

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PRISCILA NATÁLIA PINTO

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix brasiliensis*
FRENTE À BASES DE SCHIFF PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS
FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA**

BELO HORIZONTE
2021

PRISCILA NATÁLIA PINTO

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix brasiliensis*
FRENTE À BASES DE SCHIFF PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS
FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Moura Keller

Co-orientadoras:

Profa. Dra. Camila Stefanie Fonseca de Oliveira

Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart

Belo Horizonte
2021

Pinto, Priscila Natália, 1993 -

P659a Avaliação da sensibilidade in vitro de *Sporothrix brasiliensis* frente à bases de Schiff para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esporotricose felina/ Priscila Natália Pinto. - 2021.

91 f.:il

Orientadora: Kelly Moura Keller

Coorientadoras: Camila Stefanie Fonseca de Oliveira

Gisele Assis Castro Goulart

Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Bibliografias: f.: 75 a 91.

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Natália Pinto

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 23 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Kelly Moura Keller - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Gisele Assis Castro Goulart

Dr.(a). Débora Cristina Sampaio de Assis

Dr.(a). Águida Aparecida de Oliveira



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Kelly Moura Keller, Professora do Magistério Superior**, em 23/03/2021, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Águida Aparecida de Oliveira, Usuário Externo**, em 23/03/2021, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Debora Cristina Sampaio de Assis, Professora do Magistério Superior**, em 23/03/2021, às 21:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



logotipo

Documento assinado eletronicamente por **Gisele Assis Castro Goulart, Professora do Magistério Superior**, em 24/03/2021, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



QRCode

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o Assinatura código verificador **0636080** e o código CRC **79C2E88F**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, por todo apoio e incentivo desde o início, principalmente à minha mãe, que sempre esteve ao meu lado.

À professora Kelly, por te me acolhido no momento que mais precisei, com tanto carinho e atenção, me oferecendo um projeto e estrutura para realizá-lo. Sempre esteve disposta a me ouvir e ajudar no que eu precisasse. Só tenho a agradecer pela oportunidade que você me deu!

A todos os componentes do LAMICO, especialmente à Gabi, Lou e Mari, que me acolheram e me ensinaram muitas coisas desde que cheguei ao laboratório. E ao Raul e a Salene, que são muito queridos.

À Mari, especialmente por ter se tornado uma grande amiga, sempre me incentivando a seguir em frente e disposta a ajudar. Graças à sua ajuda na parte experimental e escrita, eu consegui concluir este trabalho. Jamais terei como retribuir tudo que fez por mim desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório.

À profa. Bel, que sempre foi solícita e disposta a ajudar. À Luana, que me instruiu na realização da parte experimental.

À profa. Camila Stefanie, minha co-orientadora, que auxiliou muito na parte estatística.

À profa. Gisele, por ter sido minha co-orientadora, e ao prof. Ângelo, que disponibilizou as bases de Schiff avaliadas nesse trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia do prof. Daniel do ICB, especialmente o Gustavo, por me treinar na realização das avaliações *in vitro*.

A todos os professores do DMVP, que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional.

A todos os técnicos que de alguma forma me auxiliaram durante meu mestrado.

A todos os funcionários do DMVP, especialmente às moças da limpeza, que proporcionam um ambiente limpo para trabalharmos; e aos porteiros, que sempre são atenciosos.

Ao CNPq, por me proporcionar a bolsa de estudos, viabilizando a realização do mestrado com dedicação exclusiva.

À UFMG, especialmente à Escola de Veterinária e ao PPGCA, por oferecer a oportunidade de realizar o mestrado.

*A persistência é o caminho do êxito.
Charles Chaplin*

RESUMO

Sporothrix brasiliensis é o principal agente da esporotricose felina zoonótica no Brasil. Dada a escassez de opções para o tratamento da esporotricose felina e a atividade antifúngica promissora das bases de Schiff, este estudo teve como objetivo avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* frente à diferentes bases de Schiff, tendo o itraconazol como fármaco controle. Dez isolados clínicos de *S. brasiliensis* em sua forma filamentosa e leveduriforme foram submetidos ao método de microdiluição em caldo para avaliar a suscetibilidade a doze bases de Schiff derivadas da 4-aminodifenilamina. As concentrações avaliadas variaram de 1 a 128 mg/L, tendo o itraconazol (0,125 -16 mg/L) como controle. Foi adotado o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) com modificações (M38-A2 e M27-A3). Dentre as doze bases de Schiff avaliadas, a codificada como 7F3 apresentou o melhor resultado para a forma filamentosa, com concentração inibitória mínima (*minimum inhibitory concentration*, MIC) variando de 8-32 mg/L. Na sequência, as codificadas como 7G1 (MIC 16-64 mg/L), 7F6 (MIC 32-64 mg/L) e 7F2 (MIC 32-64 mg/L), também apresentaram resultados promissores. As bases 7F1, 7F2 e 7F6 foram mais eficazes para a forma leveduriforme, todos com MIC de 16-32 mg/L. Em relação ao itraconazol, houve uma diferença no perfil de suscetibilidade entre as formas filamentosas e leveduriforme. Os isolados de *S. brasiliensis* na forma filamentosa apresentaram sensibilidade de 100% ao itraconazol, com MIC \leq 0,125 mg/L. Porém, todos os isolados da forma leveduriforme apresentaram maior resistência ao itraconazol, com MIC de 4-8 mg/L. Na comparação pareada das bases de Schiff, a MIC observada para o itraconazol foi estatisticamente igual à MIC observada para a base 7F3 ($P>0,05$).

Palavras-chave: bases de Schiff, esporotricose felina, antifúngicos, concentração inibitória mínima, zoonose.

ABSTRACT

Sporothrix brasiliensis is the main agent of zoonotic feline sporotrichosis in Brazil. Due to the lack of options for the treatment of feline sporotrichosis and the promising antifungal activity of Schiff bases, this study aimed to evaluate an *in vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to different Schiff bases, with itraconazole as the control drug. Ten clinical isolates of *S. brasiliensis* in its filamentous and yeast form were prepared using the broth microdilution method to assess susceptibility to twelve Schiff bases derived from 4-aminodiphenylamine. The concentrations evaluated range from 1 to 128 mg/L, with itraconazole (0.125 -16 mg/L) as a control. The protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) with modifications (M38-A2 and M27-A3) was adopted. Among the twelve Schiff bases evaluated, the one classified as 7F3 shows the best result for the filamentous form, with minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 8-32 mg/L. In sequence, the coded as 7G1 (MIC 16-64 mg/L), 7F6 (MIC 32-64 mg/L) and 7F2 (MIC 32-64 mg/L), likewise also promising results. The bases 7F1, 7F2 and 7F6 were more effective for the yeast form, all with MIC of 16-32 mg/L. Regarding itraconazole, there was a difference in the susceptibility profile between filamentous and yeast forms. *Sporothrix brasiliensis* isolates in filamentous form presented 100% sensibility to itraconazole with MIC \leq 0.125 mg/L. However, all the of yeast forms isolates, presented resistance to itraconazole, with MIC 4-8 mg/L. In the paired comparison of Schiff bases it was observed that the MIC for itraconazole was statistically equal to the MIC for the 7F3 base ($P > 0.05$).

Keywords: Schiff bases, feline sporotrichosis, antifungal drugs, minimum inhibitory concentration, zoonosis.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Fórmula estrutural da anfotericina B..... | 26 |
| Figura 2 - | Fórmulas estruturais dos azóis..... | 29 |
| Figura 3 - | Fórmulas estruturais das equinocandinas..... | 36 |
| Figura 4 - | Fórmula estrutural da terbinafina..... | 37 |
| Figura 5 - | Fórmula estrutural da flucitosina..... | 38 |
| Figura 6 - | Fórmula estrutural de bases de Schiff com atividade antifúngica..... | 49 |
| Figura 7 - | Macroscopia de colônias filamentosas brancas (A) e marrom acastanhadas (B) de <i>Sporothrix brasiliensis</i> em meio Agar Sabouraud Dextrose (SDA), incubado em estufa a 25° C durante 7 dias..... | 53 |
| Figura 8 - | Macroscopia de colônias leveduriformes de <i>Sporothrix brasiliensis</i> em meio Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI), incubado em estufa a 37°C durante 48 horas..... | 54 |
| Figura 9 - | Microscopia óptica de <i>Sporothrix brasiliensis</i> | 54 |
| Figura 10 - | Fórmula estrutural das bases de Schiff derivadas de 4-aminodifenilamina..... | 56 |
| Figura 11 - | Representação esquemática da placa de microdiluição em caldo das bases de Schiff para determinação da concentração inibitória mínima..... | 64 |
| Figura 12 - | Representação esquemática da placa de microdiluição em caldo do itraconazol para determinação da concentração inibitória mínima..... | 65 |
| Figura 13 - | Histograma das distribuições de freqüências das concentrações inibitórias mínimas das bases de Schiff e do itraconazol avaliadas frente às cepas filamentosas de <i>S. brasiliensis</i> | 68 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 14 - | Histograma das distribuições de freqüências das concentrações inibitórias mínimas das bases de Schiff e do itraconazol avaliadas frente às cepas leveduriformes de <i>S. brasiliensis</i> | 69 |
|-------------|---|----|

