHN (dihydroxynaphthalene) melanin, which is present in the cells of the fungus. It has also been shown that *Sporothrix* can produce melanin through phenolic substrates such as 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) [1], and some species can produce pyomelanin in the presence of L-tyrosine [2]. Almeida-Paes [2] demonstrated with one strain of *S. brasiliensis* that cells became more resistant to amphotericin B after melanization in medium with L-DOPA or L-tyrosine. Amphotericin B is the treatment of choice for systemic sporotrichosis [23]. Thus, it may be possible that therapeutic failures may occur in cases of sporotrichosis as a result of drug resistance driven by melanization.

This study approaches the interference of fungal melanin in the *in vitro* susceptibility of the most common and virulent *Sporothrix* species – *S. schenckii* sensu stricto and *S. brasiliensis* - to both amphotericin B and itraconazole. Recognition of such interference may be essential in redefining doses and treatments for cases of sporotrichosis.

Material and methods

Chemicals

Amphotericin B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and itraconazole (Janssen-Cilag, São Paulo, SP) were obtained as standard powders and prepared according to the *Clinical and Laboratory Standards Institute* guidelines [7]. RPMI 1640 medium (with L-glutamine and without sodium bicarbonate), morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), and L-DOPA were purchased from Sigma Chemical Co. (Cleveland, OH).

Fungal strains and media

Three isolates of *S. schenckii* sensu stricto and three isolates of *S. brasiliensis* obtained from cases of lymphocutaneous sporotrichosis were studied. The fungal yeast cells were grown at 37°C for 7 days in a rotary shaker (150 rpm) in brain heart infusion (BHI) broth. Controls were obtained by growing yeast cells on minimal medium agar plates (15 mM glucose, 10 mM MgSO₄, 29.4 mM KH₂PO₄, 13 mM glycine, 3.0 µM vitamin B1, 2% agar; Difco) (MM); melanization was induced by growing yeast cells on minimal medium supplemented with 1 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (MML) for 10 days [32]. Cells were then harvested and washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2.

MIC determination

Minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined by the standardized protocol (M27-A3) according to CLSI [7], adapted to the yeast phase of *Sporothrix*. Final drug concentrations ranged from 0.06 to 4 µg/mL for amphotericin B and itraconazole. After incubation at 37°C for 48 hours, MICs for amphotericin B were defined as the lowest concentrations at which there was an absence of growth, and for itraconazole as the lowest drug concentrations which achieved 50% growth inhibition compared to the growth of the drug-free control.

Killing assay

For the killing assay, yeast cells were suspended in sterile normal saline at a density of 2.2×10^3 cells/ml. Cell counts were determined with a hemocytometer. Microcentrifuge tubes containing 0.1 mL aliquots of an antifungal at 10 times the final concentration were inoculated with 0.9 mL of the yeast suspensions. Final drug concentrations ranged from 2 to 8 µg/mL for amphotericin B, and 1 to 4 µg/mL for itraconazole. After incubation at 37°C for 2 h, aliquots were planted on BHI agar to determine their viability, as measured by the number of CFU. The rate of survival was compared to that of fungal cells incubated in PBS [34].

Spectrophotometry of yeast cell extracts

Extraction of melanin was performed in order to quantify differences in the amount of melanin in the *Sporothrix* isolates grown in different media. The method used an evaluation of crude extract of the yeast mass obtained by autoclaving for 90 minutes at 120°C suspended in 0.02 mol / L citrate buffer, pH 7, as previously described [17]. Then, the suspension was centrifuged and the supernatant collected for spectrophotometric analysis. The extracts were analyzed at 260 nm [32].

Statistics

Statistical significance (*P* values) was determined using Wilcoxon test to compare MICs results with and without melanin interference, and Student's t-test was used in the killing assay.

Results and discussion

All isolates produced higher amounts of melanin within 10 days in medium supplemented with L-DOPA (MML), while isolates cultured in medium without L-DOPA (MM) remained with their standard melanization (Table 1). The absorbance of the melanized group was approximately twice the absorbance of the group not exposed to L-DOPA, showing the greater production of melanin when L-DOPA is present in the medium.

The geometric mean of MICs for amphotericin B and itraconazole for the isolates subcultured in the different media were compared. There was no significant difference among the MICs of the group without increasing melanin (MM), and the group with melanin inducing conditions (MML) (Table 2) ($p > 0.05$). In the killing assay, melanization protected the cells against amphotericin B. The differences were statistically significant at a concentration of 2 µg/ml

($p < 0.001$) (Fig. 1). The results obtained with itraconazole showed no differences between the groups tested (data not shown).

Amphotericin B is the treatment of choice for disseminated and extracutaneous sporotrichosis [15]. A previous study showed that both fungal melanin and synthetic melanin are capable of binding to amphotericin B, reducing the effectiveness of this agent. In contrast, fluconazole, itraconazole and 5-fluorocytosine activities were not modified by the presence of melanin. Tests with azole antifungal agents did not result in significant death of the fungus, which is consistent with the fungistatic properties of these drugs [34].

In this study, the broth microdilution technique [7] was unable to demonstrate the interference of melanization in the antifungal susceptibility of *Sporothrix* strains. This finding is in agreement with studies performed with *C. neoformans* and *H. capsulatum* [13, 34, 35]. It was reported that this could be due to the absence, in the culture medium, of substrates for melanization. In the same study the authors attempted to minimize this problem by adding L-DOPA to RPMI, but this resulted in the formation of a black precipitate which precluded the use of this modification to the assay [34].

Here, the killing assay showed that melanization protected *S. schenckii* sensu stricto and *S. brasiliensis* from amphotericin B, particularly in the lower concentration tested, as has already been demonstrated in one strain of *S. brasiliensis* [2]. Previous studies using the same technique have also demonstrated that melanization was able to protect *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* and *Wangiella dermatitidis* against amphotericin B [13, 28, 34]. These authors suggest that fungal melanin in its antioxidant role, binds to amphotericin B and reduces its activity. In addition to its antifungal activity, amphotericin B is also a potent immunomodulator [24]. Thus, its binding to fungal melanin can also reduce the effect on host factors, such as activation of T cells and macrophages. Furthermore, melanin is also an immunologically active molecule that suppresses inflammation [5, 21]. *In*

vitro studies have demonstrated that albino conidia are two-fold more highly phagocytized than the respective pigmented spores, what indicates that melanin contributes to the survival of the fungal cells in the host [31]. The melanization of the fungal cells also affects the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis because pigmented isolates showed greater ability to invade tissues than albino mutant strains in an experimental model of sporotrichosis [18].

