

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

**Gabriela Seibert**

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* DE ITRACONAZOL E**  
**ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS FRENTE À**  
***SPOROTHRIX SCHENCKII SENSU STRICTO* E *SPOROTHRIX***  
***BRASILIENSIS***

**Dissertação de mestrado**

**URUGUAIANA**

**2019**

**GABRIELA SEIBERT**

**INTERAÇÃO *IN VITRO* DE ITRACONAZOL E ANTI-  
INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS FRENTE À *SPOROTHRIX*  
*SCHENCKII SENSU STRICTO* E *SPOROTHRIX BRASILIENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cheila D. O. Stopiglia

**Uruguaiana**

**2019**

**GABRIELA SEIBERT**

**INTERAÇÃO *IN VITRO* DE ITRACONAZOL E ANTI-  
INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS FRENTE À *SPOROTHRIX*  
*SCHENCKII SENSU STRICTO* E *SPOROTHRIX BRASILIENSIS*.**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cheila D. O. Stopiglia

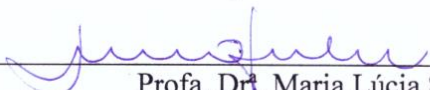
Área de concentração: Farmácia

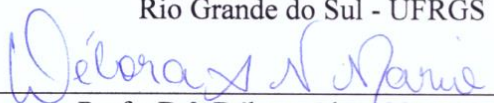
Dissertação defendida e aprovada em: 22 de março de 2019.

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cheila Denise Ottonelli Stopiglia  
Orientadora

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNIPAMPA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lúcia Scroferneker  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Alves Nunes Mario  
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

*“Pais, palavra curta de profundo significado, almas unidas, corações atados, fonte de inspiração e ensinamentos, mesmo quando longe, juntos em pensamento, exemplo de vida a ser seguido ontem, hoje, amanhã e até o infinito, meu amor por vocês jamais poderá ser medido.”*

*Autor desconhecido.*

## AGRADECIMENTO

À Deus por ter me dado saúde, força e sabedoria para sempre seguir em frente e alcançar meus objetivos.

Em especial ao meu pai Manoel Sávio Seibert, meu anjo no céu, que me ensinou a viver com dignidade, honestidade, amor, respeito e sempre incentivou a correr atrás dos meus sonhos. Pai, amor além da vida!

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia, por ter confiado em mim, por todo o conhecimento transmitido, pelos valorosos exemplos, pela dedicação, incentivo, pela amizade e apoio em todos os momentos.

À minha mãe Marli, mulher forte, guerreira, batalhadora, obrigada pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã Fabiane, minha companheira de vida, que esta sempre ao meu lado e que me presenteou com um sobrinho/afilhado lindo, o Vicente.

Ao meu noivo Kassius pela dedicação e apoio nos momentos que mais precisei. Obrigado por fazer parte da minha vida.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Laboratório de microbiologia pelo agradável convívio e pelas contribuições durante este período de pesquisa.

Ao PPG em Ciências Farmacêuticas e seus professores pelo aprendizado.

À UNIPAMPA pelo apoio financeiro.

A todos que me ajudaram durante esse projeto.

E a todos os meus demais amigos e familiares que não foram citados por nomes, mas que não deixam de ter seu destaque no lugar mais importante que é dentro do meu coração.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal do Pampa

### **INTERAÇÃO *IN VITRO* DE ITRACONAZOL E ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS FRENTE À *SPOROTHRIX SCHENCKII SENSU STRICTO* E *SPOROTHRIX BRASILIENSIS***

Autora: Gabriela Seibert  
Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia  
Local e Data da Defesa: Uruguaiana, 22 de março de 2019.

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii*, que apresenta distribuição mundial, com áreas endêmicas. O surgimento de isolados resistentes trouxe grandes desafios ao tratamento das infecções causadas pelo complexo *S. schenckii*. Sendo assim, torna-se necessária a busca por novas estratégias terapêuticas. Estudos envolvendo *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp. demonstraram que a associação entre Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES) e antifúngicos representa uma perspectiva promissora frente aos isolados resistentes. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia *in vitro* dos AINES (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e diclofenaco sódico) isolados e em combinação com agentes antifúngicos (itraconazol e terbinafina) frente a duas espécies clinicamente relevantes: *S. brasiliensis* e *S. schenckii sensu stricto*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente aos 11 isolados de *Sporothrix* spp. foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008). As interações entre os fármacos, bem como o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) dos AINES e antifúngicos selecionados foram avaliados pelo método do tabuleiro de xadrez. Entre os AINES, o ibuprofeno foi o que demonstrou melhor efeito inibitório, com nove isolados apresentando  $CIM \leq 1\text{mg/mL}$ , enquanto que o ácido acetilsalicílico (AAS) mostrou atividade entre 1 a 8mg/mL e o diclofenaco sódico (DIC) não demonstrou atividade a 8mg/mL. Na associação com itraconazol foi possível observar interações sinérgicas em nove isolados, sendo que dois isolados resistentes ao itraconazol, um *S. schenckii sensu stricto* e outro *S. brasiliensis*, apresentaram reação sinérgica com todos os AINES testados. A combinação de terbinafina e AINES foi classificada como indiferente. Dessa forma, é possível observar que a combinação de itraconazol e os três AINES testados representa uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento da esporotricose.

**Palavras chaves:** *Sporothrix* spp., esporotricose, sinergismo, resistência, antifúngicos, ibuprofeno, diclofenaco sódico, ácido acetilsalicílico

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Pampa

### ***IN VITRO* INTERACTION OF ITRACONAZOLE AND NON-STEROID ANTI-INFLAMMATORY AGAINST *SPOROTHRIX SCHENCKII SENSU STRICTO* AND *SPOROTHRIX BRASILIENSIS***

Author: Gabriela Seibert

Advisor: Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, march, 22, 2019.

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by dimorphic fungi of the *Sporothrix schenckii* complex, which is distributed worldwide with endemic areas. The emergence of resistant isolates presented major challenges to the treatment of infections caused by the *S. schenckii* complex. Therefore, it is necessary to seek new therapeutic strategies. Studies involving *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and *Trichosporon* spp. demonstrated that the association between NSAIDs and antifungals represents a promising prospect for resistant isolates. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* efficacy of NSAIDs (acetylsalicylic acid, ibuprofen and diclofenac sodium) alone and in combination with antifungal agents (itraconazole and terbinafine) against two clinically relevant species: *S. brasiliensis* and *S. schenckii sensu stricto*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against the 11 isolates of *Sporothrix* spp. was determined by the broth microdilution method according to the M38-A2 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Interactions between drugs, as well as the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) of the selected NSAIDs and antifungal agents were evaluated by the chessboard method. Among the NSAIDs, ibuprofen showed the best inhibitory effect, with nine isolates presenting MIC <1mg / mL, whereas acetylsalicylic acid (ASA) showed activity between 1 and 8mg / mL and diclofenac sodium (DIC) showed no activity to 8mg / mL. In the combination with itraconazole, it was possible to observe synergistic interactions in nine isolates, and two isolates resistant to itraconazole, one *S. schenckii sensu stricto* and another *S. brasiliensis*, presented a synergistic reaction reaction with all NSAIDs tested. The combination of terbinafine and NSAIDs was classified as indifferent. Thus, it is possible to observe that the combination of itraconazole and the three NSAIDs tested represents a promising therapeutic alternative for the treatment of sporotrichosis.

**Keywords:** *Sporothrix* spp., sporotrichosis, synergism, resistance, antifungals, ibuprofen, diclofenac sodium, acetylsalicylic acid

## **LISTA DE TABELAS**

### **MANUSCRITO**

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima de itraconazol e AINES isolados e em associação.....	31
Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima de terbinafina e AINES isolados e em associação.....	32
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima de prometazina e itraconazol isolados e em associação.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – Ácido acetilsalicílico

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DIC – Diclofenaco sódico

DMSO – Dimetilsulfóxido

IBU – Ibuprofeno

ITZ – Itraconazol

MOPS – Ácido morfolinopropanosulfônico

TRB – Terbinafina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
3.1 Esporotricose .....	16
3.1.1 Histórico.....	16
3.1.2 Agente etiológico – Complexo <i>Sporothrix schenckii</i> .....	17
3.1.3 Epidemiologia.....	18
3.1.4 Tratamento.....	20
3.2 Resistência aos antifúngicos .....	22
3.3 Associação AINES e antifúngicos.....	23
4. MANUSCRITO .....	26
4.1 Introdução.....	28
4.2 Materiais e métodos.....	29
4.3 Resultados.....	30
4.4 Discussão.....	32
4.5 Conclusão.....	36
Agradecimentos.....	36
Declaração de conflito de interesse.....	36
Referências.....	37

5. CONCLUSÃO .....	41
6. REFERÊNCIAS .....	42

## **APRESENTAÇÃO**

A presente dissertação foi dividida em três partes principais. Na parte I encontram-se a INTRODUÇÃO, a REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e os OBJETIVOS. Os resultados que fazem parte desta dissertação, assim como as seções materiais e métodos, resultados, discussão e referências, estão apresentados sob a forma de manuscrito, no item MANUSCRITO, que está na parte II deste trabalho. O item CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS, que apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados mostrados no manuscrito e onde estão expostos os possíveis estudos para dar continuidade a este trabalho encontra-se na parte III desta dissertação, e o item REFERÊNCIAS, que se refere somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica desta dissertação.

## PARTE I

### 1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii*, que acomete tanto seres humanos quanto animais. Essa micose apresenta distribuição mundial, mas é mais frequente em regiões de clima tropical, subtropical ou temperado. A infecção geralmente é causada por inoculação cutânea do agente etiológico, que pode estar relacionada à inoculação traumática com espinhos ou farpas contaminadas, ou transmitida através de arranhões por gatos ou outros animais infectados por espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (BARROS *et al.*, 2011; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2017).