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Concentrações das bases de Schiff e do itraconazol avaliadas nos estudos de microdiluição em caldo..... | 61 |
| Tabela 2 - | Estatística descritiva das concentrações inibitórias mínimas (MICs) obtidas para as bases de Schiff e do itraconazol frente às cepas fúngicas (filamentosas e leveduriformes) de <i>S. brasiliensis</i> | 67 |

LISTA DE SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - ágar infusão de cérebro e coração

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

EUA - Estados Unidos da América

EV - Escola de Veterinária

HE - Hessen

LAMICO - Laboratório de Micologia e Micotoxinas

MA - Massachusetts

MALDI-TOF - espectrometria de massa em tempo de voo por ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MIC - concentração inibitória mínima (*minimum inhibitory concentration*)

MO - Missouri

MOPS - ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

NaOH - hidróxido de sódio

P.A. - padrão analítico

PAS - ácido periódico de Schiff

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SDA - Ágar Sabouraud Dextrose

SP - São Paulo

UFC - unidade formadora de colônia

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE ABREVIATURAS

g - gramas
h – horas
kg – quilograma
L – litro
M - molar
mg - miligrama
mL – mililitros
nm – nanômetros

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Grau Celsius
μg - micrograma
μL - microlitro
μm- micrômetro
% - porcentagem

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 18 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 ESPOROTRICOSE FELINA | 19 |
| 3.2 TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA | 24 |
| 3.2.1 Poliênicos..... | 26 |
| 3.2.2 Azóis..... | 29 |
| 3.2.3 Equinocandinas | 35 |
| 3.2.4 Alilaminas..... | 36 |
| 3.2.5 Análogo de Pirimidina..... | 37 |
| 3.2.6 Iodetos | 38 |
| 3.2.7 Miltefosina e Produtos Naturais..... | 41 |
| 3.2.8 Outras Alternativas..... | 42 |
| 3.3 BASES DE SCHIFF COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS | 44 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 53 |
| 4.1 ISOLADOS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> | 53 |
| 4.2. BASES DE SCHIFF E ITRACONAZOL | 55 |
| 4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO RPMI 1640..... | 60 |
| 4.4 TESTES DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) | 60 |
| 4.4.1. Preparo das bases de Schiff e do itraconazol..... | 61 |
| 4.4.2 Controle de diluição. | 62 |
| 4.4.3 Preparo do inóculo leveduriforme..... | 62 |
| 4.4.4 Preparo do inóculo filamentoso | 62 |
| 4.4.5 Preparo da placa de microdiluição | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.6 Armazenamento das placas e leitura do teste | 65 |
| 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 66 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 67 |
| 6 CONCLUSÕES | 74 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 75 |

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea, causado por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix*, que acomete animais e humanos. Esta doença já foi relatada na Europa, Ásia, África, América do Norte, América do Sul e Oceania. Na América, as áreas endêmicas incluem o Uruguai, Peru, Colômbia, Costa Rica, México, Venezuela, Guatemala e Brasil (CHAKRABARTI et al., 2015; LOPES-BEZERRA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020). Atualmente a esporotricose é a principal micose subcutânea emergente diagnosticada no Brasil. A partir da década de 1990, com os primeiros relatos de surtos zoonóticos de esporotricose no Rio de Janeiro e em São Paulo, a doença se estabeleceu nesses territórios, sendo considerada uma hiperepidemia no município do Rio de Janeiro, expandindo-se para outros estados, com casos em animais e humanos relatados na maior parte da região Sul, Sudeste e em alguns estados do Norte e Nordeste (BARROS et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004; RODRIGUES et al., 2013; SANCHOTENE et al., 2015; LOPES-BEZERRA et al., 2018; GREMIÃO et al., 2020).

A esporotricose ocorre em todo o mundo, mas os agentes infecciosos não possuem distribuição uniforme. A etiologia das espécies envolvidas varia de acordo com a região geográfica, sendo 80% dos casos causados por uma única espécie (ZHANG et al., 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; LOPES-BEZERRA et al., 2018). No Brasil, há relatos de infecção por *S. schenckii stricto sensu*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2013). O agente etiológico predominante é *S. brasiliensis*, considerada a espécie mais virulenta do gênero e responsável pelo maior número de casos no Brasil, tanto em humanos como em outros animais (MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2007a; ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; FERNANDES et al., 2009; FERNANDES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013; ZHOU et al., 2013; STOPIGLIA et al., 2014; BOECHAT et al., 2018, RODRIGUES et al., 2020).

Antigamente, no Brasil, a esporotricose era considerada uma doença sapronótica, conhecida como doença do jardineiro, visto que a principal forma de contaminação era

por meio da inoculação traumática de esporos do fungo presentes no solo e plantas na pele do hospedeiro. Porém, desde 1998 tem ocorrido um aumento no número de casos de esporotricose zoonótica transmitida por gatos, principalmente nas regiões sul e sudeste. No entanto, apesar de ser uma doença emergente, ainda é considerada negligenciada e subnotificada, sendo a notificação obrigatória apenas em alguns municípios. O aumento e a disseminação dos casos de esporotricose no Brasil foram negligenciados por vários anos. Dificuldades socioeconômicas e ambientais, como desigualdade econômica e social, pobreza, desemprego, aglomeração urbana e saneamento básico precário, somadas a serviços de saúde escassos e inadequados, impulsionam essa expansão (GREMIÃO, et al. 2020). Com o passar dos anos, *S. brasiliensis* que era identificado somente no Brasil, vem se alastrando para outros países (ZHANG et al., 2015; GREMIÃO et al., 2020). Há relatos, na Argentina e no Paraguai e existe a preocupação de disseminação para outros países por meio do trânsito de animais doentes (CÓRDOBA et al., 2018; ETCHECOPAZ et al., 2020).

Os agentes terapêuticos recomendados para o tratamento da esporotricose felina têm sido, principalmente, o itraconazol, cetoconazol, anfotericina B e iodeto de potássio. Porém, esses fármacos apresentam diversas limitações, que muitas vezes favorecem o abandono do tratamento e a eutanásia. Uma das limitações é a resistência microbiana, causada pelo aumento na ocorrência de isolados altamente resistentes, acarretando a não resolução das lesões ou em recidivas. Outra limitação seria o alto custo do medicamento associado ao longo período de uso que podem levar o tutor a interromper antecipadamente o tratamento, sem garantia de erradicação da infecção. Por fim, esses fármacos são associados a vários efeitos adversos, como alterações hepáticas e renais. Desta forma, a busca por novos agentes antifúngicos se torna um importante alicerce no combate à doença (SUNDRIYAL; SHARMA; JAIN, 2006; PEREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; CHAVES et al., 2012; NAKASU et al., 2020).

Em geral, as bases de Schiff são moléculas interessantes no desenvolvimento de novos antifúngicos. Na literatura não há relatos da suscetibilidade dos fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix* a essa classe. No entanto, alguns compostos dessa classe apresentam atividade antifúngica contra fungos de importância clínica, como

Aspergillus, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma capsulatum* e dermatófitos. Assim, constitui objetivo deste trabalho a avaliação *in vitro* da sensibilidade de dez isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* frente a doze diferentes bases de Schiff derivadas da 4-aminodifenilamina. A partir dessas avaliações esperamos obter informações relevantes para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esporotricose felina, que sejam eficientes e apresentem um melhor custo-benefício em relação aos antifúngicos disponíveis no mercado atualmente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico de doze bases de Schiff derivadas da 4-aminodifenilamina a partir de estudos *in vitro*, frente a dez isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima das bases de Schiff derivadas de 4-aminodifenilamina, frente a isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* em sua forma filamentosa.
- Determinar a concentração inibitória mínima das bases de Schiff derivadas de 4-aminodifenilamina, frente a isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* em sua forma leveduriforme.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ESPOROTRICOSE FELINA

A esporotricose é uma doença micótica subaguda ou crônica que acomete a pele e tecido subcutâneo de animais e humanos, sendo causada por fungos termodimórficos pertencentes ao gênero *Sporothrix* que englobam 53 espécies (RODRIGUES et al., 2020). As espécies são classificadas em dois clados (patogênico e ambiental), incluindo um grupo monofilético de espécies bem definidas, com diferentes comportamentos clínicos, diferindo entre si nas vias de transmissão, virulência, distribuição geográfica e suscetibilidade a antifúngicos (DE BEER et al., 2003; MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2007a; RODRIGUES et al., 2014b; ZHANG et al., 2015; CHEN et al., 2016; DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016; RODRIGUES et al., 2020). O clado patogênico compreende as espécies de maior importância clínica para animais e humanos, sendo *S. schenckii stricto sensu*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei*, pertencentes a este grupo (DE BEER et al., 2003; ZHANG et al., 2015; DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016; LOPES-BEZERRA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020). O clado ambiental é formado pelos complexos *S. gossypina*, *S. stenoceras*, *S. inflata*, *S. candida* e *S. pallida*. As espécies pertencentes a este clado estão frequentemente relacionadas à contaminação do solo, plantas e matéria orgânica em decomposição, sendo raramente associadas a doenças em animais e humanos. As espécies de maior importância para animais e humanos dentro do clado ambiental, pertencem ao complexo *S. pallida*, sendo as espécies *S. pallida*, *S. chilensis*, *S. humicola* e *S. mexicana* as principais (DE BEER et al., 2003; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2013; ZHANG et al., 2015; DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016; RODRIGUES et al., 2016; MAKRI et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020).