S. brasiliensis, the most virulent species of the complex [4], has frequently been reported in infections in Brazil, often affecting immunocompetent patients. There are case reports of lung injury in HIV negative patients [27], a familial outbreak in the southeastern of Brazil [26], and in animals, resistance to itraconazole treatment was reported [12]. *Sporothrix* species are also the most frequent pathogens in cases of osteoarticular infection in immunocompetent patients [29].

Disseminated sporotrichosis is a problem especially for immunocompromised patients, and these individuals require higher doses of amphotericin B for some months and often require secondary prophylaxis for an extended period of time. Melanization is essential for the virulence of *Sporothrix*, and it is evident that melanin can be synthesized in a human host and in mammalian tissues during infection by *Sporothrix* species [22]. As already proposed in previous studies [34], our findings reinforce the importance of combination studies of amphotericin B with potent inhibitors of melanin synthesis, in this case, for sporotrichosis infection.

Financing

Mario DN thanks the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for grant support and Alves SH thanks the financial support provided by CNPq (Grant Proc. 470229/2012-8).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Almeida-Paes R, Frases S, Fialho Monteiro PC, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect.* 2009;11:554-62.
2. Almeida-Paes R, Frases S, Araújo GdeS, de Oliveira MM, Gerfen GJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:8623-30.
3. Alviano DS, Franzen AJ, Travassos LR, Holandino C, Rozental S, Ejzemberg R, Alviano CS, Rodrigues ML. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect Immun.* 2004;72:229-37.
4. Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Mariné M, Gené J, Cano J, Guarro J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:651-5.
5. Avramidis N, Kourounakis A, Hadjipetrou L, Senchuk V. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of grape melanin. Inhibitory effects on paw edema and adjuvant induced disease. *Arzneimittelforschung.* 1998;48:764–71.

6. Bunce PE, Yang L, Chun S, Zhang SX, Trinkaus MA, Matukas LM. Disseminated sporotrichosis in a patient with hairy cell leukemia treated with amphotericin B and posaconazole. *Med Mycol.* 2012;50:197-201.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed., 2008.
8. da Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorat R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52:451-9.
9. Fonseca-Reye S, López Maldonado FJ, Miranda-Ackerman RC, Vélez-Gómez E, Alvarez-Iñiguez P, Velarde-Rivera FA, Ascensio-Esparza EP. Extracutaneous sporotrichosis in a patient with liver cirrhosis. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:41-3.
10. Freitas DF, de Siqueira Hoagland B, do Valle AC, Fraga BB, de Barros MB, de Oliveira Schubach A, de Almeida-Paes R, Cuzzi T, Rosalino CM, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Brazil Med Mycol.* 2012;50:170-8.
11. Gutierrez-Galhardo MC, do Valle AC, Fraga BL, Schubach AO, Hoagland BR, Monteiro PC, Barros MB. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Mycoses.* 2010;53:78-80.
12. Guterres KA, de Matos CB, Osório LdaG, Schuch ID, Cleff MB. The use of (1-3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2014;177:217-21.
13. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol.* 2003;47:271-7.
14. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:708-17.

15. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG, Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007;45:1255-65.
16. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Subcutaneous and Deep Mycoses - Sporotrichosis. In *Medical Mycology*. 1992; Malvern: Lee & Febiger Cap. 26, p. 707-729.
17. Lloyd KO, Bitoon MA. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. *J Immunol*. 1971;107:663-71.
18. Madrid IM, Xavier MO, Mattei AS, Fernandes CG, Guim TN, Santin R, Schuch LF, Nobre MdeO, Araújo Meireles MC 2010. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microb Infect*. 2010;12:162-5.
19. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3198-3206.
20. Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:732-4.
21. Mohaghehpour N, Waleh N, Garger SJ, Dousman L, Grill L, Tusé D 2000. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. *Cell Immunol*. 2000;199:25-36.
22. Morris-Jones R, Youngchim S, Gome BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuk JD, Casadevall A, Hamilton AJ. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun*. 2003;71:4026-33.

23. Neto RJP, Machado AAM, Castro G, Quaglio ASS, Martinez R. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida - relato de caso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32:57-61.
24. Nosanchuk JD, Cleare W, Franzot SP, Casadevall A. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:233-9.
25. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2003;5:203-23.
26. Oliveira MM, Maifrede SB, Ribeiro MA, Zancope-Oliveira RM. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108:936-8.
27. Orofino-Costa R, Unterstell N, Carlos Gripp A, de Macedo PM, Brota A, Dias E, de Melo Teixeira M, Felipe MS, Bernardes-Engemann AR, Lopes-Bezerra LM. Pulmonary cavitation and skin lesions mimicking tuberculosis in a HIV negative patient caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol Case Rep.* 2013;16:65-71.
28. Paolo WFJr, Dadachova E, Mandal P, Casadevall A, Szaniszlo PJ, Nosanchuk JD. Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella [Exophiala] dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. *BMC Microbiol.* 2006;6:55.
29. Rammaert B, Gamaletsou MN, Zeller V, Elie C, Prinapori R, Taj-Aldeen SJ, Roilides E, Kontoyiannis DP, Brause B, Sipsas NV, Walsh TJ, Lortholary O. Dimorphic fungal osteoarticular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;doi: 10.1007/s10096-014-2149-0.

30. Romero-Cabello R, Bonifaz A, Romero-Feregrino R, Sánchez CJ, Linares Y, Zavala JT, Romero LC, Romero-Feregrino R, Vega JT. Disseminated sporotrichosis. *BMJ Case Rep.* 2011;doi: 10.1136/bcr.10.2010.3404.
31. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H 2000. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000;68:3696-3703.
32. Teixeira PA, de Castro RA, Ferreira FR, Cunha MM, Torres AP, Penha CV, Rozental S, Lopes-Bezerra LM. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med Mycol.* 2010;48:687-95.
33. Torres-Rodríguez JM, Palácio-Hernanz A, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M. Esportricosis. In *Micología Médica*, Barcelona, Marron S.A. 1993; Cap. 16, p. 157-166.
34. van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3394-3400.
35. van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2014-20.
36. Yap FBB. Disseminated cutaneous sporotrichosis in an immunocompetent individual. *Int J Infect Dis.* 2011;15: 727–9.

Table 1. Variation in melanin content, expressed as absorbance, after subculture on minimal medium and minimal medium with L-DOPA.

Isolates	Absorbance (260 nm)	
	MM	MML
Sb 01	0.701	1.495
Sb 02	0.690	1.398
Sb 03	0.691	1.450
Ss 01	0.530	1.678
Ss 02	0.561	1.691
Ss 03	0.570	1.680

Abbreviations: MM, minimal medium; MML, minimal medium with L-DOPA.