Anteriormente, os agentes etiológicos da esporotricose eram classificados taxonomicamente como sendo uma única espécie, denominada *Sporothrix schenckii*. Com o avanço das técnicas de identificação e classificação de micro-organismos, uma nova classificação foi adotada, baseada em análises fenotípicas e genotípicas, descrevendo-se novas espécies de importância clínica para o complexo *Sporothrix schenckii*: *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. luriei*, *S. schenckii sensu stricto*, *S. albicans* e *S. chilensis* (MARIMON *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015).

A esporotricose é considerada uma doença subcutânea devido à maioria dos casos serem localizados na pele e nos tecidos subcutâneos, porém, ela pode apresentar-se disseminada a outros órgãos, como os pulmões, e mais raramente, ter disseminação sistêmica (KAUFFMAN *et al.*, 2007). Fatores do hospedeiro ou do micro-organismo influenciam na mudança da manifestação clínica da doença, como o estado imunológico do hospedeiro, a virulência da cepa inoculada, dentre outros (BARROS *et al.*, 2011).

O aumento da resistência aos antifúngicos trouxe enormes desafios ao tratamento das infecções, sendo um importante problema de saúde pública. Assim, a terapia baseada na combinação de fármacos pode representar uma perspectiva promissora frente aos isolados resistentes. Estudos tem demonstrado interação sinérgica entre

antifúngicos e Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES): há relatos de interação sinérgica entre ibuprofeno e fluconazol, bem como de anidulafungina associada à AINES frente a isolados de *Candida* spp. (PINA-VAZ *et al.*, 2000; ROSATO *et al.*, 2016). Também foram observadas interações sinérgicas entre AINES e os antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B, frente às células planctônicas e de biofilme de *Trichosporon asahii* (YANG *et al.*, 2016).

Os resultados desses estudos indicaram que os AINES em combinação com agentes antifúngicos podem representar uma nova estratégia de terapia para tratar infecções fúngicas. No entanto, não há na literatura nenhum estudo que tenha avaliado estas interações frente ao complexo *Sporothrix schenckii*. Diante disto, a busca de novas estratégias terapêuticas, tais como a associação entre antifúngicos e fármacos de diferentes classes, é de extrema importância para tratar infecções causadas pelo complexo *Sporothrix schenckii*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficácia *in vitro* dos Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES) ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e diclofenaco sódico de forma isolada e em combinação com os agentes antifúngicos, itraconazol e terbinafina frente aos isolados do complexo *Sporothrix schenckii*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos AINES (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e diclofenaco sódico) frente aos isolados de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis*.

- Avaliar a associação *in vitro* entre AINES e antifúngicos (itraconazol e terbinafina) frente aos isolados de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis*.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Esporotricose

A esporotricose é uma doença infecciosa aguda ou crônica, que acomete humanos e animais, causada por fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, que são naturalmente encontrados no solo, em plantas em decomposição, excretas de animais e celulose (TÉLLEZ *et al.*, 2014) A esporotricose apresenta distribuição mundial, sendo mais frequente em países tropicais e subtropicais de clima quente e úmido (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). A transmissão ocorre, em geral, pela implantação traumática a partir da pele, que pode acontecer com espinhos ou farpas contaminadas pelos agentes etiológicos que habitam o solo e superfícies de plantas, ou transmitida através de animais contaminados, em especial os gatos, por meio de arranhões, mordidas e contato direto da pele lesionada (BARROS *et al.*, 2011; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2017) .

A esporotricose é considerada uma doença subcutânea, com a invasão da derme e do tecido subcutâneo. As lesões são observadas na pele ou nas adjacências de vasos linfáticos, podendo ocorrer uma evolução para a forma cutâneo-linfática. A doença pode apresentar-se disseminada a outros órgãos, como os pulmões (forma pulmonar, adquirida pela inalação de conídios) ou, mais raramente, ter disseminação sistêmica (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014). Casos de esporotricose disseminada estão relacionados a indivíduos profundamente imunocomprometidos, especialmente os infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A imunidade do hospedeiro é um fator importante nas manifestações clínicas da doença, mas fatores relacionados ao micro-organismo, também influenciam na mudança do perfil da doença, como por exemplo, a virulência da cepa inoculada (BARROS *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2013; PAIXÃO *et al.*, 2015).

##### 3.1.1 Histórico

O primeiro caso de esporotricose foi relatado em 1898 nos Estados Unidos pelo então estudante de medicina Benjamin Robinson Schenck, que isolou um fungo proveniente de nódulos ulcerados nos dedos e antebraço de um paciente adulto de 36 anos de idade. O organismo resgatado a partir das lesões foi classificado como uma

espécie pertencente ao gênero *Sporotrichum* (CHAVES, 2011). Somente décadas após sua identificação, o fungo causador da esporotricose foi classificado corretamente baseado em observações feitas por Carmichael em 1962, que verificou diferenças significativas na esporulação dos conídios entre espécies do gênero *Sporotrichum* e fungos isolados em casos de esporotricose (CARMICHAEL, 1962).

Hektoen e Perkins documentaram outro caso de esporotricose, também nos Estados Unidos e, pela primeira vez, o agente etiológico foi classificado como *Sporothrix schenckii* (HEKTON & PERKINS, 1900). Na Europa, o primeiro caso foi descrito em 1903 e mais de 200 casos foram relatados nos 10 anos seguintes (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006).

O primeiro caso de esporotricose no Brasil foi relatado em 1907 por Lutz e Splendore, que também reportaram, pela primeira vez, a possibilidade de cultivo de *S. schenckii* em sua fase leveduriforme *in vitro* e a infecção natural por este micro-organismo em ratos (LUTZ & SPLENDORE, 1907).

### 3.1.2 Agente etiológico – Complexo *Sporothrix schenckii*

Na classificação atual, *S. schenckii* pertence ao reino *Fungi*, divisão *Ascomycota*, ordem *Ophiostomatales*, família *Ophiostomataceae*, gênero *Sporothrix* (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2017). O complexo *Sporothrix schenckii* tem característica termodimórfica, ou seja, apresenta-se na fase leveduriforme quando em temperatura de 37 °C ou filamentosa entre 25 °C e 30 °C, além de serem saprófitos e geofílicos (BARROS *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Desde os primeiros relatos e, por mais de cem anos, classificaram-se taxonomicamente os agentes etiológicos da esporotricose como sendo uma única espécie, denominada *Sporothrix schenckii*, que sempre foi reconhecida como uma espécie uniforme em suas características fenotípicas. Com o avanço das técnicas de identificação e classificação de micro-organismos, em 2007, uma nova classificação foi adotada, baseada em análises fenotípicas e genotípicas, descrevendo-se novas espécies de importância clínica para o complexo *Sporothrix schenckii*: *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. luriei*, *S. schenckii sensu stricto*, *S. albicans* e *S. chilensis* (MARIMON *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015). Os membros do

complexo *S. schenckii* compartilham a maioria das características morfológicas e bioquímicas, tornando uma tarefa difícil a diferenciação das espécies pelos meios tradicionais. A utilização da sequência de DNA dos genes que codificam para a sintetase de quitina,  $\beta$ -tubulina e calmodulina, ajudou a classificar as espécies em cinco subtipos: *S. brasiliensis* no clado I, *S. schenckii sensu stricto* em clado II, *S. globosa* em clado III, *S. mexicana* em clado IV, e *S. pallida* (anteriormente conhecida como *S. albicans*) em clado V (MARIMON *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2011).

### 3.1.3 Epidemiologia

As características clínicas, demográficas e epidemiológicas da esporotricose variam dentro das regiões. A doença ocorre predominantemente em regiões de clima tropical, subtropical ou temperado, sendo a micose subcutânea mais prevalente na América do Sul, com áreas de hiperendemicidade (SCHUBACH *et al.*, 2008). Uma pesquisa realizada no Peru contabilizou um total de 1503 casos de esporotricose entre 1985 e 2012 e demonstrou ser uma região com altos índices de infecção (RAMÍRES-SOTO, 2015). Estudo realizado no México, na região de Xilocuatla, concluiu que esta região pode ser considerada endêmica para esporotricose devido as suas condições geográficas e climáticas que a tornam propícia para a existência do fungo, além da realização de trabalho rural, por homens e mulheres, o que possibilita o contato com o agente causador da esporotricose (BONIFAZ *et al.*, 2013). No Paraguai, a esporotricose é a segunda micose profunda mais frequente em pacientes imunocompetentes, após a paracoccidiodomicose (ORTIZ *et al.*, 2017). Na Venezuela, a esporotricose é uma das micoses subcutâneas mais comuns, sendo considerada endêmica neste país (MATA-ESSAYAG *et al.*, 2013).

No Brasil, a esporotricose é a micose subcutânea mais comum e, na região metropolitana do Rio de Janeiro, tem sido considerada uma zoonose epidêmica desde a década de 1990. Nesta área, a esporotricose humana ocorre principalmente através da transmissão por gatos infectados (SCHUBACH *et al.*, 2008). Os avanços no conhecimento microbiológico, juntamente com o uso de ferramentas moleculares, levaram a importantes progressos em estudos epidemiológicos, possibilitando a identificação das espécies de *Sporothrix* em 14 estados brasileiros, sendo que a maioria dos casos ocorre no Sul e no Sudeste do Brasil (GUTIERREZ *et al.*, 2015). Relatos de

novos casos clínicos no Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo vêm sendo descritos em diversos periódicos científicos (RODRIGUES *et al.*, 2016; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; POESTER *et al.*, 2018).

A esporotricose acomete ambos os gêneros e todas as idades. No entanto, a exposição, hábitos ocupacionais e recreativos específicos aumentam o risco de infecção para diferentes populações, sendo que os principais acometidos são do gênero masculino e em plena idade laboral, como trabalhadores do campo, jardineiros, floristas, madeireiros, fazendeiros e caçadores (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; MAHAJAN, 2014). Porém, no Brasil, há relatos de esporotricose transmitida através de gatos e cães infectados, onde houve predomínio de mulheres que estavam engajadas em atividades domésticas, devido a sua exposição enquanto cuidavam de animais infectados em casa (BARROS *et al.*, 2008).