De um modo geral, as espécies do gênero *Sporothrix* são onipresentes no ambiente, sendo encontrados comumente em vegetações, solos, madeiras, matérias orgânicas em decomposição e patógenos de plantas. São considerados fungos

termodimórficos por apresentarem formas distintas no ambiente e no hospedeiro. No meio ambiente (25°C a 28°C) ou em meio de cultura a 25°C, multiplica-se na sua forma filamentosa, produzindo abundantes conídios. Porém, em parasitismo, ou em meio de cultivo a 37°C, encontram-se na forma leveduriforme. A transmissão ocorre por meio do implante traumático do fungo na pele. Portanto, para que a infecção se estabeleça, é preciso que exista uma lesão prévia na epiderme (GREMIÃO et al., 2017). Existem duas formas de transmissão, sendo elas a transmissão zoonótica e a transmissão sapronótica.

A transmissão zoonótica de *Sporothrix* ocorre através da contaminação direta do hospedeiro por arranhadura ou mordedura de gatos doentes ou pelo contato direto da pele ou mucosa lesionada com lesões e secreções de animais doentes (GREMIÃO et al., 2017). Essa forma de transmissão diferencia claramente o Brasil de outros surtos em todo o mundo, que geralmente estão relacionados às condições ambientais, denominada de transmissão sapronótica, onde ocorre a contaminação direta do hospedeiro através de perfurações com matéria vegetal contendo conídios de *Sporothrix*. A transmissão sapronótica tem um forte caráter ocupacional, por afetar principalmente pessoas em atividade profissional ou recreativa na jardinagem, agricultura, floricultura, etc. Já a transmissão zoonótica tem um forte caráter ocupacional principalmente ao contato com animais, especialmente gatos, como veterinários e proprietários. No entanto, em áreas carentes de saneamento básico, com abandono de animais e falta de guarda responsável, mais pessoas correm o risco de adquirir esporotricose zoonótica devido à proximidade entre humanos e gatos (RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014b; RODRIGUES et al. 2020).

Segundo dados do Instituto Pet Brasil (IPB), o número de gatos nas famílias brasileiras vem aumentando nos últimos anos. A população de gatos no Brasil em 2018 foi estimada em 23,9 milhões, sendo a região sudeste com a maior concentração de gatos no país (INSTITUTO PET BRASIL, 2019). Parte dos gatos é criado com livre acesso à rua, muitos vinculados aos domicílios somente para se alimentarem e, ainda, mantidos com objetivo de controle de roedores. Muitos desses animais não são castrados e, por isso, apresentam maior suscetibilidade à infecção pelo fungo. A esterilização cirúrgica pode contribuir para a redução de comportamentos de risco

inerentes a esses animais, como brigas por disputas territoriais e por fêmeas, deslocamentos por grandes extensões espaciais e acasalamento que proporcionam a disseminação do fungo (SANTOS, et al. 2018).

Há relatos de infecções em outros animais, como primatas, canídeos, equinos, muares, bovinos, camelídeos, caprinos, suínos, aves, tatus, marsupiais, peixes, golfinhos e artrópodes (abelhas, pulgas, formigas), que podem, eventualmente, servir como fonte de infecção para outros animais e humanos (MIGAKI et al., 1978; HADDAD et al., 2002; CROTHERS et al., 2009; LARSSON, 2011, COIACETTO, et al. 2019). Porém, os gatos, são os mais afetados pela esporotricose e os principais envolvidos na transmissão zoonótica, por apresentarem uma alta carga de células leveduriformes nas lesões e devido aos hábitos de arranhadura em árvores, mobilidade e brigas, principalmente dos machos. Além disso, a resistência térmica exibida por *S. brasiliensis* pode ser um importante mecanismo de adaptação aos gatos, que possuem temperatura corporal em torno de 39°C, o que sugere parcialmente o sucesso da infecção desta espécie quando comparada a outras espécies como, por exemplo, *S. globosa* que é sensível a temperaturas acima de 35°C (DUNSTAN et al., 1986; SCHUBACH et al., 2001; BARROS et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004; DE SOUZA et al., 2006; DE MIRANDA et al., 2018).

Nos felinos, o surgimento de uma lesão inicial no local da inoculação após a infecção pode variar de dias a semanas (LARSSON et al., 1989; LARSSON, 2011). O fungo pode se disseminar por meio de autoinoculação enquanto o felino se coça ou se lambe, modo pelo qual coloniza unhas e cavidade oral (SCHUBACH et al., 2001). A apresentação clínica pode variar de infecção subclínica, com lesões cutâneas únicas ou múltiplas até formas sistêmicas fatais com ou sem sinais extra-cutâneos e respiratórios, dependendo da via de transmissão, da espécie de *Sporothrix* e da resposta imune do hospedeiro (OROFINO-COSTA et al., 2017).

No entanto, o que mais se observa na prática clínica são quadros com múltiplas lesões cutâneas, com envolvimento de mucosas, principalmente do aparelho respiratório. Na forma cutânea as lesões apresentam características nodulares, com presença de alopecia, muitas vezes ulcerada e com secreção serosa a sanguinolenta, com

formação de crostas, comumente observada na região cefálica, incluindo o nariz, pavilhão auricular e periocular, além do dorso, tronco e membros. Em alguns casos, pode ocorrer comprometimento respiratório, ocasionando edema de plano nasal e espirros frequentes (SCHUBACH et al., 2004; PEREIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2018; GONDIM; LEITE, 2020; NAKASU et al., 2020).

Outras alterações, como conjuntivite (DA SILVA et al., 2008) e otite externa (MASCARENHAS et al., 2019) foram relatadas. O envolvimento sistêmico é frequentemente descrito, mesmo em animais imunocompetentes, independentemente de qualquer coinfeção, como o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e o Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (GREMIÃO et al., 2014; MIRANDA et al., 2015; MIRANDA et al., 2018). Quando ocorre a disseminação da doença, podem incidir anormalidades oculares, neurológicas e linfáticas, além de alterações sistêmicas inespecíficas, como letargia, anorexia, febre, desidratação, podendo evoluir para óbito (SCHUBACH et al., 2004; PEREIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2018; GONDIM; LEITE, 2020).

Atualmente, existem vários métodos para o diagnóstico da esporotricose felina. Entretanto, o método considerado padrão ouro é o isolamento e identificação de *Sporothrix* de amostras biológicas, como tecidos e exsudatos. O isolamento inicial deve ser feito com repique do material clínico em meio ágar Sabouraud Dextrose (SDA), ou ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e ciclohexamida, à temperatura de 25°C. As colônias filamentosas, geralmente são visíveis dentro 5 a 15 dias. Macroscopicamente, as colônias filamentosas são inicialmente pequenas e claras, e tendem a ficar marrom, cinza escuro ou quase preto dentro de uma a duas semanas. Microscopicamente apresentam delicadas hifas finas, septadas e hialinas (1–2 µm de diâmetro), apresentando dois tipos de conídios. Os conídios hialinos de parede fina são conhecidos como conídios primários ou simpáticos, e os conídios com paredes espessadas marrom, encontrados em toda extensão das hifas são denominados de conídios sésseis. Os conídios são geralmente ovais a elípticos e estão dispostos em forma de arranjo de flor, parecendo margaridas. A colônia filamentosa obtida deve ser cultivada em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) a uma temperatura de 35 a 37°C, para reversão da forma leveduriforme durante 38 a 72 horas. A demonstração de dimorfismo ajuda a confirmar

a identidade de *Sporothrix*. As colônias macroscópicas de leveduras possuem coloração esbranquiçada a amarelo-acinzentado. Microscopicamente, essas colônias são compostas de células redondas ou ovais, de brotamento múltiplo, semelhantes aos observados em esfregaços diretos de gatos infectados (OUROFINO-COSTA et al., 2017; ARENAS et al., 2018).