Table 2. Minimal inhibitory concentrations of amphotericin B and itraconazol against *S. brasiliensis* and *S. schenckii* sensu stricto isolates cultivated in different media.

Isolates	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	AMB MM/MML	ITC MM/MML
Sb01	0.25/0.25	0.25/0.5
Sb02	0.5/0.5	0.5/0.5
Sb03	0.5/0.5	0.5/0.5
Ss01	0.25/0.5	1/2
Ss02	1/1	0.5/1
Ss03	1/1	0.25/0.25

Abbreviations: MIC, minimal inhibitory concentrations; AMB, amphotericin B; ITC, itraconazole; MM, minimal medium; MML, minimal medium with L-DOPA.

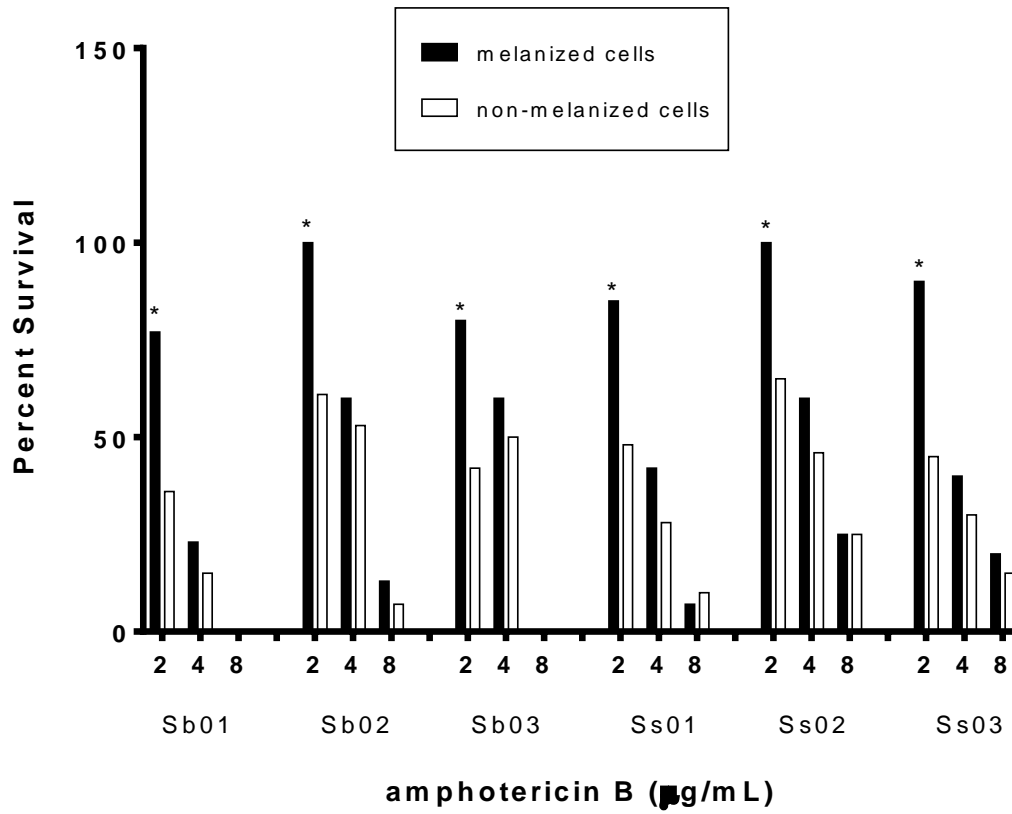


Fig. 1. Amphotericin B killing assay. The rates of survival of yeast cells (*S. brasiliensis* [Sb 01, Sb 02, Sb 03] and *S. schenckii* sensu stricto [Ss 01, Ss 02, Ss 03]) grown in minimal medium (MM), and minimal medium with L-DOPA (MML) after exposure to various concentrations of amphotericin B for 2 hours were compared to those of fungal cells incubated in PBS. P values were calculated by comparing melanized groups with their respective non-melanized group using the Student's *t* test. *, $p < 0.001$. Similar results were obtained in two separate experiments.

5. DISCUSSÃO

A TFD aplicada ao tratamento das micoses é ainda incipiente ou experimental. Entretanto, conforme relatado por Donnelly et al (2007) no ano de 1924, Chavarría e Clark mostraram a atividade da eosina associada com luz ultravioleta frente a lesões induzidas por *Trichophyton acuminatum* em porquinhos-da-índia. Em 1962, Dickey evidenciou efeito fungicida da TFD usando vermelho neutro, azul de metileno e outros corantes em *Candida albicans* e *T. mentagrophytes*. Não há relatos comunicando o desenvolvimento de resistência à TFD aplicada às micoses e o tratamento não está associado com efeitos mutagênicos ou genotoxicidade em ambas as células fúngicas e humanas (DONNELLY *et al.*, 2007).

A maioria dos trabalhos publicados está centrada no tratamento de candidoses. Vários estudos têm demonstrado a eficácia da TFD, utilizando um número crescente de agentes fotossensibilizadores e de fontes de luz de ativação, para a inativação de espécies de *Candida* (BLISS *et al.*, 2004; DOVIGO *et al.*, 2009; ROSELLO *et al.*, 2005; TEICHERT *et al.*, 2002; POWDERLY *et al.*, 1999). Isolados de *Candida* de pacientes aids que apresentaram perfil de resistência para anfotericina B e fluconazol foram igualmente sensíveis à TFD (MANG *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, investigações com fungos filamentosos vêm ganhando relevância devido aos promissores resultados obtidos. Os fungos causadores de dermatofitoses, especialmente *T. rubrum*, têm sido mais extensivamente estudados (BALTAZAR *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2012; SMIJS, *et al.*, 2012). Estudos na forma de ensaio clínico já demonstraram a eficácia desta terapia para esta micose superficial (SOTIRIOU *et al.*, 2010). Recentemente foram realizados estudos com agentes de cromoblastomicose, doença micótica que envolve o tecido cutâneo e subcutâneo. Utilizando o azul de metileno como agente fotossensibilizador, a TFD foi capaz de reduzir a área lesada em 80-90% (LYON *et al.*, 2011). Em 2012, o mesmo grupo demonstrou *in vitro* a atividade antifúngica da fototerapia frente a *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*, dois frequentes agentes de cromoblastomicose (LYON *et al.*, 2013). Os melhores resultados foram obtidos quando o azul de metileno era empregado como agente fotossensibilizante na concentração de 32 µg/mL.