As principais espécies patogênicas incluem *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. lurei*. Os demais membros do complexo são causa menos frequente de doenças (RODRIGUES *et al.*, 2014). *S. pallida* e *S. mexicana* são principalmente ambientais, mas também podem ser potencialmente patogênicos para humanos e outros mamíferos. Não está claro se essas espécies possuem características fisiológicas diferentes que determinam sua patogenicidade ou se diferem em sua suscetibilidade aos antifúngicos (ZHAO *et al.*, 2015). Infecções causadas por *S. brasiliensis* estão restritas ao Brasil (RODRIGUES *et al.*, 2013). *Sporothrix globosa* foi considerado o agente causador de 30% da esporotricose para os casos venezuelanos re-examinados, a maior frequência dessa espécie relatada até agora nas Américas (CAMACHO *et al.*, 2015). Por outro lado, na China tem sido sugerido que *Sporothrix globosa* é o principal agente causal da esporotricose (ZHAO *et al.*, 2015).

De acordo com os novos critérios de identificação das espécies do complexo *S. schenckii*, grupos de pesquisadores brasileiros re-estudaram as culturas mantidas em suas micotecas. Em São Paulo, Rodrigues (2010) estudou 161 isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de amostras clínicas e ambientais de diversas regiões do Brasil e de outros países. Este estudo mostrou que as espécies *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* tinham ampla distribuição geográfica no país. Registrou, também, que a espécie *S. brasiliensis* foi isolada com alta frequência de gatos nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, sugerindo que este animal poderia ser

um importante reservatório na epidemiologia da esporotricose. Oliveira *et al.* (2011b) desenvolveram um trabalho semelhante ao analisarem 246 culturas isoladas no Rio de Janeiro, no período de 1998 e 2008 e, como resultado, reclassificaram 230 delas como *S. brasiliensis*, 15 como *S. schenckii* e 1 como *S. globosa*.

Em estudo realizado, com base em testes fenotípicos e ensaios moleculares, 31 isolados do estado do Rio Grande do Sul, foram reavaliados e identificados como *S. schenckii* (n=24), *S. brasiliensis* (n=5) e *S. globosa* (n=2). Estudo semelhante também com isolados do Rio Grande do Sul informou que 92,5% dos isolados eram *S. schenckii* e 2,5% eram *S. brasiliensis*, sendo estes últimos isolados de felinos (OLIVEIRA *et al.*, 2011a).

Há indícios de que as várias formas clínicas da esporotricose podem estar relacionadas à diversidade genética de isolados e, possivelmente, a diversos perfis de virulência relatados anteriormente no complexo de espécies de *S. schenckii* (CAMACHO *et al.*, 2015). No Brasil, as principais espécies encontradas em casos de esporotricose são *S. brasiliensis* e *S. schenckii sensu stricto*, ambas consideradas virulentas. É possível que a virulência aumentada de *S. brasiliensis* possa ser um fator que contribui para o surto da esporotricose no Rio de Janeiro. Modelos experimentais com ratos têm sido utilizados para investigar o surgimento de patogenicidade de *Sporothrix* e chamar a atenção para as diferenças na patologia e de fatores de virulência, onde *S. brasiliensis* normalmente exibe maior carga fúngica, capacidade de invasão, e danos extensos ao tecido quando comparado com os demais agentes do complexo *S. schenckii* (FERNANDES *et al.*, 2013).

### 3.1.4 Tratamento

O tratamento da esporotricose geralmente requer administração a longo prazo de um ou mais dos seguintes fármacos: itraconazol, iodeto de potássio, terbinafina ou anfotericina B, dependendo da gravidade, localização das lesões, estado imunológico do paciente e espécie responsável pela infecção. Iodeto de potássio e/ou itraconazol são o tratamento inicial para esporotricose cutânea e linfocutânea fixa (GARCIA *et al.*, 2018). Além disso, a solução saturada de iodeto de potássio sempre foi considerada a primeira escolha para tratamento da esporotricose nas formas cutâneas não

complicadas (MAHAJAN, 2014). Seu mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas acredita-se que o iodeto de potássio atue através da modulação da resposta inflamatória e aumento da resposta imune (STERLING *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 1997). O tratamento apresenta baixo custo, porém apresenta efeitos colaterais como náusea e dor abdominal (KAUFFMAN *et al.*, 2007).

O itraconazol, atualmente, é o principal fármaco utilizado no tratamento das formas cutâneas e linfocutâneas da esporotricose (GARCIA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2014). O itraconazol, assim como os demais azóis, atuam com base na inibição da biossíntese do ergosterol, que é essencial na biorregulação da fluidez, assimetria e integridade celular (CARRILLO *et al.*, 2006). Apesar do itraconazol ser considerado o fármaco de escolha para o tratamento da esporotricose, casos de falha terapêutica, baixos índices de cura e longo tempo de tratamento são relatados (GREMIÃO *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que a terbinafina apresenta relevante atividade frente ao complexo *Sporothrix schenckii* (MEINERZ, 2007; FRANCESCONI *et al.*, 2009, FRANCESCONI *et al.*, 2011; VIANA *et al.*, 2018, VETTORATO *et al.*, 2018), e é considerada como tratamento alternativo para esporotricose nas formas cutânea e linfocutânea (GARCIA *et al.*, 2018). Sua eficácia foi mostrada, inclusive em um caso recidivante após tratamento com itraconazol e iodeto de potássio (HEIDRICH *et al.*, 2011). A terbinafina atua inibindo a enzima epoxidase e alterando a biossíntese dos esteróis fúngicos, com consequente morte da célula fúngica (MEINERZ, 2007).

A anfotericina B é um agente poliênico utilizado para o tratamento de esporotricose nos casos de maior severidade e comprometimento sistêmico. Em função do seu potencial nefrotóxico, possui duas apresentações farmacológicas: desoxiglicolato e lipossomal (ISHIDA *et al.*, 2017; KAUFFMAN *et al.*, 2007; MAHAJAN, 2014). Mesmo com a sua elevada toxicidade permanece como fármaco de escolha no tratamento da esporotricose disseminada, assim como da maioria das micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos. Sua principal atividade fungicida tem sido atribuída à sua capacidade para provocar a auto-oxidação da membrana citoplasmática e a liberação de radicais livres letais (GARCIA *et al.*, 2018; MAHAJAN, 2014).

### 3.2 Resistência aos antifúngicos

As infecções causadas por fungos estão se tornando um problema mundial nos serviços de saúde devido ao aumento da resistência destes micro-organismos aos medicamentos (VETTORATO *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2015). Vários parâmetros podem ser responsáveis por falhas clínicas, como a gravidade da infecção, a formação de biofilmes, estado imunológico do hospedeiro, dosagem subótima, interações medicamentosas, farmacocinética ou carga fúngica (SANGLARD, 2016).

Ainda, apenas algumas classes de medicamentos antifúngicos estão disponíveis, de modo que o surgimento de resistência às classes de fármacos e também a multirresistência dificultam consideravelmente o sucesso do tratamento para infecções fúngicas (PERLIN *et al.*, 2017). A resistência a um determinado antifúngico ocorre com mais frequência após a exposição antifúngica do paciente. No entanto, também podem ocorrer em pacientes não tratados com antifúngicos, como resultado de uma transmissão horizontal de patógenos resistentes (PINHATI *et al.*, 2016). Os mecanismos de resistência aos antifúngicos compreendem alterações no alvo desses fármacos, concentrações reduzidas de fármaco nas células mediada por bombas de efluxo e barreiras de permeabilidade associadas aos biofilmes (PERLIN *et al.*, 2017). Além disso, alguns fatores de virulência comumente associados a infecções causadas pelo gênero *Sporothrix* spp. incluem: adesinas, enzimas extracelulares, termotolerância, presença de ácido siálico, melanina e composição da parede celular (BARROS *et al.*, 2011; MARIO *et al.*, 2016; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2016).

O surgimento de isolados resistentes ao itraconazol tem sido observado, levando a falhas terapêuticas e remissão da esporotricose (ROCHETTE *et al.*, 2003; SCHUBACH *et al.*, 2004; MARIMON *et al.*, 2008; MONTENEGRO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014, STOPIGLIA *et al.*, 2014). Rodrigues *et al.* (2014), em estudo produzido no Brasil, verificaram a presença de uma cepa de *Sporothrix schenckii sensu stricto* advinda de amostra humana com resistência aos polienos e a todos os azólicos testados *in vitro* (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol). Estudos de suscetibilidade de espécies do gênero *Sporothrix* realizado por Zhao *et al.* (2015) relataram aumento da resistência à anfotericina B, azóis e equinocandinas. Relato de caso de esporotricose linfocutânea causada pelo fungo *Sporothrix schenckii sensu*

*stricto*, demonstrou *in vitro* alta resistência ao itraconazol e outros seis antifúngicos (fluconazol, voriconazol, itraconazol, cetoconazol, anfotericina B e posaconazol), com exceção à terbinafina. No paciente as lesões não regrediram com o tratamento com itraconazol, mas a cura foi obtida após quatro meses de uso de terbinafina 500mg/dia (VETTORATO *et al.*, 2018).

Apesar da crescente relevância do complexo *Sporothrix schenckii* na medicina contemporânea, o tratamento de pacientes com esporotricose continua sendo um desafio, devido ao surgimento de fenótipo de resistência entre os agentes etiológicos (BORBA-SANTOS *et al.*, 2015b) e à morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, especialmente AIDS, que podem desenvolver formas clínicas severas, com manifestações sistêmicas (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

Devido às limitadas opções disponíveis atualmente para o tratamento da esporotricose e à constante ameaça de aquisição de resistência aos antifúngicos, torna-se de extrema importância pesquisar novas abordagens para o controle de infecções fúngicas, incluindo a esporotricose.

### **3.3 Associação AINES e antifúngicos**

O aumento da resistência aos antifúngicos trouxe enormes desafios ao tratamento das infecções, sendo um importante problema de saúde pública. A terapia baseada na combinação de fármacos pode representar uma perspectiva promissora, podendo alcançar uma cobertura antimicótica mais ampla e potencialmente reduzir a resistência adquirida. No entanto, deve notar-se que a combinação de azóis e polienos tem sido relatada como tendo um efeito antagonista *in vitro* (HATIPOGLU *et al.*, 2013). Por outro lado, estudos demonstraram que a associação entre AINES e antifúngicos representa uma perspectiva promissora frente aos isolados resistentes (PINA-VAZ *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2016; ROSATO *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.* de 2015; DUPONT *et al.*, 2016).