O exame citopatológico de esfregaços de impressão das lesões utilizando hidróxido de potássio (KOH) em diluições de 10 a 40% ou coloração diferencial [coloração de GRAM, ácido periódico de Schiff (PAS) e Giemsa], consiste na identificação de estruturas leveduriformes, ovais e alongadas, em formato de charuto, através da visualização direta. Este método tem sido utilizado rotineiramente como triagem, pois tem demonstrado alta sensibilidade devido à alta carga fúngica de leveduras presente no exsudato de lesões de pele de gatos, sendo um método rápido, simples e de baixo custo para o diagnóstico presuntivo de esporotricose em felinos (PEREIRA et al., 2011; ARENAS et al., 2018; SILVA et al., 2018).

A sorologia pode ser uma ferramenta auxiliar, especialmente como triagem para o diagnóstico de formas clínicas que se assemelham a outras doenças cutâneas, como leishmaniose; quando o acesso ao material parasitado é difícil e quando se trata de outra espécie que não a felina, pois o número de células nas lesões é menor, assim como para o monitoramento do tratamento. A maioria dos casos requer apenas uma amostra de soro e é possível fazer uma presunção diagnóstica de infecção recente ou ativa. Portanto, a sorologia desempenha um papel fundamental na compreensão da prevalência e transmissão deste fungo em áreas endêmicas e pode também orientar o tratamento da doença (OUROFINO-COSTA et al., 2017).

A histopatologia é uma ferramenta auxiliar de diagnóstico que revela através da lesão de pele, um processo inflamatório granulomatoso e piogênico, com presença de leveduras arredondadas, ovais ou em forma de charuto, às vezes cercadas por material eosinofílico, constituindo o corpo asteróide. Exames de exsudato de lesões de pele frequentemente revelam numerosas leveduras em forma de charuto em macrófagos e neutrófilos, ou no ambiente extracelular (MIRANDA et al., 2013; SILVA et al., 2018).

Os métodos moleculares oferecem um diagnóstico preciso, quando se trata de identificação de espécies, auxiliando nas escolhas apropriadas de tratamentos e avaliações de risco zoonótico. Sequenciamento de ácido desoxirribonucleico (DNA), associado à análise filogenética tem sido o método de referência para reconhecimento das espécies de *Sporothrix* e são baseados em sequências de DNA armazenadas em locos genômicos que codificam proteínas, como calmodulina, beta-tubulina e fator de alongamento da tradução. Das tecnologias de diagnósticos atualmente disponíveis, predominam os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), por apresentarem maior sensibilidade e especificidade entre as espécies de *Sporothrix* em comparação com os testes fenotípicos (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2015; ARENAS et al., 2018). Outro método utilizado com confiabilidade e precisão para identificação rápida e específica, em nível de espécie para isolados de *Sporothrix*, tem sido a espectrometria de massas em tempo de voo por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) (OLIVEIRA et al., 2015).

3.2 TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA

O tratamento da esporotricose em felinos é complicado devido à sensibilidade dessa espécie a medicamentos específicos, ao longo período de terapia antifúngica e à morte de pacientes graves e imunocomprometidos antes de completar o primeiro mês de tratamento, decorrente da gravidade das lesões e do diagnóstico tardio. A terapia utilizada para o tratamento da esporotricose felina é variada e depende de alguns fatores, tais como a gravidade da doença, a localização e extensão das lesões, status imunológico do paciente e espécie de *Sporothrix* envolvida (PEREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2014; NAKASU et al., 2020).

Existem alguns fatores que favorecem o abandono do tratamento e até mesmo a opção por parte do tutor à eutanásia, como a necessidade de tratamento prolongado e regular; a dificuldade dos tutores na administração de medicamentos por via oral em gatos; o número de agentes antifúngicos orais disponíveis no mercado; a toxicidade e efeitos colaterais associados aos fármacos; o custo elevado de alguns medicamentos; o

risco da aquisição da doença por um membro da família; além da ocorrência de recidivas que podem dificultar a cura da esporotricose (DUNSTAN et al., 1986; NOBRE et al., 2002; BARROS et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004; GREMIÃO et al., 2006; SUNDRIYAL; SHARMA; JAIN, 2006; PEREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; CHAVES et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; NAKASU et al., 2020).

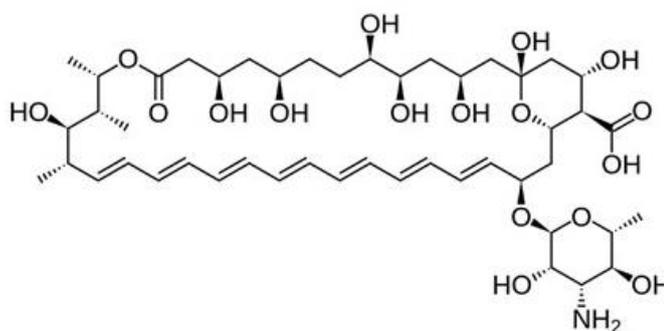
Alguns fatores podem dificultar o tratamento e influenciar no tempo de cicatrização das lesões. De acordo com De Souza et al. (2018), a idade dos gatos pode estar relacionada a um maior tempo de cicatrização ou insucesso terapêutico. Segundo os autores, gatos com menos de dois anos apresentam granulomas com alta carga fúngica nas lesões cutâneas e alterações histológicas cutâneas sugestivas de uma resposta imunodeficiente, com reduzido número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Além disso, a ocorrência de sinais respiratórios, lesões na mucosa nasal e lesões cutâneas com granulomas de elevada carga fúngica são preditores de falha no tratamento. O baixo suprimento sanguíneo no plano nasal torna essa região de difícil tratamento, devido à dificuldade de o medicamento alcançar essa área em concentração suficiente para impedir a total multiplicação das leveduras. Devido a isso, a região nasal tem sido a mais relatada como apresentando lesões refratárias à terapia antifúngica (GREMIÃO et al., 2011; REIS et al., 2012; GREMIÃO et al., 2014; DE SOUZA et al., 2018; NAKASU et al., 2020).

Atualmente, existem cinco classes de agentes antifúngicos utilizados, sendo eles: poliênicos, azóis (imidazóis e triazóis), equinocandinas, alilaminas e análogo de pirimidina. Os iodetos de sódio e potássio também têm sido uma alternativa. Outros fármacos, como a miltefosina e produtos naturais têm sido relatados. Além disso, técnicas como excisão cirúrgica das lesões, termoterapia localizada, fotomodulação a laser de baixa potência e criocirurgia podem ser utilizadas como alternativa para auxiliar no tratamento (PEREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2014).

3.2.1 Poliênicos

Agentes poliênicos ligam-se a esterol na membrana plasmática dos fungos, principalmente ao ergosterol, resultando no aumento da permeabilidade e extravazamento de componentes intracelulares, levando à morte fúngica (GINTJEE; DONNELLEY; THOMPSON, 2020). Dentro dessa classe, a anfotericina B (Figura 1) tem sido relatada no tratamento da esporotricose felina disseminada.

Figura 1 – Fórmula estrutural da anfotericina B.



Fonte: PubChem.

Estudos *in vitro* demonstraram que a anfotericina B apresenta diversificados valores de concentração inibitória mínima, mas boa ação contra alguns isolados das principais espécies patogênicas de *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007b; SILVEIRA et al., 2009; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014a; BRILHANTE et al., 2016; CÓRDOBA et al., 2018).

Em um estudo *in vivo* conduzido por Ishida et al. (2015) foram avaliadas a eficácia e segurança de três esquemas terapêuticos para tratamento da esporotricose causada por *S. brasiliensis*, utilizando modelo murino. Os autores utilizaram um isolado felino altamente virulento de *S. brasiliensis*. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1 mg/kg/dia de anfotericina B por via intravenosa por 7 dias (grupo 1); 75 mg/kg/dia de itraconazol por via oral por até 30 dias (grupo 2); e a associação do primeiro tratamento com anfotericina B seguido pelo segundo tratamento com

itraconazol (grupo 3) e camundongos não tratados (grupo 4, controle). O tratamento com anfotericina B sozinho, ou seguido por itraconazol, mostrou maior eficácia, levando a uma taxa de sobrevivência de 100% dos camundongos em 45 dias. Por outro lado, nenhum camundongo tratado com itraconazol sozinho sobreviveu por mais de 42 dias. Tanto a anfotericina B sozinha, quanto seguida pelo itraconazol, levaram a uma redução significativa (30% a 40%) na carga fúngica em todos os órgãos analisados em comparação com o grupo não tratado. O tratamento com itraconazol foi o menos eficiente na redução da carga fúngica. Aos 12 dias pós-inoculação, a carga de fungos em todos os órgãos examinados de camundongos submetidos ao tratamento com itraconazol foi semelhante ao observado em camundongos não tratados.