O sucesso da terapia fotodinâmica na cromoblastomicose abriu a perspectiva de também avaliar seu efeito sobre a esporotricose, a mais prevalente das micoses subcutâneas no Brasil e em muitas áreas tropicais e subtropicais. Outra justificativa para este estudo

fundamenta-se em que o iodeto de potássio, apesar da excelente atividade antifúngica na esporotricose, não é mais considerado o tratamento de eleição em função de seus efeitos adversos. O consenso internacional recomenda o itraconazol; todavia, cabe ressaltar que o itraconazol tem sua atividade ameaçada pelo reconhecimento de que espécies como *S. pallida* (*S. albicans*), *S. globosa* e *S. mexicana* as quais podem apresentar resistência a este triazólico (KAUFFMAN *et al.*, 2007). Os resultados até aqui obtidos demonstram que a TFD tem atividade sobre os agentes de esporotricose o que a recomenda para a fase de estudos experimentais *in vivo*. Em concentrações mais baixas do que no estudo com agentes de cromoblastomicose (LYON *et al.*, 2013), no nosso estudo (NUNES MARIO *et al.*, 2014), o azul de metileno foi capaz de reduzir o crescimento de *Sporothrix* spp de forma significativa. Apesar de apresentarem variações na suscetibilidade aos antifúngicos convencionais, todas as espécies do Complexo *Sporothrix schenckii* avaliadas foram sensíveis à TFD.

A antifungoterapia com base na combinação de fármacos é outra opção terapêutica quando o paciente não responde à monoterapia convencional ou quando seus efeitos tóxicos determinem a redução da dose de fármacos, como é o caso da anfotericina B ou itraconazol (CHAMILO & KONTOYIANNIS, 2006). Devido às limitações dos testes de combinação *in vitro*, o modelo animal é, ainda, o método de preferência por levar em conta fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Entretanto, no presente estudo os valores de ICIF na combinação de posaconazol e anfotericina B tiveram valores mais reduzidos para *S. schenckii* em comparação com *S. brasiliensis*, ao mesmo tempo em que a combinação *in vivo* foi mais eficaz para aquela espécie. A espécie *S. brasiliensis* tem sido apontada como a mais virulenta do complexo, e a menos sensível aos tratamentos convencionais (ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009; MARIMON *et al.*, 2008). Há diversos relatos de casos de esporotricose sistêmica com desfechos fatais (HARDMAN *et al.*, 2005; YELVERTON *et al.*, 2006; FONSECA-REYES *et al.*, 2007), apesar da utilização de tratamento antifúngico ter sido o recomendado. Isto torna conveniente e necessária a exploração por novas alternativas terapêuticas. Em infecção experimental, o posaconazol foi eficaz contra *S. brasiliensis* e *S. schenckii* na dose de 5 mg/kg (FERNÁNDEZ-SILVA *et al.*, 2012). No mesmo estudo, foi demonstrado que doses maiores de posaconazol, como 10 e 20 mg/kg, não melhoram a eficácia do tratamento em comparação com a dose de 5 mg/kg. No presente estudo, doses de 5 mg/kg resultaram em maior eficácia que 2,5 mg/kg, o que está de acordo com o estudo anterior (FERNÁNDEZ-SILVA *et al.*, 2012). Em um caso clínico de esporotricose disseminada a terapia com anfotericina B associada a itraconazol resultou em falha devido à insuficiência renal e intolerância gastrointestinal do paciente aos fármacos (BUNCE *et al.*,

2012). O tratamento foi substituído por anfotericina B e posaconazol, seguido de manutenção com posazonazol, o que resultou em melhora clínica. Este relato demonstra os efeitos positivos do posaconazol, sozinho ou combinado com anfotericina B, no tratamento da esporotricose disseminada. No presente estudo, foi evidenciado que a eficácia do posaconazol pode ser melhorada pela combinação com anfotericina B em baixas doses, uma alternativa que merece atenção, especialmente para pacientes com esporotricose disseminada que não respondem ao tratamento com itraconazol ou quando doses elevadas de anfotericina B são contraindicadas.

O presente estudo não foi capaz de demonstrar a interferência da melanização nas cepas do Complexo *Sporothrix schenckii* quanto a sua suscetibilidade aos antifúngicos, através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Este achado, todavia, está de acordo com trabalhos realizados com *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* (VAN DUIN *et al.*, 2002; 2004; IKEDA *et al.*, 2003). Van Duin et al (2002) relataram que a técnica de microdiluição pode não retratar a interferência da melanina devido à ausência no meio de cultura de substratos para a melanização.

O ensaio de tempo de morte evidenciou que a melanização, em geral, protegeu os isolados do Complexo *Sporothrix schenckii* frente anfotericina B, principalmente nas menores concentrações testadas. Estudos anteriores utilizando a mesma técnica também demonstraram que a melanização foi capaz de proteger isolados de *C. neoformans*, *H. capsulatum* e *Wangiella dermatitidis* contra anfotericina B (VAN DUIN *et al.*, 2002; IKEDA *et al.*, 2003; PAOLO JR *et al.*, 2006). Os autores sugerem que a melanina fúngica, em seu papel antioxidante, pode se ligar à molécula de anfotericina B reduzindo sua atividade. Além de se ligar à célula fúngica e formar poros, a anfotericina B é também um potente imunomodulador (NOSANCHUK & CASADEVALL, 1999). Assim, sua ligação à melanina do fungo pode também diminuir o efeito do fármaco sobre fatores do hospedeiro como ativação de células T e macrófagos. Somado a isso, a melanina também é uma molécula imunologicamente ativa com efeito anti-inflamatório (AVRAMIDIS *et al.*, 1998; MOHAGHEGHPOUR *et al.*, 2000). Um estudo experimental mostrou que a melanização da célula fúngica pode afetar a patogênese da esporotricose, uma vez que isolados pigmentados mostraram maior habilidade em invadir tecidos do que cepas mutantes albinas (MADRID *et al.*, 2010).

Devido à anfotericina B representar a terapia de eleição para o tratamento de esporotricose sistêmica ou disseminada, os achados do presente estudo são particularmente importantes ao analisar a eficácia dos agentes antifúngicos. Pacientes gravemente imunocomprometidos e que desenvolvem esporotricose disseminada requerem tratamento

com altas doses de anfotericina B e por longo período de tempo. Especialmente nesses casos, a melanina pode ser um fator de proteção da célula fúngica, diminuindo a atividade da anfotericina B contra a esporotricose. O aprofundamento de estudos que avaliem a utilização de inibidores de melanina é pertinente para os casos de tratamento com anfotericina B ou mesmo para tentar melhorar a atividade de fármacos menos tóxicos na esporotricose.