Resultados obtidos por Pina-Vaz *et al.* (2000) evidenciaram que a combinação de ibuprofeno com fluconazol resultou em atividade sinérgica em isolados de *Candida* spp., incluindo quatro amostras resistentes ao fluconazol. Em estudo realizado, Rosato *et al.* (2016) observaram resultados sinérgicos entre equinocandinas associadas a anti-

inflamatórios não esteroidais frente a quatro isolados de *C. albicans*, dois isolados de *C. glabrata* e três isolados de *C. guilliermondii*. O sinergismo foi observado quando a anidulafungina foi combinada com ácido acetilsalicílico, diclofenaco sódico e ibuprofeno, demonstrando ser uma opção de tratamento frente a espécies de *Candida*.

Yang *et al.* (2016) avaliaram as interações *in vitro* entre três AINES (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e diclofenaco sódico) e agentes antifúngicos frequentemente utilizados (fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B) frente a *Trichosporon asahii* e observaram inibição desse fungo pelos três AINES avaliados, além da interação sinérgica com fluconazol (83,33% para ácido acetilsalicílico, 100% para ibuprofeno e 83,33% para diclofenaco sódico) para seis isolados de *T. asahii* resistentes ao fluconazol .

Estudo *in vivo* realizado com modelo de infecção sistêmica por *Candida albicans* em camundongos tratados com ibuprofeno e fluconazol mostrou que o ibuprofeno potencializa a atividade antifúngica do fluconazol em isolado resistente ao fluconazol, reduzindo drasticamente a carga fúngica e a morbidade. A combinação terapêutica de fluconazol com ibuprofeno pode constituir uma nova abordagem para o tratamento de terapias antifúngicas para reverter à resistência conferida pela superexpressão da bomba de efluxo (COSTA *et al.*, 2015). Em outro estudo, 42 dos 69 isolados clínicos de *Candida* demonstraram reversão da resistência ao fluconazol com o uso concomitante de ibuprofeno (SHARMA *et al.*, de 2015). Dupont *et al.* (2016) relataram a cura de um paciente com micetoma, usando diclofenaco sódico, enquanto que o tratamento antifúngico clássico (voriconazol, posaconazol e flucitosina) falhou.

Apesar de uma grande demanda, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para terapia clínica tem ficado para trás da crescente incidência de resistência aos medicamentos (LIU *et al.*, 2014). Diante do exposto, a terapia combinada de AINES e antifúngicos pode alcançar uma cobertura antimicótica mais ampla e tornar-se uma nova opção terapêutica.

**PARTE II**

**MANUSCRITO**

**ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS REVERTEM RESISTÊNCIA  
DE *SPOROTHRIX SCHENCKII SENSU STRICTO* E *SPOROTHRIX  
BRASILIENSIS* AO ITRACONAZOL**

Gabriela Seibert, Ana Luisa Reetz Poletto, Jennifer Veppo Prade e Cheila Denise  
Ottonelli Stopiglia

Em fase de preparação para submissão para a revista *Mycoses*  
(Qualis B1 nas áreas de avaliação Farmácia e Ciências Biológicas II)

**ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS REVERTEM RESISTÊNCIA  
DE À *SPOROTHRIX SCHENCKII SENSU STRICTO* E *SPOROTHRIX  
BRASILIENSIS* AO ITRACONAZOL**

Gabriela Seibert<sup>1</sup>, Ana Luisa Reetz Poletto<sup>2</sup>, Jennifer Veppo Prade<sup>2</sup> Cheila Denise  
Ottonelli Stopiglia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul,  
Brasil.

<sup>2</sup> Curso de Farmácia, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brasil.

**REVERSÃO DE RESISTÊNCIA AO ITRACONAZOL**

Palavras-chave: esporotricose, resistência, antifúngicos, ibuprofeno, diclofenaco sódico,  
ácido acetilsalicílico, sinergismo, anti-inflamatórios

Correspondente: Cheila Denise Ottonelli Stopiglia, Universidade Federal do Pampa,  
BR 472 KM 592 Caixa Postal 118, CEP: 97501-674, Uruguaiiana, RS – Brasil. Tel: +  
55 55 34123101. E-mail: cheilastopiglia@unipampa.edu.br

## Resumo

O surgimento de isolados resistentes trouxe enormes desafios ao tratamento da esporotricose, tornando necessária a busca por novas estratégias terapêuticas. Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINES) já se mostraram efetivos *in vitro* frente à *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp. No presente estudo, o objetivo foi avaliar a eficácia *in vitro* de AINES isolados e em combinação com itraconazol e terbinafina frente à *Sporothrix brasiliensis* e *S. schenckii sensu stricto*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente aos 11 isolados de *Sporothrix* spp., foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008). As interações entre os fármacos, bem como o Índice da Concentração Inibitória Fracionada dos AINES (ácido acetilsalicílico, diclofenaco sódico e ibuprofeno) e antifúngicos selecionados foram avaliadas pelo método do tabuleiro de xadrez. Entre os AINES testados de forma isolada, o ibuprofeno foi o mais ativo, seguido pelo ácido acetilsalicílico. Na associação de itraconazol com os três AINES avaliados foi possível observar interações sinérgicas em nove isolados e reversão da resistência em 5/6 isolados resistentes na associação com ibuprofeno, 3/6 na associação com diclofenaco sódico e 2/6 na associação com ácido acetilsalicílico. A associação dos AINES com terbinafina mostrou-se indiferente para os isolados testados. Portanto, pode-se concluir que a combinação de itraconazol e os AINES avaliados representa ser uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento da esporotricose.

**Palavras chaves:** *Sporothrix* spp., esporotricose, sinergismo, resistência, antifúngicos, ibuprofeno, diclofenaco sódico, ácido acetilsalicílico, anti-inflamatório

## 1. Introdução

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii*, que apresenta distribuição mundial, com áreas hiperendêmicas no Brasil, na China e na África do Sul<sup>1,2</sup>. Na região metropolitana do Rio de Janeiro, Brazil, tem sido considerada uma zoonose epidêmica desde a década de 1990. Nesta região, a esporotricose ocorre principalmente através da transmissão por gatos infectados para humanos<sup>3</sup>. *S. brasiliensis* e *S. schenckii sensu stricto* as espécies mais virulentas e que estão mais comumente relacionadas à infecção humana e animal no Brasil<sup>4,5</sup>. O tratamento para esporotricose geralmente requer administração a longo prazo de itraconazol, iodeto de potássio, terbinafina ou anfotericina B, dependendo da gravidade e localização das lesões<sup>6-8</sup>.

Nas últimas décadas, a esporotricose emergiu como uma infecção fúngica importante pela epidemia em algumas regiões, bem como, pelo aumento de isolados resistentes aos tratamentos convencionais, tornando-se um importante problema de saúde pública<sup>7,9-13</sup>.

Estudos demonstraram que a associação entre Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES) e antifúngicos representa uma perspectiva promissora frente aos isolados fúngicos resistentes<sup>14-19</sup>. No entanto, não há na literatura nenhum estudo que tenha avaliado estas interações frente aos isolados do complexo *Sporothrix schenckii*. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia *in vitro* dos AINES (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e diclofenaco sódico) isolados e em combinação com agentes antifúngicos (itraconazol e terbinafina) frente a *S. brasiliensis* e *S. schenckii sensu stricto*.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Micro-organismos

Foram utilizados 11 isolados clínicos de agentes da esporotricose, sendo seis *S. brasiliensis* e cinco *S. schenckii sensu stricto* com diferentes perfis de suscetibilidade, oriundos da micoteca do Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Pampa. Todos os isolados foram previamente cultivados em ágar batata dextrose por sete dias a 25 °C.

### 2.2. Fármacos

Foram utilizados dois antifúngicos disponíveis comercialmente para o tratamento da esporotricose: itraconazol (ITZ) e terbinafina (TRB); e três AINES: ácido acetilsalicílico, diclofenaco sódico e ibuprofeno. A solução estoque dos fármacos foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente, foram realizadas diluições seriadas no meio RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com 0,165M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), até atingir a faixa de concentração de 0,06 a 32 µg/mL para ITZ; de 0,01 a 8 µg/mL para TRB e 0,06 a 8 mg/mL para os AINES.

### 2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM dos AINES e dos antifúngicos isolados foram avaliadas usando o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, de acordo com o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2008). Os valores de CIM foram determinados visualmente, após incubação a 35°C durante 50 horas, por comparação com o controle de crescimento, sendo definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico para itraconazol e 80% de inibição do crescimento para terbinafina<sup>20</sup>.

As interações entre os AINES e os antifúngicos foram avaliadas utilizando o método do tabuleiro de xadrez em placas de microdiluição de 96 poços<sup>15,21</sup>. A interpretação das interações foi realizada através da determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) pela seguinte equação:  $ICIF = (A_c / A_a) + (B_c / B_a)$ , onde  $A_c$  e  $B_c$  são as CIM dos fármacos A e B em combinação, respectivamente, e  $A_a$  e  $B_a$  são as CIM dos fármacos isolados, respectivamente. O ICIF

foi interpretado como sendo sinérgico quando o valor foi  $\leq 0,5$ ; ICIF maiores que 4 indicam antagonismo e  $0,5 < ICIF \leq 4$  indicaram indiferença<sup>15</sup>.

#### 2.4. Avaliação da atividade fungicida/fungistática dos AINES

Um isolado sensível e dois resistentes ao itraconazol foram submetidos a avaliação da atividade fungicida/fungistática. Para isso, alíquotas de 10 $\mu$ l dos poços que apresentaram inibição de crescimento nos ensaios com AINES foram espalhadas em placas contendo ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 28 °C por 72 h. Foi considerada fungicida a menor concentração dos AINES que produziu três ou menos colônias<sup>22</sup>.