Poucos são os relatos sobre a utilização da anfotericina B intravenosa no tratamento da esporotricose felina e praticamente todos descrevem insucesso do tratamento. Nusbaum et al. (1983) relataram um caso em que o gato foi submetido à eutanásia devido a sinais neurológicos durante a terapia combinada de anfotericina B intravenosa e flucitosina. Dunstan et al. (1986) relataram um caso de um felino com esporotricose disseminada, tratado com anfotericina B intravenosa por uma semana. O animal não apresentou melhora do quadro clínico e foi eutanasiado. Em outro relato, o uso da anfotericina B foi limitado pela nefrotoxicidade, apesar do animal apresentar uma resposta inicial satisfatória (MACKAY et al., 1986).

Portanto, a administração intravenosa da anfotericina B em gatos torna-se limitada devido aos efeitos adversos relatados, como trombose das veias cefálica e jugular e nefrotoxicidade, além da escassez de relatos de sucesso terapêutico (MALIK et al., 1996). Com base nesses dados, alguns autores testaram a aplicação intralesional e subcutânea de anfotericina B em gatos com esporotricose e obtiveram sucesso no tratamento associado com itraconazol oral com poucos efeitos colaterais (GREMIÃO et al., 2014). Gremião et al. (2009) descreveram a administração de anfotericina B intralesional em combinação com itraconazol oral em um gato com esporotricose que apresentou lesão cutânea refratária persistente na região nasal após nove meses de tratamento com itraconazol oral (20 mg/kg/dia). A anfotericina B foi diretamente

infiltrada na lesão, sendo aplicada uma vez por semana até a regressão completa, que ocorreu após a terceira aplicação.

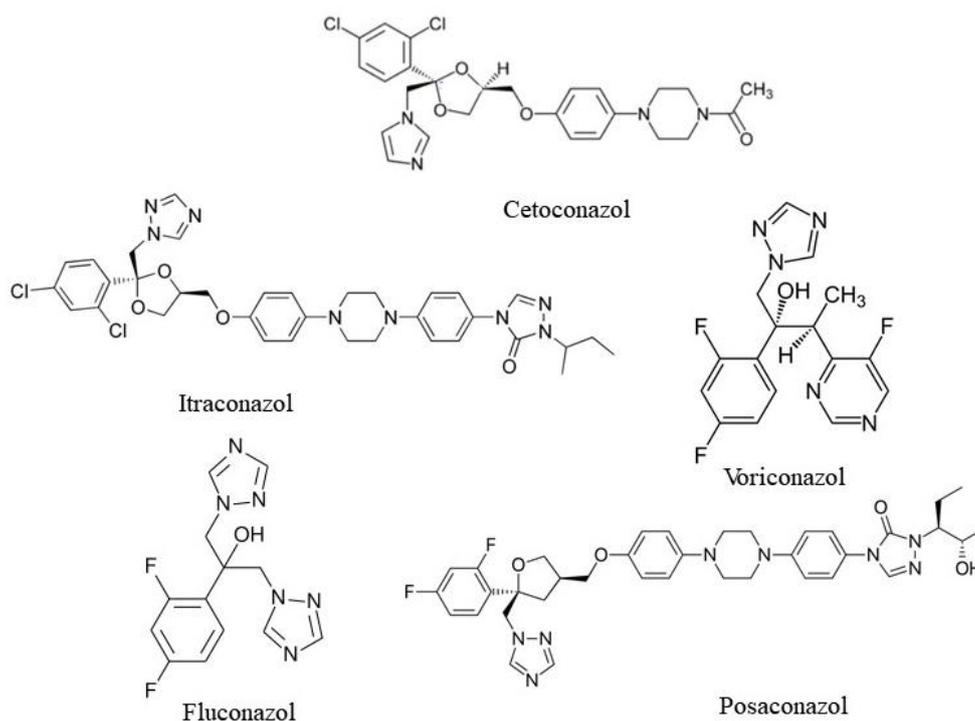
Em outro estudo, Gremião et al. (2011) descreveram a administração de anfotericina B intralesional em combinação com itraconazol oral em 26 gatos com esporotricose refratária. O estudo consistiu em gatos com lesões residuais refratária ao itraconazol oral. O critério para esporotricose refratária foi a falta de resposta por pelo menos oito semanas sob administração oral de itraconazol. A anfotericina B foi diretamente infiltrada nas lesões, sendo aplicada uma vez por semana ou a cada duas semanas até a cura completa. O itraconazol oral (100 mg/dia) foi mantido durante todo o estudo e por um mês adicional após a cicatrização das lesões. Dos gatos tratados, 84,6% obtiveram remissão clínica, sendo 72,7% curados e 27,3% apresentaram lesões recorrentes no mesmo local, aparecendo dois (9,1%), três (9,1%) e cinco (9,1%) meses após a cura clínica. Em 11,5% dos gatos os proprietários abandonaram o tratamento e em 3,9% houve falta de resposta clínica. Dos animais curados, uma única aplicação de anfotericina B intralesional foi eficaz em 25% dos animais; duas aplicações foram necessárias para 43,75%; 25% exigiram três aplicações e 6,25% exigiram cinco aplicações. Os efeitos adversos observados durante o tratamento foram à formação de abscesso estéril em 15,4% e edema em 11,5% dos gatos.

Rodrigues (2009) descreveu a resposta terapêutica ao uso da anfotericina B subcutânea associada ao itraconazol em 17 gatos com esporotricose que apresentaram resposta clínica insatisfatória ao tratamento antifúngico com itraconazol oral após um período mínimo de oito semanas. Os animais foram submetidos a administrações de anfotericina B via subcutânea uma vez por semana, com no máximo 20 aplicações ou até a cura clínica. A terapia antifúngica oral convencional foi mantida durante a realização do estudo. De acordo com os resultados obtidos, o protocolo utilizado se mostrou eficiente em 35,3% casos. Porém, recidiva, estagnação e progressão do quadro clínico também ocorreram, além de formação de abscesso estéril local.

3.2.2 Azóis

Assim como os polienos, os azóis apresentam como alvo o ergosterol. Atuam primariamente inibindo a enzima lanosterol 14- α -demetilase, que é necessária para a conversão do lanosterol em ergosterol. As alterações induzidas na membrana levam ao aumento de permeabilidade, resultando em lise e morte celular (ALSPAUGH, 2020; GINTJEE; DONNELLEY; THOMPSON, 2020). Existem dois grupos de fármacos presentes nessa classe (imidazóis e triazóis). Dentre os relatados no tratamento da esporotricose, destacam-se o cetoconazol, pertence ao grupo dos imidazóis, e os triazóis fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol (Figura 2).

Figura 2 – Fórmulas estruturais dos azóis.



Fonte: PubChem.

Estudos *in vitro* demonstraram boa atividade do cetoconazol (MARIMON et al., 2007b; OLIVEIRA et al., 2011; STOPIGLIA et al., 2014; BRILHANTE et al., 2016;

HAN et al., 2017; CÓRDOBA et al., 2018), itraconazol (MCGINNIS et al., 2001; MARIMON et al., 2007b; SILVEIRA et al., 2009; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; BORBA-SANTOS et al., 2015b; RODRIGUES et al., 2014a; STOPIGLIA et al., 2014; BRILHANTE et al., 2016; HAN et al., 2017; SANCHOTENE et al., 2017; CÓRDOBA et al., 2018) e posaconazol (MARIMON et al., 2007b; SILVEIRA et al., 2009; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010; BORBA-SANTOS et al., 2015b; RODRIGUES et al., 2014a; ALMEIDA-PAES et al., 2017; CÓRDOBA et al., 2018) frente a isolados de *Sporothrix* spp.. Enquanto o fluconazol e o voriconazol não apresentaram bons resultados em testes *in vitro* (MCGINNIS et al., 2001; MARIMON et al., 2007b; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; BORBA-SANTOS et al., 2015b; RODRIGUES et al., 2014a; STOPIGLIA et al., 2014; BRILHANTE et al., 2016; CÓRDOBA et al., 2018).