6. CONCLUSÕES

- Com base nos dados aqui relatados, a TFD através da associação do azul de metileno com o laser inibiu o crescimento de *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii*. Frente à emergência de espécies resistentes ao itraconazol *in vitro* torna-se relevante a busca por alternativas terapêuticas para a esporotricose. Alicerçados nos resultados aqui apresentados, a TFD merece maiores investigações como possibilidade terapêutica a esta micose, pela suscetibilidade que os agentes etiológicos manifestaram *in vitro*.
- Neste estudo foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que a eficácia do tratamento com posaconazol 5 mg/Kg pode ser melhorada em associação com anfotericina B em baixas doses, sendo uma alternativa que merece atenção, especialmente em pacientes com esporotricose disseminada que não respondem ao tratamento convencional ou quando itraconazol ou elevadas doses de anfotericina B são contraindicadas.
- Os resultados também sugerem, através de ensaios de tempo de morte, que a melanização dos isolados de *Sporothrix* pode alterar a atividade da anfotericina B. A técnica de microdiluição não foi capaz de demonstrar essa interferência. Esses relatos alertam para uma possível emergência de resistência no tratamento da esporotricose invasiva, já que a anfotericina B é o tratamento de escolha para esses casos.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; GUERRA, R. O.; VIEIRA, B. J.; CUNHA, R. M. C. Oral manifestation of sporotrichosis in AIDS patients. **Oral Diseases**, 7: 134-6, 2001.
- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, 74: 656-69, 2001.
- ALBORNOZ, M. B.; MENDONZA, M.; TORRES, E. D. Growth temperatures of isolates of *Sporothrix schenckii* from disseminated and fixed cutaneous lesions of sporotrichosis. **Mycopathologia**, 95: 81-3, 1986.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; FIALHO MONTEIRO, P. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, 11: 554-62, 2009.
- ALVES, S. H.; BOETTCHER, C. S.; OLIVEIRA, D. C.; ALVES, G. R. T.; SGARIA, M. A.; THADEU, P.; OLIVEIRA, L. T.; SANTURIO, J. M. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43: 523-5, 2010.
- 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: 229- 37, 2004.
- ANGELOVA, M. B.; PASHOVA, S. B.; SPASOVA, B. K.; VASSILEV, S. V.; SLOKOSKA, L. S. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycological Research**, 109: 150-8, 2005.
- ARNOLD, W. N.; MANN, L. C.; SAKAI, K. H.; GARRISON, R. G.; COLEMAN, P. D. Acid phosphatases of *Sporothrix schenckii*. **Journal of General Microbiology**, 132: 3421-32, 1986.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYI, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, 15: 651-5, 2009.

AVRAMIDIS, N., KOUROUNAKIS, A.; HADJIPETROU, L.; SENCHUK, V. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of grape melanin. Inhibitory effects on paw edema and adjuvant induced disease. **Arzneimittelforschung**, 48: 764–71, 1998.

BALTAZAR, L. M.; SOARES, B. M.; CARNEIRO, H. C.; AVILA, T. V.; GOUVEIA, L. F.; SOUZA, D. G.; FERREIRA, M. V.; PINOTTI, M.; SANTOS, D. A.; CISALPINO, P. S. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68: 354-61, 2013.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, T. M. P.; do VALLE, A. C.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, 38: 529-35, 2004.

BASS, D. A.; PARSE, J. A. W.; DECHATELETI, L. R.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**, 130: 1910–17, 1983.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Reviews Phytopathology**, 24: 411-51, 1986.

BERG, D.; YODIM, M. B.; RIEDERER, P. Redox imbalance. **Cell Tissue Research**, 318: 201-13, 2004.

BLASI, E.; PITZURRA, L.; PULITI, M.; CHIMIENTI, A. R.; MAZOLLA, R.; BARLUZZI, R.; BISTONI, F. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. **Infection and Immunity**, 63: 1806–10, 1995.

BLISS, J. M.; BIGELOW, C. E.; FOSTER, T. H.; HAIDARIS, C. G. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48: 2000-6, 2004.

BOLARD, J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? **Biochimica et Biophysica Acta**, 864: 257-304, 1986.

BRITO, M. M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N.; RAIBOLT, P. S.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. P.; SCHÄFFER, G. M.; BORBA, C. M. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Medical Mycology**, 45: 721-9, 2007.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B.; ZANIN, F. A. A. Dosimetria da laserterapia de baixa intensidade na Odontologia. **Revista Brasileira de Laser em Medicina**, 1: 30-2, 2007.

BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar and peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. **Clinical and Experimental Immunology**, 102: 65-70, 1995.

BUNCE, P. E.; YANG, L.; CHUN, S.; ZHANG, S. X.; TRINKAUS, M. A.; MATUKAS, L. M. Disseminated sporotrichosis in a patient with hairy cell leukemia treated with amphotericin B and posaconazole. **Medical Mycology**, 50: 197-201, 2012.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, 44: 115-36, 1998.

CALABRESE, E. J.; CANADA, A. T. Catalase: its role in xenobiotic detoxification. **Pharmacology and Therapeutics**, 44: 297-307, 1989.

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.

CARLOS, I. Z.; SASSÁ, M. F.; SGARBI, D. B.; PLACERES, M. P.; MAIA D. G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, 168: 1-10, 2009.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 1: 279-93, 2004.

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Fármacos antimicrobianos: considerações gerais. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A. G. (Edit.) **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 1436p, 1996.

CHAMILOS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resistance Update**, 8: 344-58, 2006.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, 37: 949-62, 1999.

CHAVARRIA, A. P.; CLARK, J. H. The reaction of pathogenic fungi to ultraviolet light. **American Journal of Hygiene**, 4: 639-49, 1924.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of moulds; Approved Standard: document M38-A2. Wayne, P.A, **CLSI**, 2008.

CONTI DÍAZ, I. A.; CIVILA, E.; GEZUELE, E.; LOWINGER, M.; CALEGARI, L.; SANABRIA, D.; FUENTES, L.; DA ROSA, D.; ALZUETA, G. Treatment of human cutaneous sporotrichosis with itraconazole. **Mycoses**, 35: 153-6, 1992.

CORBELLINI, V. A.; ANICET, K. L.; SCROFERNEKER, M. L. Imunologia dos fungos. In: **Notas de imunologia** ,1ª ed., Porto Alegre, Ed. Universidade/UFRGS, cap. 21, p. 317-23, 1996.

CORREA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; PALAZZO, S. Morphogenesis of *Sporothrix schenckii* “in vivo” and “in vitro” through the method of viability by fluorescence. **Applied Fluorescence Technology**, 3: 1-8, 1991.