### 3. Resultados

Entre os AINES testados, o ibuprofeno e o ácido acetilsalicílico apresentaram atividade antifúngica de forma isolada, enquanto que, o diclofenaco sódico não demonstrou efeito. O ibuprofeno foi ativo na faixa de concentração de 0,25 a 1 mg/mL (MG = 0,5 mg/mL) para *S. schencki sensu stricto* e de 0,12 a 8 mg/mL (MG = 0,99 mg/mL) para *S. brasiliensis*, enquanto o ácido acetilsalicílico apresentou atividade para *S. schencki sensu stricto* na faixa de concentração de 4 a 8 mg/mL (MG = 6,96 mg/mL) e entre 0,25 a >8mg/mL (MG = 3,52 mg/mL) para *S. brasiliensis*.

A associação entre os AINES e o itraconazol está demonstrada na Tabela 1 e com terbinafina, na Tabela 2. Na associação com ibuprofeno, nove isolados apresentaram redução da CIM para itraconazol e destes, cinco demonstraram efeito sinérgico entre ITZ/IBU, sendo três *S. schencki sensu stricto* e dois *S. brasiliensis*. Os isolados que não apresentaram redução de CIM, eram sensíveis ao itraconazol e mantiveram a CIM = 1 $\mu$ g/mL após associação com ibuprofeno. Para diclofenaco sódico, sete isolados demonstraram redução da CIM após associação. Efeito sinérgico entre ITZ/DIC foi observado em três isolados de *S. schencki sensu strito* e dois *S. brasiliensis*. Para AAS, oito isolados tiveram a CIM reduzida após associação e quatro isolados apresentaram efeito sinérgico, sendo dois *S. schencki sensu strito* e dois *S. brasiliensis*. Nas associações entre AINES e itraconazol nenhum efeito antagonista foi observado.

A associação dos AINES com terbinafina, segundo os valores de ICIF, mostrou-se indiferente para os isolados testados. Sendo assim, os ensaios foram seguidos apenas com itraconazol.

**Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) de itraconazol e AINES isolados e em associação.

	CIM isolado				CIM associação		CIM associação		CIM associação	
	ITZ µg/mL	AAS mg/mL	DIC mg/mL	IBU mg/mL	ITR µg/mL	AAS mg/mL	ITR µg/mL	DIC mg/mL	ITR µg/mL	IBU mg/mL
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i> (n=5)										
<b>STT RJ</b>	8	8	>8	0,5	1*	2*	2	8	0,12*	0,25*
<b>SS27</b>	>32	8	>8	1	16*	2*	16*	2*	2*	0,25*
<b>SS35</b>	1	8	>8	0,5	1	4	0,25*	2*	1	0,5
<b>SS36</b>	0,5	4	8	0,25	0,25	0,5	0,25*	0,12*	0,25	0,25
<b>SS39</b>	0,5	8	>8	0,5	0,06	4	0,5	4	0,12*	0,12*
<b>Intervalo</b>	0,5- >32	4-8	8->8	0,25-1	0,06- 16	0,5-4	0,25- 16	0,12-8	0,12-2	0,12-0,5
<b>Média geométrica</b>	2,29	6,96	>8	0,5	0,75	2	1	1,72	0,37	0,24
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=6)										
<b>1099<sup>A</sup></b>	1	1	>8	1	1	1	1	1	1	0,5
<b>201681<sup>A</sup></b>	0,25	4	>8	0,25	0,12	0,5	0,25	>8	0,12	0,25
<b>01-I076</b>	8	8	>8	1	1*	2*	1*	1*	1*	0,12*
<b>11-I020</b>	16	>8	2	4	16	>8	0,06*	1*	0,5	4
<b>SS048 C</b>	32	1	>8	8	16	0,5	32	>8	0,5*	4*
<b>SS110</b>	2	0,25	<0,06	0,12	<0,25*	<0,06*	<0,25	<0,06	<0,25	<0,06
<b>Intervalo</b>	0,25- 32	0,25- >8	<0,06- >8	0,12-8	<0,25- 16	<0,06- >8	<0,25- 32	<0,06- >8	<0,025- 1	<0,06-4
<b>Média geométrica</b>	3,56	2	4,45	0,99	1,40	0,78	0,70	1,25	0,44	0,49
<i>Sporothrix spp.</i> (n=11)										
<b>Intervalo</b>	0,25- >32	0,25- >8	<0,06- >8	0,12-8	0,06- 16	<0,06- >8	0,06- 32	<0,06- >8	0,12-2	<0,06-4
<b>Média geométrica total</b>	2,91	3,52	>8	0,72	1,05	1,20	0,82	1,44	0,40	0,36

ITZ: itraconazol; AAS: ácido acetilsalicílico; DIC: diclofenaco sódico; IBU: ibuprofeno; A: ATCC; \*Efeito sinérgico.

**Tabela 2:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) da terbinafina e AINES isolados e em associação.

	CIM isolado				CIM associação		CIM associação		CIM associação	
	TRB µg/mL	AAS mg/mL	DIC mg/mL	IBU mg/mL	TRB µg/mL	AAS mg/mL	TRB µg/mL	DIC mg/mL	TRB µg/mL	IBU mg/mL
<b>SS35</b>	0,12	8	>8	0,5	0,12	4	0,12	0,5	0,12	0,06
<b>SS27</b>	0,25	8	>8	1	0,25	8	0,25	8	0,25	0,06
<b>SS110</b>	0,25	0,25	<0,06	0,12	0,06	0,25	<0,06	<0,06	<0,06	<0,06

TRB: terbinafina; AAS: ácido acetilsalicílico; DIC: diclofenaco sódico; IBU: ibuprofeno.

#### 4. Discussão

No presente estudo o ibuprofeno e o ácido acetilsalicílico demonstraram atividade frente aos isolados testados, sendo que ibuprofeno inibiu o crescimento em baixas concentrações para a maioria dos isolados, dos quais, 9/11 apresentaram CIM  $\leq$  1mg/mL. O ácido acetilsalicílico também inibiu o crescimento, porém em concentrações maiores, corroborando com a literatura que relata que ibuprofeno e ácido acetilsalicílico limitam o crescimento de fungos<sup>15,23-25</sup>. No entanto, essa atividade não havia sido relatada frente aos isolados do complexo *S. schenckii*. Yang *et al.* (2016)<sup>15</sup> demonstraram que o ibuprofeno inibiu o crescimento de todos os isolados de *Trichosporon asahii* avaliados, na concentração de 0,5 a 2mg/mL, e na concentração de 8 a 16mg/mL para ácido acetilsalicílico, enquanto que Krol *et al.* (2018)<sup>25</sup>, relataram efeito semelhante para isolados de *Candida* spp., com CIM entre 1,25 a 20mmol (0,25 a 4 mg/mL) para ibuprofeno e CIM acima de 5mmol (0,9 mg/mL) para ácido acetilsalicílico. Para *Cryptococcus* spp., a concentração 3 mmol (0,54 mg/mL) de ácido acetilsalicílico inibiu o crescimento de todos os isolados<sup>26</sup>. Além disso, estudo *in vivo* com coelhos infectados por dermatófitos obteve a cura completa após aplicação de ibuprofeno 15mg/g creme<sup>27</sup>. Há relatos de que o ibuprofeno possui uma potente atividade fungicida na concentração de 10mg/mL, causando lesões na membrana celular resultante da repressão do metabolismo de potássio, enquanto é fungistático em concentrações mais baixas (5mg/mL)<sup>14</sup>. No presente trabalho, a maior concentração utilizada para AINES foi de 8mg/mL e, nesta concentração, o ibuprofeno mostrou ser fungistático para *Sporothrix schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis*, assim como ácido acetilsalicílico e diclofenaco sódico.

Em nosso estudo, diclofenaco sódico não apresentou atividade na concentração de 8mg/mL para a maioria dos isolados avaliados, diferente de estudo com *T. asahii* em que a atividade do diclofenaco sódico foi observada nas concentrações entre 1 a 4mg/mL<sup>15</sup>. Rusu *et al.* (2009)<sup>23</sup> relataram que AAS e DIC podem diminuir a viabilidade de *Candida albicans*, devido a um conhecido efeito dos inibidores das isoenzimas ciclooxigenase (COX), a inibição da produção de prostaglandinas fúngicas, assim como estudo com *Trichophyton mentagrophytes* e *Cryptococcus neoformans* sugere que a nimesulida, conhecido AINES, exerce um efeito fungicida através de mecanismos

dependentes da inibição de prostaglandinas fúngicas<sup>28</sup>. Estudos mostram que as prostaglandinas são produzidas por *Candida albicans* e por outros fungos patogênicos, incluindo *Sporothrix schenckii*<sup>24,29</sup>. Estas substâncias são produzidas utilizando tanto fonte endógena como exógena de ácido araquidônico e desempenham importante papel para a sobrevivência fúngica e, provavelmente, para evasão da resposta imune do hospedeiro<sup>30</sup>, pois induzem a produção de tubos germinativos, formação de hifas e a morfogênese fúngica, bem como reduzem a produção de quimiocinas e fator de necrose tumoral alfa do hospedeiro<sup>29,31</sup>.

De acordo com alguns estudos, a associação entre AINES e antifúngicos tem demonstrando bons resultados, podendo ser uma nova estratégia para tratar infecções fúngicas<sup>15-18,25</sup>. Em nosso estudo, foi possível observar atividade sinérgica entre itraconazol e AINES em nove isolados. Para a espécie *Sporothrix brasiliensis*, o sinergismo foi observado somente em isolados resistentes ao itraconazol, diferente dos isolados *S. schenckii sensu stricto* em que foi observada reação sinérgica também em isolados sensíveis ao itraconazol, corroborando com estudo que apresentou altas porcentagens de interação sinérgica entre fluconazol e AINES (83,33% para AAS, 100% para IBR e 83,33% para DIC) frente a seis isolados de *T. asahii* resistentes ao fluconazol<sup>15</sup>. Além disso, Król *et al.* (2018)<sup>25</sup> relataram efeito sinérgico de ibuprofeno com fluconazol e também com fármacos da nova geração de triazóis, incluindo voriconazol, posaconazol e isavuconazol em isolados de *Candida* spp., que corrobora com estudo *in vivo* de *Candida albicans* em camundongos que mostrou que o ibuprofeno potencializa a atividade antifúngica do fluconazol contra cepa resistente a esse antifúngico<sup>17</sup>.