Existem vários estudos sobre a utilização do cetoconazol no tratamento da esporotricose felina. Da Silva et al. (2008) observaram a cicatrização completa das lesões cutâneas e ausência de alterações conjuntivais em um gato tratado com cetoconazol oral (50 mg/animal cada 12h) após 75 dias de tratamento. Em outro relato, Nakamura et al. (1996) observaram desaparecimento completo das lesões de um felino após 24 dias de administração oral de cetoconazol. Enquanto Raimer et al. (1983) relataram que de seis animais tratados com cetoconazol oral (10/mg/kg/dia), o desaparecimento das lesões ocorreu em 83,33% dos gatos. Porém, observaram que após seis semanas de tratamento a terapia não erradicou o organismo dos linfonodos regionais. Em outro trabalho, Nobre et al. (2001) relataram três animais tratados com cetoconazol oral (10 mg/kg/dia) apresentando falta de apetite com dez dias de tratamento, sendo a medicação descontinuada.

Han et al. (2017) observaram que isolados de *Sporothrix* sp. foram mais sensíveis ao cetoconazol quando comparado com o itraconazol em testes *in vitro*. Porém, quando o cetoconazol oral (10 mg/kg) foi testado em oito animais com esporotricose, apenas um apresentou cura das lesões, enquanto quatro morreram. Almeida-Paes et al. (2017), relataram que o cetoconazol *in vitro* apresentou menor valor

de concentração inibitória mínima comparado a outros azóis. Entretanto, alguns isolados de *S. brasiliensis* de humanos e gatos apresentaram resistência a este fármaco.

Os efeitos colaterais imediatos mais comuns do cetoconazol são anorexia, vômito e diarreia. A longo prazo pode ser observada hepatotoxicidade (hepatomegalia, enzimas hepáticas séricas elevadas e icterícia), perda de peso e alterações na pelagem (clareamento da cor, alopecia e pelagem seca). Portanto, é aconselhável monitorar as enzimas hepáticas séricas mensalmente durante o tratamento com cetoconazol (WILLARD et al., 1986; SHERDING, 2005). Devido a essas reações adversas, torna-se limitado seu uso por tempo prolongado, tendo sido substituído pelo itraconazol.

Relatos na literatura mostram que o itraconazol tem sido mais eficiente com menos efeitos colaterais e mais seguro que o cetononazol. Schubach et al. (2004) relataram cura clínica em 33,8% dos gatos tratados com itraconazol (5 a 10 mg/kg/dia) e em 4,4% dos animais tratados com cetoconazol (5 a 10 mg/kg/dia). Em outro estudo, Pereira et al. (2010) avaliaram a eficácia e segurança do tratamento com cetoconazol e itraconazol em 773 gatos diagnosticados com esporotricose. Nesse estudo 598 gatos receberam cetononazol oral (13,5 a 27,0 mg/kg) a cada 12 horas/24 horas e 175 gatos receberam itraconazol oral (8,3 a 27,7 mg/kg/dia). Dos animais tratados, 238 gatos (30,8%) obtiveram resolução completa das lesões, 105 (13,6%) morreram e 430 (55,6%) abandonaram o tratamento ou ainda estavam em tratamento no tempo da análise dos dados. Dos gatos curados, 171 (28,6%) receberam cetoconazol e 67 (38,3%) receberam itraconazol. O tempo médio de cura clínica (28 semanas) não diferiu entre os fármacos. Efeitos gastrointestinais foram relatados em 252 gatos (42%) tratados com cetoconazol e 54 gatos (30,9%) tratados com itraconazol, sendo a hiporexia o efeito colateral mais frequente (31,3%), seguido de vômitos e diarreia. Os autores concluíram que as chances de alcançar a cura clínica das lesões foram 1,3 vezes maiores em animais tratados com itraconazol do que nos tratados com cetoconazol.

No estudo *in vivo* conduzido por Ishida et al. (2015, o qual foi mencionado no tópico 3.2.1, a administração de itraconazol oral (75 mg /kg/dia) durante 30 dias não foi eficiente na redução da carga fúngica, levando a mortalidade de 100% dos animais. Segundo os autores, o itraconazol não foi capaz de tratar com eficiência casos graves de

esporotricose murina. Já Antunes et al. (2009) relataram boa atividade do itraconazol oral (10 mg/kg/dia) no tratamento da esporotricose cutânea em 80 ratos infectados experimentalmente.

Estudos realizados em felinos com esporotricose têm mostrado resultados satisfatórios. Rossi, Odaguiri e Larsson (2013) observaram 100% de cura sem efeitos colaterais em 17 gatos com esporotricose tratados com itraconazol oral (10 mg/kg/dia) independente da sua forma clínica. Madrid et al. (2010) examinaram e acompanharam a evolução do tratamento com itraconazol oral (10 mg/kg/dia) em doze felinos (um a dez anos de idade) diagnosticados com esporotricose. A cura clínica foi alcançada até o final do terceiro mês de tratamento em 50% dos felinos, dos quais dois apresentaram a forma cutânea localizada e quatro a forma cutânea disseminada. Do restante dos animais, quatro não retornaram para avaliação, um alcançou cura clínica após cinco meses de terapia antifúngica e outro morreu durante o quarto mês de tratamento.

Em outro estudo, Crothers et al. (2009) descreveram treze casos de gatos com esporotricose examinados e tratados entre os anos de 1987 e 2007. Três gatos apresentavam lesões cutâneas localizadas, quatro gatos apresentavam lesões cutâneo-linfáticas, envolvendo mais de uma área do corpo, e seis gatos apresentavam a forma generalizada com sinais respiratórios (secreção nasal, espirros, respiração e estertor respiratório), anorexia e perda de peso. Doze dos treze gatos foram tratados com itraconazol oral com doses variando entre 5 mg/kg/animal a cada 12 h a 10 mg/kg/dia. Apenas um gato foi tratado com fluconazol via oral (1 mg/kg/dia). Dos gatos tratados com itraconazol, um recebeu iodeto de sódio 20% via oral (20 mg/kg) a cada 12 h por seis semanas, seguido do tratamento com itraconazol oral; e outro gato recebeu iodeto de potássio por via oral (dose desconhecida), duas vezes ao dia, durante uma semana, seguido do tratamento com itraconazol oral. Os autores observaram que seis gatos tratados com itraconazol obtiveram resolução das lesões cutâneas e sinais clínicos dentro de um período de acompanhamento de dois a seis meses. Dois gatos tratados com itraconazol que apresentavam a forma disseminada da doença morreram (devido a outras causas) sem a resolução completa das lesões, sendo que um dos gatos estava em tratamento há quatro anos. Dois gatos que apresentavam a forma cutânea localizada e

foram tratados com itraconazol oral apresentaram recidiva das lesões após o fim do tratamento. O gato tratado com fluconazol obteve a resolução dos sinais clínicos cutâneos e respiratórios com 12 semanas. Porém, os sinais respiratórios se repetiram dentro de quatro semanas após a descontinuação do tratamento. Os gatos tratados com iodeto de sódio e iodeto de potássio somente obtiveram resolução das lesões após o início do tratamento com itraconazol.

O itraconazol tem sido o fármaco de escolha para o tratamento da esporotricose felina por apresentar os melhores resultados com menos reações adversas quando comparado a outros antifúngicos, especialmente em situações em que o custo não é um fator limitante. Macdonald, Ewert e Reitmeyer (1980) isolaram *Sporothrix* de lesões de gatos, cicatrizadas há seis meses após o tratamento e evidenciaram a necessidade de um tempo de tratamento prolongado. Assim é recomendada a administração do fármaco até um mês após a resolução completa das lesões cutâneas, que podem levar de algumas semanas a vários meses, tornando elevado o custo do tratamento (WELSH, 2003; PEREIRA et al., 2010; LLORET et al., 2013; GREMIÃO et al., 2014).

O itraconazol apresenta potencial hepatotóxico, principalmente devido ao uso prolongado, sendo fundamental um acompanhamento mensal da função hepática em animais em tratamento (LLORET et al., 2013). Thomson et al. (2019) relataram efeitos gastrointestinais, como letargia e vômito, além de elevação das enzimas hepáticas séricas, indicando lesão hepática em gatos tratados com itraconazol oral (10 mg/kg/dia).

Falhas terapêuticas foram relatadas, especialmente em casos com sinais respiratórios, lesões na mucosa nasal e alta carga fúngica nas lesões cutâneas (DE SOUZA et al., 2018). Essas falhas terapêuticas podem ser possivelmente devido à resistência de isolados de *Sporothrix* em decorrência do uso indiscriminado de itraconazol nas clínicas médicas e veterinárias (ODDS; BROWN; GOW, 2003; KOHLER et al., 2004; KOHLER et al., 2006; SUNDRIYAL; SHARMA; JAIN, 2006; NAKASU et al., 2020).

Embora o mecanismo de desenvolvimento de resistência não esteja totalmente elucidado, acredita-se que esteja relacionado à capacidade de produção de melanina, à

baixa diversidade genética e, possivelmente ao número anormal de cromossomos, e às mutações no citocromo P450 (WALLER et al. 2020a).