COZENS, R. M. Formulation of compounds and determination of pharmacokinetic parameters. In: S.M.A., Zak, Otto. (Eds.), **Handbook of Animal Models of Infection**. Academic Press, San Diego, CA, 1999.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide neurotoxicity. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 10: 179–90, 1996.

DENNING, D. W. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. **Clinical and Infectious Diseases**, 23, 608–15, 1996.

DIAS, N. M.; OLIVEIRA, M. M. E.; PORTELA, M. A.; SANTOS, C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; LIMA, N. Sporothichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerging Infectious Diseases**, 17: 1975-6, 2011.

DICKEY, R. F. Investigative studies in fungicidal powers of photodynamic action. **Journal of Investigative Dermatology**, 39: 7-19, 1962.

DONNELLY, R. F.; MC CARRON, P. A.; TUNNEY, M. M.; WOOLFSON, A. D. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, 86: 59-69, 2007.

DOUGHERTY, T. J.; MARCUS, S. L. Photodynamic therapy: review. **European Journal of Cancer**, 28A: 1734-42, 1992.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; OLIVEIRA, M.; GARCIA, E.; GIAMPAOLO, E. T.; VERGANI, C. E.; BAGNATO, V. S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, 54: 123–30, 2009.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, 82:47-95, 2002.

DUFFY, S.; SO, A.; MURPHY, T. H. Activation of Endogenous Antioxidant Defenses in Neuronal Cells Prevents Free Radical-Mediated Damage. **Journal of Neurochemistry**, 71: 69-78, 1998.

DUPONT, B.; DROUHET, E. *In vitro* synergy and antagonism of antifungal agents against yeast-like fungi. **Postgraduate Medical Journal**, 55: 683-6, 1979.

EDMOND, M. B.; WALLACE, S. E.; MCCLISH, D. K.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. **Clinical and Infectious Diseases**, 29: 239–244, 1999.

ERNST, E. J.; KLEPSER, M. E.; PFALLER, M. A. *In vitro* interaction of fluconazole and amphotericin B administered sequentially against *Candida albicans*: effect of concentration and exposure time. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 32: 205-10, 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: 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: 563-9, 2000.

FERNANDEZ, J. M.; BILGIN, M. D.; GROSSWEINER, L. I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, 37: 131-40, 1997.

FERNÁNDEZ-SILVA, F.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; GUARRO, J. Efficacy of posaconazole in murine experimental sporotrichosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56: 2273-7, 2012.

FIGUEIREDO, C. C.; LIMA, O. C.; CARVALHO, L.; LOPEZ-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial Pathogenesis**, 36: 177-88, 2004.

FINDLAY, G. H.; VISMER, H. F. Studies in sporotrichosis: fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. **Mycopathologia**, 96: 115-22, 1986.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 408: 239-47, 2000.

FISCHMAN, O.; BENTUBO, H. D. L.; CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M.; PIRES, D. C.; PETRI, V. Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to itraconazole. **Mycoses**, 55: 207-8, 2012.

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 of Dermatology**, 40: 318-22, 2001.

FONSECA-REYES, S.; LOPEZ MALDONADO, F. J.; MIRANDA-ACKERMAN, R. C.; VELEZ-GOMEZ, E.; ALVAREZ-INIGUEZ, P.; VELARDE-RIVERA, F. A.; ASCENSIO-ESPARZA, E. P. Extracutaneous sporotrichosis in a patient with liver cirrhosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, 24: 41-3, 2007.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **American Journal of Medicine**, 97: 5S-13S, 1994.

FREITAS, D. F.; DE SIQUEIRA HOAGLAND, B.; DO VALLE, A. C.; FRAGA, B. B.; DE BARROS, M. B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; CUZZI, T.; ROSALINO, C. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, 50: 170-8, 2012.

GORI, S.; LUPETTI, A.; MOSCATO, G.; PARENTI, M.; LOFARO, A. Pulmonary sporotrichosis with hyphae in a human immunodeficiency virus-infected. **Acta Cytologica**, 41: 519-21, 1997.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology**, 12: 454-500, 1999.

HADDAD Jr., V.; MIOT, H.D.; BARTOLI, L. D.; CARDOSO, A. C.; CAMARGO, R. M. P.; Localized lymphatic sporotrichosis after fish-induced injury (*Tilapia* sp.). **Medical Mycology**, 40: 425-7, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**, 2^a ed, New York: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, 59: 1609–23, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4^a ed., Oxford University Press, Oxford, 2007.

HANISH SINGH, J. C.; ALAGARSAMT, V.; SATHESH KUMAR, S.; NARSIMHA REDDY, Y. Neurotransmitter metabolic enzymes and antioxidant status on Alzheimer's disease induced mice treated with *Alpinia galanga* (L.) Willd. **Phytotherapy Research**, 25: 1061-7, 2011.

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: e73-77, 2005.

HAY, R. J. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycosis. **British Journal of Dermatology**, 141: 36-40, 1999.

HAYASHI, M. Oxidative stress in developmental brain disorders. **Neuropathology**, 29: 1-8, 2009.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, 9: 469-88, 1996.

HOWARD, D. H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. **Journal of Bacteriology**, 81: 464-9, 1961.

HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in Cancer Research and Treatment**, 4: 283-93, 2005.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology and Immunology**, 47: 271-7, 2003.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, 13: 708-17, 2000.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, 9: 515-40, 1990.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**, New York: Oxford University Press, 1997.

KAN, V. L.; BENNETT, J. E. Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 32: 1619-23, 1988.

KAUFFMAN, C. A.; HAJJEH, R.; CHAPMAN, S. W. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. For the Mycoses Study Group. Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, 30: 684-7, 2000.

KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P. G.; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical and Infectious Diseases**, 45: 1255-65, 2007.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, 30: 620-50, 2002.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, 66: 89-106, 2002.

KONTOYIANNIS, D. P.; BODEY, G. P. Invasive aspergillosis in 2002: an update. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 21: 161-72, 2002.

KUDEKEN, N.; KAWAKAMI, K.; SAITO, A. Different susceptibilities of yeasts and conidia of *Penicillium marneffeii* to nitric oxide (NO)-mediated fungicidal activity of murine macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, 112: 287–93, 1998.

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: 376-80, 1988.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Subcutaneous and Deep Mycoses - Sporotrichosis. In: **Medical Mycology**, Malvern: Lee & Febiger, Cap. 26, p. 707-29, 1992.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Identificação dos fungos. **Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 1ª ed., São Paulo, Sarvier/Fapesp, Cap. 19, p. 349-53, 1998.

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: 143-58, 2003.

LARSSON, C. E.; GONÇALVES, M. A.; ARAÚJO, V. C.; DAGLI, M.L.Z.; CORREA, B.; FAVA-NETO, C. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 31: 351-8, 1989.