Curiosamente, o diclofenaco sódico que não inibiu a maioria dos isolados avaliados (MG = >8 mg/mL), demonstrou efeito sinérgico quando associado ao itraconazol em 5/11 isolados. DUPONT *et al.* (2016)<sup>19</sup> relataram a cura de um paciente com micetoma usando diclofenaco sódico. O tratamento realizado com AINES foi bem sucedido, enquanto que o tratamento antifúngico clássico (voriconazol, posaconazol e flucitosina) falhou.

Apesar de, para alguns isolados as associações não serem classificadas como sinérgicas, de acordo com os valores de ICIF, um grande número de isolados reduziu a CIM do itraconazol após a associação e alguns isolados passaram de resistentes para

sensíveis<sup>32,33</sup>. Desta forma, em nosso trabalho foi observada a reversão da resistência em 5/6 isolados resistentes na associação com ibuprofeno, 3/6 na associação DIC/ITZ e 2/6 associação AAS/ITZ, corroborando com trabalho realizado com isolados clínicos de *Candida* spp., no qual, 42 dos 69 (60,9%) demonstraram reversão da resistência ao fluconazol com o uso concomitante de ibuprofeno<sup>18</sup>.

Sabe-se que um dos principais mecanismos de resistência aos azóis entre *Candida* spp. é o aumento da atividade das bombas de efluxo, que é conferida pelos genes *CDR1* e *CDR2*. A super-expressão desses genes e o subsequente aumento na atividade dessas bombas impedem o acúmulo do fármaco no interior da célula no local da ação, prejudicando a sua eficácia<sup>34</sup>. Ricardo *et al.* (2009)<sup>35</sup> mostraram que a resistência antifúngica conferida pelo aumento da atividade de efluxo, devido à super-expressão dos genes *CDR1* e *CDR2* em *Candida* spp. pode ser revertida pelo ibuprofeno, sempre que os genes de efluxo forem os genes de resistência mais expressos.

O gênero *Sporothrix* exibe alta diversidade genética, que é acompanhado por uma diversidade de respostas *in vitro* aos principais agentes antifúngicos<sup>7</sup>. Desta forma, acredita-se que as diferentes interações observadas em nosso estudo devam estar associadas aos diferentes mecanismos de resistência, que incluem alterações no alvo desses fármacos, concentrações reduzidas de fármaco nas células mediadas por bombas de efluxo e barreiras de permeabilidade associadas aos biofilmes<sup>36</sup>. Além disso, a produção de melanina também está associada à diminuição da suscetibilidade aos antifúngicos<sup>37,38</sup>. Dessa forma, torna-se necessário investigar os mecanismos de resistência envolvidos nos isolados que apresentaram reação sinérgica com os três AINES testados, para melhor compreensão desta reação.

Vale ressaltar que os AINES incluídos em nosso estudo (AAS, DIC e IBU), são comumente usados para melhorar a febre e outros sintomas causados pela infecção, tornando essas combinações de fármacos uma alternativa terapêutica de possível implementação. No entanto, a CIM dos AINES capaz de inibir o crescimento fúngico ainda é maior que as maiores concentrações plasmáticas utilizadas com segurança na clínica<sup>39</sup>. Por outro lado, é difícil prever o impacto real dos AINES no combate às infecções causadas por *Sporothrix* spp., de modo que não depende apenas de sua atividade antifúngica. Nosso estudo fornece orientações para futuras pesquisas sobre

terapias de combinação clínica entre AINES e antifúngicos com *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis*.

## **5. Conclusão**

Resultados encontrados relatam pela primeira vez o efeito inibitório do ibuprofeno e do ácido acetilsalicílico frente a isolados de *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis*, assim como, é demonstrado pela primeira vez efeito sinérgico entre itraconazol e AINES (ibuprofeno, ácido acetilsalicílico e diclofenaco sódico), mostrando que o uso dessas combinações de fármacos pode ser uma alternativa terapêutica para o tratamento da esporotricose.

## **Agradecimento**

Os autores agradecem o Programa de Auxílio da Pós-Graduação da Universidade Federal do Pampa pela bolsa de pós-graduação para Gabriela Seibert.

## **Declaração de conflito de interesse**

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## Referências

1. Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, Hoog GS. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Divers*. 2014; 66(1):153–165.
2. Zhang Y, Hagen F, Stielow B, *et al.* Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14,000 human and animal case reports. *Persoonia*. 2015; 35:1–20.
3. Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21(2):129-133.
4. Brilhante RSN, Rodrigues AM, Sidrim JJC, *et al.* *In vitro* susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. *Med Mycol*. 2016; 54(3): 275-279.
5. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. *PLoS Pathogens*. 2016; 12(7): e1005638.
6. Mahajan VK. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pract*. 2014; 2014:272376.
7. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Cássia Pires D, *et al.* Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect Dis*. 2014; 14(1): 219.
8. Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, *et al.* Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med Mycol*. 2015; 53(2):178–188.
9. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, & Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2015; 53(1): 3-14.
10. Vettorato R, Heidrich D, Fraga F, *et.al.* Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: Case report. *Med mycol case rep*. 2018; 19: 18-20.

11. Zhao MD, Zhou X, Liu TT, Yang ZB. Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex. J Zhejiang Univ Sci B. 2015; 16(11): 940–947.
12. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F & de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. BMC Vet Res. 2014; 10(1): 269.
13. Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrillón MR, *et al.* Antifungal susceptibility and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. Med Mycol. 2014; 52(1): 56–64.
14. Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF, Mårdh PA. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. J Med Microbiol. 2000; 49(9): 831-840.
15. Yang S, Liao Y, Cong L, Lu X, Yang R. *In Vitro* interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. PLoS One. 2016; 11(6): e0157047
16. Rosato A, Catalano A, Carocci A, *et al.* *In vitro* interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. Bioorg Med Chem. 2016; 24(5): 1002-1005.
17. Costa OS, Miranda IM, Silva-Dias A, Silva AP, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Ibuprofen potentiates the *in vivo* antifungal activity of fluconazole against *Candida albicans* murine infection. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(7): 4289-4292.
18. Sharma M, Biswas D, Kotwal A, *et al.* Ibuprofen-mediated reversal of fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida*. J Clin Diagn Res. 2015; 9(1): DC20-2.
19. Dupont B, Datry A, Poiree S, Canestri A, Boucheneb S, & Fourniols E. Role of a NSAID in the apparent cure of a fungal mycetoma. J Mycol Med. 2016; 26(2): 86-93.
20. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute approved standard, M38-A2, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of

- Filamentous Fungi, 2nd ed Vilanova Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
21. Denardi LB, Keller JT, Oliveira V, Mario DAN, Santurio JM, & Alves SH. Activity of Combined Antifungal Agents Against Multidrug-Resistant *Candida glabrata* Strains. *Mycopathologia*. 2017; 182(9-10): 819-828.
  22. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Meter J, Rinaldi MG, Walsh TJ. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations to new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(9): 3204-3208
  23. Rusu E, Enache-Soare S, Negruta O, Vassu T. The conventional identification effect of diclofenac and aspirin on the *Candida* species. *Rom Biotechnol Lett* 2009; 14(5): 4720–4727.
  24. Alem M, Douglas JL. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(1):41–47.
  25. Król J, Nawrot U, Bartoszewicz M. Anti-candidal activity of selected analgesic drugs used alone and in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole and isavuconazole. *J Mycol Med*. 2018; 28(2): 327-331.
  26. Sebolai OM, Pohl CH, Botes PJ, *et al*. Distribution of 3-hydroxy oxylipins and acetylsalicylic acid sensitivity in *Cryptococcus* species. *Can J Microbiol*. 2008; 54(2): 111-118.
  27. Al-Janabi AS. *In vitro* and *in vivo* therapeutic activity of ibuprofen against dermatophytes. *Saudi Med J*. 2009; 30(5): 624-628.
  28. de Matos RF, Souza KGS, Fonseca AAD, *et al*. Nimesulide inhibits pathogenic fungi: PGE2-dependent mechanisms. *Folia microbiol*. 2017; 62(2): 169-174.
  29. Noverr MC, Toews GB, Huffnagle GB. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. *Infect Immun*. 2002; 70(1): 400-402

30. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, *et al.* Prostaglandin E<sub>2</sub> production by high and low virulent strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*. 2007; 163(3): 129-135.
31. Ells R, Kock JL, Albertyn J, & Pohl CH. Arachidonic acid metabolites in pathogenic yeasts. *Lipids Health Dis*. 2012; 11(1): 100.
32. Almeida-Paes R, Brito-Santos F, Figueiredo-Carvalho MHG, *et al.* Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017; 112(5): 376-381.
33. Espinel-Ingroff A, Abreu DPB, Almeida-Paes R, *et al.* Multicenter and international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values (ECVs) for species of *Sporothrix* identified by molecular methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(10):e01057-17.
34. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(1): 120-128.
35. Ricardo E, Costa-de-Oliveira S, Silva Dias A, Guerra J, Rodrigues A G, & Pina-Vaz C. Ibuprofen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of CDR genes. *FEMS Yeast Res*. 2009; 9(4): 618-625.
36. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(12): 383-392.
37. Mario DAN, Santos RCV, Denardi LB, de Almeida Vaucher R, Santurio JM, & Alves SH. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. *Rev Iberoam Micol*. 2016; 33(1): 21-25.
38. Almeida-Paes R, Figueiredo-Carvalho MHG, Brito-Santos F, Almeida-Silva F, Oliveira MME, & Zancopé-Oliveira RM. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PloS one*. 2016; 11(3): e0152796.

39. Shin D, Lee SJ, Ha YM, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation according to absorption differences in three formulations of ibuprofen. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11: 135-141.