Waller et al. (2020b) avaliaram a eficácia *in vitro* de formulações de itraconazol (humano e veterinário) de diferentes marcas disponíveis no mercado contra *S. brasiliensis* e estimaram a quantidade de itraconazol em cada formulação. Dos isolados testados 34,5% do total foram resistentes a todas as formulações. A quantidade de ingredientes ativos não correspondeu à concentração indicada na embalagem pelos fabricantes, sendo que o itraconazol estava presente em uma concentração significativamente menor do que o esperado. Portanto, as formulações apresentaram variações no grau de eficácia, com sensibilidade entre 32,9 e 51,7% em formulações veterinárias; e entre 69 a 72,4% em formulações humanas.

Nos últimos anos, estudos têm mostrado a resistência de isolados de *Sporothrix* spp. frente ao itraconazol. Nakasu et al. (2020) relataram que de 12 gatos atendidos com esporotricose causada por *S. brasiliensis*, somente um apresentou melhora clínica com o uso de itraconazol (100 mg/animal) associado a iodeto de potássio (20 mg/kg) durante três meses, enquanto os outros animais não apresentaram evidências de cura clínica. Os autores avaliaram a suscetibilidade *in vitro* dos doze isolados frente ao itraconazol e observaram altos valores de concentração inibitória mínima (≥ 16 mg/L) em 58,3% dos isolados, sendo os isolados classificados como resistentes ao itraconazol.

Stopiglia et al. (2014) observaram que dos 85 isolados de *Sporothrix* testados, 5,9% apresentaram resistência ao itraconazol. Borba-Santos et al. (2015b) relataram a resistência de 32 isolados de *S. brasiliensis* ao itraconazol e ressaltaram que isolados recentes (2011-2012) foram, de um modo geral mais resistentes do que isolados antigos (anterior a 2004). Achados semelhantes foram observados por Madrid et al. (2010) e Nakasu et al. (2020), onde isolados de *Sporothrix* de felinos “recentes” (2016-2017) foram menos suscetíveis ao itraconazol em comparação com isolados de casos mais antigos (2002–2006).

Silveira et al. (2009) testaram *in vitro* 62 isolados clínicos de *Sporothrix* spp. oriundos de cinco países diferentes (Peru, Venezuela, Brasil, Uruguai e Espanha) e observaram diferenças estatísticas de acordo com a fonte geográfica dos isolados,

sugerindo que a origem geográfica possa levantar diferenças na suscetibilidade aos antifúngicos. De todos os isolados testados, 36% foram resistentes ao itraconazol, sendo 66,6% provenientes do Uruguai.

Trilles et al. (2005) observaram que os isolados de *Sporothrix* spp. oriundos de infecções disseminadas foram menos suscetíveis ao itraconazol do que os de infecções localizadas. Enquanto Kohler et al. (2004) observaram que isolados de gatos apresentavam mais resistência ao itraconazol que isolados de humanos que não apresentaram nenhuma resistência. O mesmo foi observado por Oliveira et al. (2011), que relataram maior proporção de espécies de *Sporothrix* resistentes ao itraconazol na esporotricose animal (22,2%) do que na humana (0%).

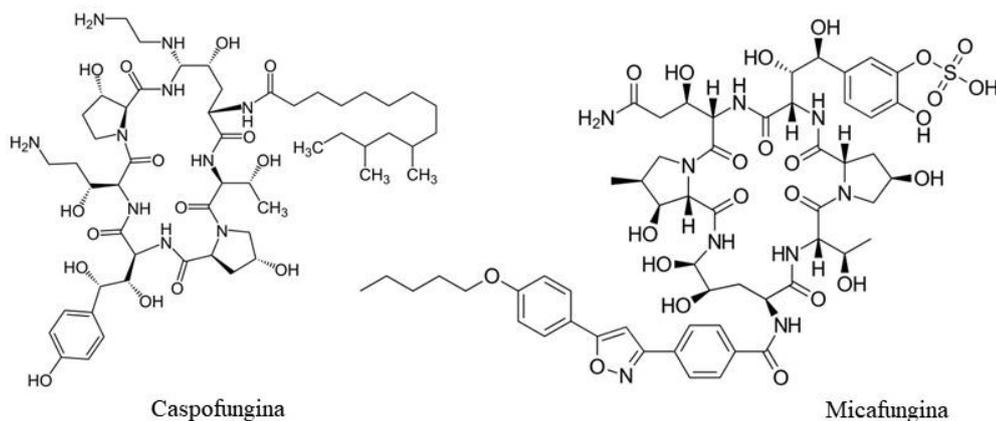
Estudos realizados com posaconazol demonstraram bons resultados em testes de suscetibilidade contra isolados de *Sporothrix* spp.. Borba-Santos et al. (2015b) observaram melhores resultados utilizando posaconazol do que o itraconazol em testes *in vitro* contra isolados de *S. brasiliensis*. Fernández-Silva et al. (2012), em um estudo *in vivo* em murinos com esporotricose disseminada causada por *S. brasiliensis* e *S. schenckii stricto sensu*, mostraram boa eficácia, com redução na carga fúngica após o tratamento com doses diárias de 5 mg/kg de posaconazol. Thomson et al. (2019) relataram o insucesso terapêutico do itraconazol oral (10 mg/kg/dia) no tratamento de um gato diagnosticado com esporotricose. O animal apresentou letargia, vômito e elevação sérica de alanina aminotransferase. Porém, quando a terapia foi alterada para posaconazol oral (7,5 mg/kg/dia) houve resolução completa da lesão, regressão das reações adversas e uma diminuição significativa, mas não normalização nas atividades das enzimas hepáticas. Porém, o alto custo do tratamento com posaconazol faz dele uma alternativa inviável (MARIMON et al., 2007b).

3.2.3 Equinocandinas

As equinocandinas inibem a síntese do (1,3) - β -D-glucano, que é um componente importante da parede celular dos fungos, levando ao enfraquecimento e consequentemente lise e morte celular (ODDS; BROWN; GOW, 2003; VAN DAELE

et al., 2019). Os fármacos dessa classe são a caspofungina e micafungina (Figura 3). As equinocandinas são notavelmente bem toleradas, com poucos efeitos adversos. Porém, testes *in vitro* não têm demonstrado boa eficácia frente a isolados de *Sporothrix*.

Figura 3 – Fórmulas estruturais das equinocandinas.



Fonte: PubChem.

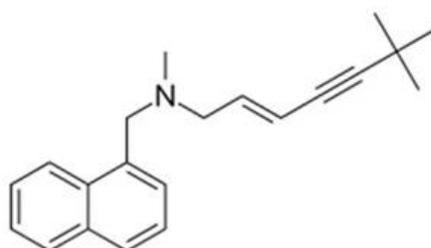
Estudos realizados *in vitro* demonstraram inatividade da micafungina (MARIMON et al., 2007b) e caspofungina (OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014a) frente a isolados de *Sporothrix* spp.. Já Brilhante et al. (2016) observaram que a caspofungina apresentou maior variação na concentração inibitória mínima, apresentando moderada atividade contra isolados de *S. brasiliensis* de casos de esporotricose felina. Adicionalmente, o uso das equinocandinas é limitado pela falta de formulações orais disponíveis, sendo comercializadas apenas como infusões intravenosas.

3.2.4 Alilaminas

As alilaminas, representadas pela terbinafina (Figura 4), interferem na síntese do ergosterol pela inibição da esqualeno epoxidase, enzima necessária para a síntese do ergosterol (ODDS; BROWN; GOW, 2003; GINTJEE; DONNELLEY; THOMPSON,

2020). Trabalhos vêm demonstrando uma boa atividade da terbinafina contra isolados de *Sporothrix*, apresentando maior atividade *in vitro* do que os azóis (KOHLENER et al., 2004; MARIMON et al., 2007b; MEINERZ et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; BORBA-SANTOS et al., 2015b; STOPIGLIA et al., 2014; ALMEIDA-PAES et al., 2017; SANCHOTENE et al., 2017; CÓRDOBA et al., 2018).

Figura 4 – Fórmula estrutural da terbinafina.



Fonte: PubChem.

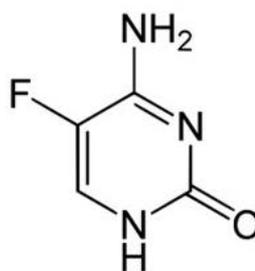
Porém, Han et al. (2017) avaliaram *in vitro* quarenta isolados de *Sporothrix* e observaram que 68% foram resistentes a terbinafina. Almeida-Paes et al. (2017) também relataram isolados de *S. brasiliensis* resistentes a terbinafina em teste *in vitro*. Schubach et al. (2004) avaliaram a terbinafina oral (30 mg/dia) e itraconazol oral (10 mg/kg) associado à terbinafina oral (30 mg/dia) em gatos diagnosticados com esporotricose. Os autores observaram uma taxa de cura de 7,4% em gatos tratados com a associação e 5,9% em gatos tratados somente com terbinafina. Entretanto, um estudo *in vivo* com modelo murino demonstrou baixa eficácia da terbinafina (20 e 30 mg/kg) no tratamento da esporotricose cutânea (ANTUNES et al., 2009).