LEWIS, R. E.; LUND, B. C.; KLEPSE, M. E.; ERNST, E.J.; PFALLER, M. A. Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic *in vitro* mycotic infection model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42: 1382-6, 1998.

LEWIS, R. E., KONTOYIANNIS, D. P. Rationale for combination antifungal therapy. **Pharmacotherapy**, 21, 149S–164S, 2001.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49: 345-51, 2002.

LIMA, R. F.; SCHÄFFER, G.V.; BORBA, C. M. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. **Microbes Infection**, 5: 933-8, 2003.

LIN, S., SCHRANZ, J., TEUTSCH, S. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. **Clinical and Infectious Diseases**, 32: 358–66, 2001.

LIN, A. M.; PING, Y. H.; CHANG, G. F.; WANG, J. Y.; CHIU, J. H.; KUO, C. D.; CHI, C. W. Neuroprotective effect of oral S/B remedy (*Scutellaria baicalensis* Georgi and *Bupleurum scorzonerifolium* Willd) on iron-induced neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic system of rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, 134: 884-91, 2011.

LLOYD, K. O.; BITOON, M. A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **The Journal of Immunology**, 107: 663-71, 1971.

LONDERO, A. T.; CASTRO, R.M.; FISCHMAN, O. Two cases of sporotrichosis in dog in Brazil. **Sabouraudia**, 3: 273-4, 1964.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 78: 293-308, 2006.

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: 541-5, 1999.

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: 353-6, 2004.

LOUIE, A.; BANERJEE, P.; DRUSANO, G. L.; SHAYEGANI, M.; MILLER, M. H. Interaction between fluconazole and amphotericin B in mice with systemic infection due to fluconazole-susceptible or –resistant strains of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43: 2841-7, 1999.

LYON, J. P.; AZEVEDO, C. M. P. S.; MOREIRA, L. M.; LIMA, C. J.; RESENDE, M. A. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, 172: 293-7, 2011.

LYON, J. P.; MOREIRA, L. M.; CARVALHO, V. S.; SANTOS, F. V.; LIMA, C. J.; RESENDE, M. A. In vitro photodynamic therapy against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii*. **Mycoses**, 56: 157-61, 2013.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, 23: 237-43, 2000.

MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; GUIM, T. N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F.; NOBRE, M. DE O.; ARAÚJO MEIRELES, M. C. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes and Infection**, 12: 162-5, 2010.

MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Mycopathologia**, 173: 265-73, 2012.

MAHDY, K.; SHAKER, O.; WAFAY, H.; NASSAR, Y.; HASSAN, H.; HUSSEIN A. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 3: 31-42, 2012.

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: 11-9, 2006.

MANG T. S.; MIKULSKI, L.; HALL, R. E. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 7: 98-105, 2010.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; LÁZERA, M.S.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, 44: 3251-6, 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: 3198-206, 2007a.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 52: 732-4, 2007b.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, 46: 621-5, 2008.

MARQUES, A. S.; FRANCO, S. R.V. S.; CAMARGO, R. M. P.; DIAS, L. D. F.; HADDAD Jr, V.; FABRIS, V. E. Sporotrichosis in the domestic cat (*Felis catus*): human transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 35: 327-30, 1993.

MARTIN, E.; MAYER, F.; BHAKDI, S. Antagonistic effects of fluconazole and 5-fluorocytosine on candidacidal action of amphotericin B in human serum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 38: 1331-8, 1994.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biological Chemistry**, 263: 17205-8, 1988.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, 52: 711-60, 1983.

MOHAGHEGHPOUR, N.; WALEH, N.; GARGER, S. J.; DOUSMAN, L.; GRILL, L.; TUSÉ, D. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. **Cellular Immunology**, 199: 25-36, 2000.

MORGAN, M.; REVES, R. Invasive sinusitis due to *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, 23: 1319-20, 1996.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B. L.; AISEN, P.; HAY, R. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 71: 4026-33, 2003.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97: 8841-8, 2000.

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

NEWMAN, S. L. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **Trends in Microbiology**, 7: 67-71, 1999.

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: 36-41, 2002.

NOBRE, M. O.; ANTUNES, T. A.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO, L. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32: 119-23, 2004.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, 31: 1287-312, 2001.

NOSANCHUK, J. D.; CLEARE, W.; FRANZOT, S. P.; CASADEVALL, A. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43: 233-9, 1999.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, 5: 203-23, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50: 3519-28, 2006.

NUNES MARIO, D. A.; DENARDI, L. B.; BRAYER PEREIRA, D. I.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. In vitro photodynamic inactivation of *Sporothrix schenckii* complex species. **Medical Mycology**, 52: 770-3, 2014.

NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, 73: 1-28, 2004.

ODDS, F. C. Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 22: 763-770, 1982.

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

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95: 351–8, 1979.

OLIVEIRA, D. C.; LOPES, P. G.; SPADER, T. B.; MAHL, C. D.; TRONCO-ALVES, G. R.; LARA, V. M.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, 49: 3047-9, 2011.

O'REILLY, T., CLEELAND, R., SQUIRES, E. L. Evaluation of antimicrobials in experimental animal models. In: Zak, O., Sande, M. (Eds.), **Handbook of Animal Models of Infection**, 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1996.

ORTH, K.; BECK, G.; GENZE, F.; RÜCK, A. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, 57: 186-92, 2000.

PAOLO, W. F. JR.; DADACHOVA, E.; MANDAL, P.; CASADEVALL, A.; SZANISZLO, P. J.; NOSANCHUK, J. D. Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella [Exophiala]* dermatitidis on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. **BMC Microbiology**, 6: 55, 2006.

PARK, J. S.; PARK, M. K.; OH, H. J.; WOO, Y. J.; LIM, M. A.; LEE, J. H.; JU, J. H.; JUNG, Y. O.; LEE, Z. H.; PARK, S. H.; KIM, H. Y.; CHO, M. L.; MIN, J. K. Grape-seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis. **Plos One**, 7: e51377, 2012.

PASTORE, A.; PIEMONTE, F.; LOCATELLI, M.; RUSSO, A. L.; GAETA, L. M.; TOZZI, G.; FEDERICI, G. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. **Clinical Chemistry**, 47: 1467–9, 2003.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D.; KITADA, A. A.; BOECHAT, J. S.; VIANA, P. G.; SCHUBACH, T. M. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 47: 392-3, 2014.

PIJPER, A.; PULLINGER, B. D. A. Outbreak of sporotrichosis among South African miners. **Lancet**, 2: 914, 1927.