### PARTE III

#### CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho relatam pela primeira vez o efeito inibitório do ibuprofeno e do ácido acetilsalicílico frente aos isolados de *S. schencki sensu stricto* e *S. brasiliensis*, assim como, efeito sinérgico entre itraconazol e AINES (ibuprofeno, ácido acetilsalicílico e diclofenaco sódico), demonstrando que o uso dessas combinações de fármacos pode representar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da esporotricose.

Este trabalho tem como perspectivas, ampliar o número de isolados, assim como verificar a suscetibilidade de biofilmes do complexo *Sporothrix schenckii* frente aos AINES (ibuprofeno, ácido acetilsalicílico e diclofenaco sódico) de forma isolada e em associação com antifúngicos, e ainda, realizar testes complementares para investigar os mecanismos de resistência envolvidos na redução da suscetibilidade dos isolados frente aos antifúngicos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PAES, R., Brito-Santos, F., Figueiredo-Carvalho, M.H.G., Machado, A.C.S., Oliveira, M.M.E., *et al.* **Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis***. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 112, n. 5, p. 376-381, 2017.
- ALMEIDA-PAES, R., Figueiredo-Carvalho, M.H.G., Brito-Santos, F., Almeida-Silva, F., Oliveira, M.M.E., & Zancopé-Oliveira, R.M. **Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine**. PLoS one. v. 11, n.3: e0152796, 2016.
- ALMEIDA-PAES, R., Oliveira, M.M., Freitas, D.F., Valle, A.C., *et.al.* **Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* in associated with a typical clinical presentations**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v.8, n.9, 2014.
- BARROS, M.B.; Almeida-Paes, R.; Schubach, A.O. ***Sporothrix schenckii* and sporotrichosis**. Clinical Microbiology Reviews, v.24, n.4, p.633-654, 2011.
- BARROS, M.B.L. Schubach, A.O., Schubach, T.M., Wanke, B., *et al.* **An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases**. Epidemiology & Infection, v. 136, n. 9, p. 1192-1196, 2008.
- BONIFAZ, A., Araiza, J., Pérez-Mejía, A., Ochoa, L.A., Toriello, C. **Intradermal test with sporotrichin in a community in the Sierra Norte de Puebla**. Dermatologia Revista Mexicana, v.57, p.428–32, 2013.
- BORBA-SANTOS, L.P., Gagini, T., Ishida, K., de Souza, W., Rozental, S. **Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with *in vitro* low susceptibility to amphotericin B or itraconazole**. Journal of Medical Microbiology, v.64, p.415–422, 2015b.
- BORBA-SANTOS, L.P., Rodrigues, A.M., Gagini, T.B., Fernandes, G.F., Castro, R., Camargo, Z.P., *et al.* **Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine**. Medical Mycology, v.53, p.178–188, 2015a.

CAMACHO, E., León-Navarro, I., Rodríguez-Brito, S., Mendoza, M., Niño-Veja, G.A. **Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*.** BMC Infectious Diseases, v.15, n.1, p.94, 2015.

CARMICHAEL, J.W. **Chrysosporium and some other aleuriosporic hyphomycetes.** Canadian Journal of Botany, v.40, p.1137-1181, 1962.

CARRILLO-MUNOZ, A.J. *et al.* **Antifungal agents: mode of action in yeast cells.** Revista Espanola de Quimioterapia, v.19, n.2, p.130-9, 2006.

CHAKRABARTI, A. Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M.C., Mochizuki T., & Li S. **Global epidemiology of sporotrichosis.** Medical Mycology, v.53, n.1, p.3-14, 2015.

CHAVES, A.R., *et al.* **Evolução clínica dos casos de esporotricose felina diagnosticados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/Fiocruz no período de 1998 a 2005.** 2011. Tese de Doutorado.

COSTA, O.S., Miranda, I.M., Silva-Dias, A., Silva, A.P., Rodrigues, A.G., Pina-Vaz, C. **Ibuprofen potentiates the *in vivo* antifungal activity of fluconazole against *Candida albicans* murine infection.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v.59, n.7, p.4289-4292, 2015.

DUPONT, B., Datry, A., Poire´e, S., Canestri, A., Boucheneb, S., Fourniols, E. **Role of a NSAID in the apparent cure of a fungal mycetoma.** Journal de Mycologie Medicale, 2016.

FERNANDES, G.F., dos Santos, P.O., Rodrigues, A.M. *et al.* **Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species.** Virulence, v.4, n.3, p.241–249, 2013.

FRANCESCONI, G, Francesconi do Valle, A.C., Passos, S.L., Lima Barros, M.B., Almeida-Paes, R., Curi, A.L., *et al.* **Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis.** Mycopathologia, v.171, n.5, p.349–354, 2011.

FRANCESCONI, G., Valle, A.C., Passos, S., Reis, R., Galhardo, M.C.. **Terbinafine (250 mg/day): effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis.** Journal of

the European Academy of Dermatology and Venereology, v.23, n.11, p.1273–1276, 2009.

GARCÍA, C.L.C., Lozoya, P.N.E.; González H.S.E., Martínez A.J.A. **Immunity and Treatment of Sporotrichosis**. Journal of Fungi, v.4, n.3, p.100, 2018.

GREMIÃO, I.D.F., *et al.* **Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects**. Medical Mycology, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2015.

GUTIERREZ, G.M.C., Freitas, D.F.S., do Valle, A.C.F., Almeida-Paes, R., Oliveira, M.M.E., Zancope-Oliveira, R.M., *et al.* **Epidemiological aspects of sporotrichosis epidemic in Brazil**. Current Fungal Infection Reports, v.9, n.4, p.238-245, 2015.

HATIPOGLU, N., Hatipoglu, H. **Combination antifungal therapy for invasive fungal infections in children and adults**. Expert review of anti-infective therapy, v.11, n.5, p.523-535, 2013.

HEIDRICH, D., Stopiglia, C.D.O., Senter, L., *et al.* **Sucesso terapêutico da terbinafina em um caso de esporotricose**. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 86 (4 Supl 1), p. 182-185, 2011.

HEKTON, L., Perkins, C.F. **Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus**. The Journal of experimental medicine, v.5, n.1, p.77-91, 1900.

ISHIDA, K. *et al.* **Efficacy of a poly-aggregated formulation of amphotericin B in treating systemic sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis***. Medical mycology, v. 56, n. 3, p. 288-296, 2017.

KAUFFMAN, C.A., Bustamante, B., Chapman, S.W., *et al.* **Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America**. Clinical Infectious Diseases, v.45, n.10, p.1255-1265, 2007.

LIU, S., Hou, Y., Chen, X., Gao, Y., Li, H., Sun, S. **Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery.** International journal of antimicrobial agents, v.43, n.5, p.395-402, 2014.

LOPES-BEZERRA, L. M., Schubach, A., & Costa, R. O. ***Sporothrix schenckii* and sporotrichosis.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.78, n.2, p.293-308, 2006.

LOPES-BEZERRA, L.M., Mora-Montes, H.M., Bonifaz, A. ***Sporothrix* and Sporotrichosis.** In: Current Progress in Medical Mycology. Springer, Cham. p.309-331, 2017.

LUTZ, A., Splendore, A. **Sobre uma micose observada em homens e ratos.** Revista Medica de São Paulo, v.21, p.433-450, 1907.

MAHAJAN, V.K. **Sporotrichosis: an overview and therapeutical options.** Dermatology research and practice, v. 2014, 2014: 272376.

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, v.45, n.10, p.3198-3206, 2007.

MARIMON, R.,Serena, C.,Gene, J., Cano, J. & Guarro, J. ***In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix schenckii*.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 52, n. 2, p. 732-734, 2008.

MARIO, D.A.N., Santos, R.C.V., Denardi, L.B.,Vaucher, R.A., Santurio, J.M., & Alves, S.H. **Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B.** Rev Iberoam Micol., v. 33, n.1, p.21-25, 2016.

MATA-ESSAYAG, S., Delgado, A., Colella, M.T., *et al.* **Epidemiology of sporotrichosis in Venezuela.** International journal of dermatology, v.52, n.8, p.974-980, 2013.

MEINERZ, A.R.M. **Avaliação da atividade *in vivo* e *in vitro* da terbinafina e itraconazol frente ao *Sporothrix schenckii*.** Porto Alegre. Tese [Doutorado] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ciências Veterinárias; 2007.

MONTENEGRO, H., Rodrigues, A.M., Dias, M.A.G., da Silva, E.A., Bernardi, F. & de Camargo, Z.P. **Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil.** BMC veterinary research, v. 10, n. 1, p. 269, 2014.

OLIVEIRA, D.C. *et al.* **Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil.** Journal of clinical microbiology, v.49, n.8, p.3047-3049, 2011a.

OLIVEIRA, M.M., Paes, R.A., Muniz, M.M., Galhardo, M.C.G., Oliveira, R.M.Z. **Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil.** Mycopathologia, v.172, n.4, p 257-267, 2011b.

OLIVEIRA, M.M.; Santos, C., Sampaio, P., Romeo, O., Almeida-Paes, R., Pais, C., Lima, N., Zancopé-Oliveira, R.M. **Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex.** Research in microbiology, v.166, n.2, p.102-110, 2014.

OROFINO-COSTA, R., *et al.* **Sporotricose: atualização sobre epidemiologia, etiopatogenia, laboratório e terapêutica clínica.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v.92, n.5, p.606, 2017.

ORTIZ, B.M., Burgos, L.G., Lacarrubba, L.F., **Esporotricosis cutáneo-linfangítica. Reporte de un caso pediátrico.** Pediatría (Asunción), v.40, n.1, p.45-49, 2017.

PAIXÃO, A.G., Galhardo, M.C., Almeida-Paes, R., Nunes, E.P., Goncalves, M.L., Chequer, G.L., *et al.* **The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS.** AIDS research and therapy, v.12, n.1, p.16, 2015.

PERLIN, D.S., Rautemaa-Richardson, R., Alastruey-Izquierdo, A. **The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management.** The Lancet Infectious Diseases, v.17, n.12, p.383-392, 2017.

PINA-VAZ, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Martinez-De-Oliveira, J., Fonseca, A.F., Mårdh, P.A. **Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species.** Journal of medical microbiology, v.49, n.9, p.831-840, 2000.

PINHATI, H.M.S., Casulari, L.A., Souza, A.C.R., Siqueira, R.A., Damasceno, C.M.G., Colombo, A.L. **Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit.** BMC infectious diseases v.16, n.1, p.433, 2016.

POESTER, V.R. *et al.* **Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic?.** Zoonoses and public health, v. 65, n. 7, p. 815-821, 2018.

RAMÍREZ-SOTO, M.C. **Sporotrichosis: The Story of an endemic region in Peru over 28 years (1985 to 2012).** PLoS ONE, v.10, n.6, 2015.

ROCHETTE, F., Engelen, M., Vanden, B.H. **Antifungal agents of use in animal health-practical applications.** Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, v. 26, n. 1, p. 31-53, 2003.

RODRIGUES, A.M. **Taxonomia polifásica e características proteômicas do complexo *Sporothrix schenckii*** [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2010. Disponível em: <<http://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/10102/Publico-10102.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 17 de outubro de 2017.

RODRIGUES, A.M., de Hoog, G.S., de Camargo, Z.P. ***Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission.** PLoS Pathogens, v.12 n.7, 2016.

RODRIGUES, A.M., De Hoog, G.S., Pires, D.C.,Brilhante, R.S., Sidrim, J.J., Gadelha, M.F., Colombo, A.L. & Camargo, Z.P. **Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis.** BMC infectious diseases, v. 14, n. 1, p. 219, 2014.

RODRIGUES, A.M., de Hoog, S., de Camargo, Z.P. **Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex.** Medical Mycology, v.51, n.4, p.405-412, 2013.

RODRIGUES, A.M., de Hoog, S., de Carmargo, Z.P. **Molecular diagnosis oh pathogenic *Sporothrix* species.** PLoS neglected tropical diseases, v.9, n.12, 2015.

ROSATO, A., Catalano, A., Carocci, A., Carrieri, A., Carone, A., Caggiano, G., *et al.* ***In vitro* interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory**

**drugs on biofilms of *Candida* spp.** Bioorganic & medicinal chemistry, v.24, n.5, p.1002-1005, 2016.

SANGLARD, D. **Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens.** Frontiers in medicine, v. 3, p. 11, 2016.

SCHUBACH, A., Barros, M.B., Wanke, B. **Epidemic sporotrichosis.** Current opinion in infectious diseases, v. 21, n. 2, p. 129-133, 2008.

SCHUBACH, T.M.P., Schubach, A.O., Barros, T.M.B.L.K., Figueiredo, F.B., Cuzzi, T., Fialho-Monteiro, P.C., Reis, R.S., Perez, M.A.. **Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001).** Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 224, n. 10, p. 1623-1629, 2004.

SHARMA, M., Biswas, D., Kotwal, A., *et al.* **Ibuprofen-mediated reversal of fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida*.** Journal of Clinical and Diagnostic Research, v. 9, n. 1, p. DC20, 2015.

SILVA, R.R., Telles, L.A., Martins, R.M. **Pulmonary Sporotrichosis: case report.** Revista Rede de Cuidados em Saúde, 2017.

STERLING, J.B., Heymann, W.R. **Potassium iodide in dermatology: a 19th century drug for the 21st century—uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications.** Journal of the American Academy of Dermatology, v. 43, n. 4, p. 691-697, 2000.

STOPIGLIA, C.D.O., Magagnin, C.M., Castrillón, M.R., Mendes, S.D.C., Heidrich, D., Valente, P. & Scroferneker, M.L. **Antifungal susceptibility and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil.** Medical mycology, v. 52, n. 1, p. 56-64, 2014.

TÉLLEZ, M.D., Batista-Duharte, A., Portuondo, D., Quinello, C., Bonne-Hernández, R., Carlos, I.Z. ***Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity.** Microbiology, v.160, n.11, p.2352-2365, 2014.

TORRES-MENDOZA, B. M., VAZQUEZ-VALLS, E., GONZALEZ-MENDOZA, A. **Effect of potassium iodide on the immune response in the sporotrichosis.** Revista iberoamericana de micologia, v. 14, n. 3, p. 98-100, 1997.

VETTORATO, R., *et al.* **Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: Case report.** Medical mycology case reports, v. 19, p. 18-20, 2018.

VIANA, P.G.; Figueiredo, A.B.F.; Gremião, I.D.F.; de Miranda, L.H.M.; da Silva Antonio, I.M.; Boechat, J.S.; de Sá Machado, A.C.; de Oliveira, M.M.E.; Pereira, S.A. **Successful treatment of canine sporotrichosis with terbinafine: Case reports and literature review.** Mycopathologia, v.183, n.2, p.471–478, 2018.

YANG, S., Liao, Y., Cong, L., Lu, X., Yang, R. ***In Vitro* interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*.** PLoS ONE, v.11, n.6, 2016.

ZHAO, M.D., Zhou, X., Liu, T.T., *et al.* **Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex.** Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, v. 16, n. 11, p. 940-947, 2015.

## ANEXOS

### Normas da revista

#### PREPARING THE SUBMISSION

##### Cover Letters

Cover letters are not mandatory; however, they may be supplied at the author's discretion, and may be kept short.

##### Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

##### Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#));
- ii. A short running title of less than 50 characters;
- iii. The full names of the authors;
- iv. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- v. Acknowledgments;
- vi. Statement of Author Contributions;
- vii. Conflict of Interest Statement;
- viii. Abstract and keywords;
- ix. Main text;
- x. References;
- xi. Tables (each table complete with title and footnotes);
- xii. Figure legends;
- xiii. Appendices (if relevant).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

##### Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the [Editorial Policies and Ethical Considerations section](#) for details on eligibility for author listing.

A statement of author contributions must be included, e.g.:

Author contributions: A.S. and K.J. conceived the ideas; K.J. and R.L.M. collected the data; R.L.M. and P.A.K. analysed the data; and A.S. and K.J. led the writing.

##### Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. If the authors submit in the name of a research group, whose further members have

contributed data, these can be separately acknowledged as “collaborators”, both in the manuscript and in the metadata entered in Scholar One. Please note that the name of the group should, in this case, appear after the authors, and, identically, in the header of the acknowledgement footnote. In addition to collaborator names, their institution and address should be entered, as with authors proper. This enables transfer of the set of collaborators in Medline, where they can be retrieved. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

### **Conflict of Interest Statement**

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section ‘Conflict of Interest’ in the [Editorial Policies and Ethical Considerations section](#) below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

### **Abstract**

Normally in less than 250 words, this should indicate clearly the scope and main conclusions of the paper. Original articles should have a structured abstract, comprising the five headings: Background, Objectives, Patients/Methods, Results and Conclusions.

### **Keywords**

Please provide eight keywords. Keywords should preferably be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh).

### **Main Text**

- Authors should aim for a concise readable style. Spelling should follow the *Concise Oxford Dictionary*, and *The Oxford Dictionary for Writers and Editors*. The Editors reserve the right to make corrections, both literary and technical, to the papers.
- All pages must be numbered consecutively in the upper right-hand corner of each page., starting with the title page as p.1.
- Continuous line numbers must be added throughout the manuscript. Do not begin with line 1 on each page.
- Papers should be divided into sections headed Introduction; Materials and methods (or patients and methods/subjects and methods if human patients/subjects were used); Results; Discussion. Avoid an excess of sub-headings - two further divisions, if necessary, should be adequate.
- The introduction should explain why the work was done and briefly introduce the scope and contents of the paper. Essential details should be included in materials and methods, including experimental design and statistical analysis. Results should be recorded in the past tense. The discussion should present the author's results in the broader context of other work on the subject. Acknowledgements should be as brief as possible.
- Authors must include an Ethics Statement in the the methods section. For details on what to include in this statement, see the section [Ethics Statement](#) in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below.

## References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. For more information about AMA reference style please consult the [AMA Manual of Style](#)

Sample references follow:

### *Journal article*

1. Mathur P, Hasan F, Singh PK, Malhotra R, Walia K, Chowdhary A. Five-year profile of candidaemia at an Indian trauma centre: High rates of *Candida auris* blood stream infections. *Mycoses*. 2018; 61: 674– 680.

### *Book*

2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

### *Chapter from a book*

3. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, In *PCR Protocols and Applications: A Laboratory Manual*. New York, NY: Academic Press; 1990:315-322.

### *Internet document*

4. FORWARD Act for antifungals. New US initiative: Finding Orphan-disease Remedies with Antifungal Research & Development. 2018. <https://www.ecmm.info/wp-content/uploads/FORWARD-BILLS-115hr6562ih.pdf> Accessed March 3, 2003

## Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Numerical results should be expressed as means with the relevant standard errors and/or statistically significant differences, quoting probability levels (P-values). Three significant figures are usually sufficient for mean values and standard errors should be quoted two or three more decimals than the mean.

The only lines appearing in the table should be horizontal and all decimals should be aligned in columns. The placement of all tables should be indicated in the text, being referred to as Table 1 or Tables 2 and 3.

## Figure Legends

Legends should consist of a short title together with a brief explanatory paragraph. They should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable

without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Acceptable symbols for experimental points are  $\mu$ ,  $r$ ,  $o$ ,  $\sim$ ,  $p$ ,  $\phi$ . The symbols  $+$  and  $\times$  will not be accepted.

Photomicrographs should state the original magnification.

The position of all figures should be indicated in the text and should be referred to as Fig. 1 or Figs 1 and 3. Figure 1 should be written out in full if at the beginning of a sentence.

## Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

[Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

**Color Figures.** Figures submitted in color may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

## Data Citation

In recognition of the significance of data as an output of research effort, Wiley has endorsed [the FORCE11 Data Citation Principles](#) and is implementing a mandatory data citation policy. Wiley journals require data to be cited in the same way as article, book, and web citations and authors are required to include data citations as part of their reference list.

Data citation is appropriate for data held within institutional, subject focused, or more general data repositories. It is not intended to take the place of community standards such as in-line citation of GenBank accession codes.

When citing or making claims based on data, authors must refer to the data at the relevant place in the manuscript text and in addition provide a formal citation in the reference list. We recommend the format proposed by the [Joint Declaration of Data Citation Principles](#):

[dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)