PINHEIRO, A. L. B. Bases físicas dos lasers. In: BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, p.27-44, 1998.

POWDERLY, W. G.; MAYER, K. H.; PERFECT, J. R. Diagnosis and treatment of oropharyngeal candidiasis in patients infected with HIV: a critical reassessment. **AIDS Research and Human Retroviruses**, 15: 1405-12, 1999.

RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, 27: 269-74, 1990.

READ, S. I.; SPERLING, L. C. Feline sporotrichosis transmission to man. **Archives of Dermatology**, 188: 429-31, 1982.

RODRIGUES, G. B.; FERREIRA, L. K.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 5: 89-94, 2012.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, 68: 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: 451-59, 2005.

ROSELLO, Y. C.; FOSTER, T. H.; PEREZ-NAZARIO, N.; MITRA, S.; HAIDARIS, C. G. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49: 4288-95, 2005.

RYDER, N. S. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. **Mycoses**, 42: 115-9, 1999.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P.; YEUNG, K. W. Evaluation of polyene-azole antagonism in liquid cultures of *Candida albicans* using an automated turbidometric method. **Chemotherapy**, 47: 279-291, 2001.

SANATI, H.; RAMOS, C. F.; BAYER, A. S.; GHANNOUM, M. A. Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 41: 1345-1348, 1997.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. **Bulletin of Johns Hopkins Hospital**, 9: 286-90, 1898.

SCHEVEN, M.; SCHWEGLER, F. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeasts depend on azole lipophilia for special test conditions *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39: 1779-83, 1995.

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

SETHI, K. K.; SCHWARZ, J. Experimental cutaneous sporotrichosis. **Mykosen**, 8: 128–35, 1965.

SGARBI, D. B.; DA SILVA, A. J.; CARLOS I. Z.; SILVA, C. L.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO C. S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, 139: 9–14, 1997.

SHARKEY-MATHIS, P. K.; KAUFFMAN, C. A.; GRAYBILL, J. R.; STEVENS, D. A.; HOSTETLER, J. S.; CLOUD, G.; DISMUKES, W. E. Treatment of sporotrichosis with itraconazole. NIAID Mycoses Study Group. **American Journal of Medicine**, 95: 279-85, 1993.

SHIMOKAWA, O.; NAKAYAMA, H. Increased sensitivity of *Candida albicans* cells accumulating 14 alpha-methylated sterols to active oxygen: possible relevance to *in vivo* efficacies of azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 36: 1626-1629, 1992.

SHIN, S.; PYUN, M. S. Anti-*Candida* effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. **Phytotherapy Research**, 18: 827-830, 2004.

SILVA, J. P.; COUTINHO, O. P. Free radicals in the regulation of damage and cell death – basic mechanisms and prevention. **Drug Discoveries Therapeutics**, 4: 144-67, 2010.

SMIJS, T.; DAME, Z.; DE HAAS, E.; AANS, J. B.; PAVEL, S.; STERENBORG, H. Photodynamic and nail penetration enhancing effects of novel multifunctional photosensitizers designed for the treatment of onychomycosis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2013. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/php.12196/pdf>> Acesso em 10 nov. 2013.

SOTIRIOU, E.; KOUSSIDOU-EREMONTI, T.; CHAIDEMENOS, G.; APALLA, Z.; IOANNIDES, D. Photodynamic therapy for distal and lateral subungual toenail onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*: Preliminary results of a single-centre open trial. **Acta Dermato-Venereologica**, 90: 216-7, 2010.

SUD, I. J.; FEINGOLD, D. S. Effect of ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 23: 185-187, 1983.

SUGAR, A. M. Interactions of amphotericin B and SCH 39304 in the treatment of experimental murine candidiasis: lack of antagonism of a polyene-azole combination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 35: 1669-71, 1991.

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

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Medical Mycology**, 39: 295-8, 2001.

TEICHERT, M. C.; JONES, J. W.; USACHEVA, M. N.; BIEL, M. A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, 93: 155-60, 2002.

TEIXEIRA P. A.; DE CASTRO R. A.; FERREIRA F. R.; CUNHA M. M.; TORRES A. P.; PENHA C. V.; ROZENTAL S.; LOPES-BEZERRA L. M. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Medical Mycology**, 48: 687-95, 2010.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**, 3^a ed, London: Taylor & Francis, 2000.

TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA NETO, C. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles and clinical use. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 84: 445-59, 2009.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; PALÁCIO-HERNANZ, A.; NEGRONI-BRIZ, R.; PEREIRO-MIGUENS, M. Esporotricosis In: **Micología Médica**, Barcelona, Marron S.A., Cap. 16, p. 157-66, 1993.

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: 3952-4, 2005.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46: 3394-400, 2002.

VAN DUIN, D.; CLEARE, W.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48: 2014-20, 2004.

VAN ETTEN, E. W.; VAN DE RHEE, N. E.; VAN KAMPEN, K. M.; BAKKER-WOUDENBERG, G. I. A. Effects of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 35:2275-81, 1991.

VAZQUEZ, J. A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier – are we there yet? **Medical Mycology**, 41: 355-68, 2003.

WAINWRIGHT, M.; GIDDENS, R. M. Phenothiazinium photosensitizers: choices in synthesis and application. **Dyes Pigments**, 57: 245-57, 2003.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infection and Immunity**, 62: 3004-5, 1994.

WILSON, B. D.; MANG, T. S.; COOPER, M.; STOLL, H. Use of photodynamic therapy for the treatment of extensive basal cell carcinomas. **Facial Plastic Surgery**, 6: 185-9, 1989.

WILSON, B. D.; MANG, T. S.; STOLL, H.; JONES, C.; COOPER, M.; DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy for the treatment of basal cell carcinoma. **Archives of Dermatology**, 128: 1597-601, 1992.

XAVIER, M. O.; BITTENCOURT, L. R.; SILVA, C. M.; VIEIRA, R. S.; PEREIRA, H. C. Atypical presentation of sporotrichosis: report of three cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 46: 116-8, 2013.

XUE, S.; GU, R.; WU, T.; ZHANG, M.; WANG, X. Oral potassium iodide for the treatment of sporotrichosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 7: CD006136, 2009.

YELVERTON, C. B.; STETSON, C. L.; BANG, R. H.; CLARK, J. W.; BUTLER, D. F. Fatal sporotrichosis. **Cutis**, 78: 253-256, 2006.

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

YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONJIAN, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, 9: 19-21, 1991.

ZHU, Z.; TANG, Z.; PHILLIPS, J. A.; YANG, R.; WANG, H.; TAN, W. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, 130: 10856-7, 2008.

ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**, 35: 3127-36, 2008.