3.2.5 Análogos da Pirimidina

A classe de análogos da pirimidina inclui a flucitosina (Figura 5), que age interferindo seletivamente na síntese de ácidos nucleicos fúngico. Este fármaco está disponível como formulação oral e seus principais efeitos adversos são essencialmente

limitados à supressão da medula óssea (ODDS; BROWN; GOW, 2003; VAN DAELE et al., 2019; ALSPAUGH, 2020). Porém, Marimon et al. (2007b), Rodrigues et al. (2014a) e Córdoba et al. (2018) observaram que a flucitosina não apresentou atividade *in vitro* contra isolados de *Sporothrix* spp.. Adicionalmente, Nusbaum et al. (1983) relataram um caso em que o gato foi submetido à eutanásia devido a sinais neurológicos durante a terapia combinada de flucitosina à anfotericina B intravenosa.

Figura 5 – Fórmula estrutural da flucitosina.



Fonte: PubChem.

3.2.6 Iodetos

O iodeto de potássio é um medicamento de baixo custo que tem sido utilizado para tratar as formas cutâneas e linfocutânea da esporotricose felina (STERLING; HEYMANN, 2000; GREMIÃO et al, 2014). Soluções saturadas de iodeto de potássio assim como cápsulas têm demonstrado eficácia no tratamento, porém o mecanismo pelo qual o iodeto de potássio atua ainda é desconhecido, mas acredita-se que atue por meio da resposta imune (GOUGEROT, 1950) e da modulação da resposta inflamatória (TORRES-MENDOZA et al., 1997).

Soluções saturadas de iodeto de potássio, assim como cápsulas, têm mostrado eficácia no tratamento. Brilhante et al. (2018) relataram também a eficácia na inibição da formação de biofilme de células de *Sporothrix*. Dunstan et al. (1986) relataram um caso de um gato com esporotricose disseminada, tratado com solução saturada de iodeto

de potássio 20% administrado por via oral. O animal apresentou resolução completa das lesões após cinco meses de terapia. O mesmo foi observado por Gonzalez-Cabo et al. (1989), que relataram um caso de resolução completa das lesões de esporotricose em um felino após oito semanas de tratamento com solução saturada de iodeto de potássio a 20% em doses de 0,1 mL/kg por via oral.

Reis et al. (2012) avaliaram a eficácia de cápsulas de iodeto de potássio oral em doses de 5 mg/kg a 20 mg/kg no tratamento de 48 gatos com lesões cutâneas únicas e múltiplas, diagnosticados com esporotricose. A taxa de cura foi de 47,9%, enquanto a taxa de insucesso foi de 37,5% devido à falta de resposta clínica e efeitos clínicos adversos graves. Dos efeitos adversos, a hiporexia (52%) foi o sinal mais observado, seguido de letargia, perda de peso, anorexia, vômito e diarreia. Um total de 27,1% dos gatos apresentaram leve aumento dos níveis de enzimas hepáticas, apresentando sinais clínicos sugestivos de hepatotoxicidade.

Os felinos são muito suscetíveis a iodetos e devem ser cuidadosamente monitorados quanto as reações adversas, que podem incluir depressão, anorexia, vômito, diarreia, espasmos musculares, hipotermia, hipertermia, ptialismo, hiperexcitabilidade, pelagem seca, colapso cardiovascular, cardiomiopatia e, se não descontinuado, o tratamento pode levar à interrupção da produção endógena de hormônios da tireóide, podendo causar tireoidite e hipo ou hipertireoidismo. Em alguns casos, os gatos podem não responder ao tratamento com iodetos e evoluir para piora do quadro clínico e óbito. Portanto, recomenda-se um monitoramento frequente dos animais com exames bioquímicos para acompanhamento da função hepática, além de uma avaliação do hormônio estimulador da tireóide, para garantir que a função tireoidiana permanece normal (STERLING; HEYMANN, 2000; YAMADA et al., 2011; REIS et al., 2012).

Casos de insucesso terapêutico também são relatados na literatura (DUNSTAN, 1986; MACKAY et al., 1986; CROTHERS et al., 2009). Em um estudo conduzido por Nobre et al. (2001) quatro gatos apresentaram cura das lesões, enquanto dezesseis apresentaram efeito tóxico, com progressão das lesões, diarreia, falta de apetite e evolução para anorexia e morte dos animais.

Por apresentar muitos efeitos colaterais, o iodeto de potássio não é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose e tem sido recomendado isolado ou em associação com o itraconazol em casos de gatos refratários. Reis et al., (2016) avaliaram a eficácia da associação de itraconazol (100 mg/dia) e iodeto de potássio (2,5 a 20 mg/kg/dia) em 30 gatos com esporotricose. Dos animais tratados, 96,15% atingiram cura clínica com uma mediana de 14 semanas de tratamento e 3,85% morreram. Efeitos adversos ocorreram em 50% dos gatos, sendo a hiporexia e perda de peso os sinais mais frequentes. Além disso, foi observada elevação nos níveis de transaminase e 20% dos animais tiveram a terapia temporariamente suspensa devido a sinais clínicos de hepatotoxicidade.

Em outro estudo, Da Rocha et al. (2018) avaliaram a eficácia e segurança do iodeto de potássio (5 mg/kg) combinado com itraconazol (100 mg/dia) em 38 gatos com esporotricose refratária ao itraconazol. Dos animais tratados, 63,2% foram curados dentro de um tempo médio de 20 semanas (16 a 32 semanas). Falhas terapêuticas ocorreram em 13,1% dos casos e 7,9% dos animais morreram. Dos 38 gatos incluídos no estudo, 8% apresentaram sinais clínicos adversos, sendo que 21% apresentaram apenas elevação nos níveis de transaminase e 32% apresentaram efeitos adversos e elevação dos níveis de transaminase. Dentre as reações adversas observadas, a hiporexia e perda de peso foram as mais frequentes. Devido a este fator, 18% dos animais tiveram a terapia temporariamente suspensa por sete dias.

Outro iodeto que também pode ser utilizado é o iodeto de sódio, cujo mecanismo de ação permanece desconhecido. No entanto, poucos são os trabalhos que relataram a cura clínica de gatos com esporotricose quando tratados com iodeto de sódio. Adicionalmente há riscos de iodismo durante o tratamento, ocasionando apatia, anorexia, vômito e diarreia, além de hipotermia, hipertermia, cardiomiopatia, hiperexcitabilidade, espasmos musculares e ptialismo (NOBRE et al., 2002; NUSBAUM et al., 1983; PEASTON 1993; NAKAMURA et al., 1996; CROTHERS et al., 2009).

Burke, Grauer e Macy (1983) relataram um caso de esporotricose felina refratária ao uso de itraconazol oral onde houve completa resolução das lesões com o

tratamento com iodeto de sódio. Inicialmente foi utilizada uma dose de 40 mg/kg a cada 12h, quando o gato apresentou febre, anorexia e cardiomiopatia congestiva a terapia foi descontinuada e os parâmetros fisiológicos voltaram à normalidade. O fármaco foi reintroduzido com diminuição da dose para 20 mg/kg a cada 12h e nenhuma reação adversa foi observada. Houve a completa remissão das lesões e cura em três meses.

Em outro estudo, Schubach et al. (2004) relataram cura clínica de 38,2% dos 68 gatos tratados com iodeto de sódio por via oral a cada 12 h (10 mg/kg). Reações adversas foram observadas em 40,5% dos animais, sendo anorexia, vômito e diarreia as reações adversas mais frequentes. Carvalho et al. (2018) avaliaram a resposta terapêutica de cápsulas de iodeto de sódio (5 mg/kg/dia) administradas por via oral em vinte e oito gatos com esporotricose. Durante o tratamento, 21,4% necessitaram de um aumento da dose (10 mg/kg) devido à falta de resposta clínica. Dos animais tratados, 35,7% apresentaram reações adversas, sendo a hiporexia e perda de peso os sinais mais relatados; e 10,71% dos animais apresentaram alteração na função renal. A cura clínica foi obtida em 21,4% dos casos e a falha do tratamento foi observada em 46,4%.

3.2.7 Miltefosina e Produtos Naturais

A miltefosina, originalmente desenvolvida para uso em quimioterapia para câncer, demonstrou ter significativa atividade antifúngica contra vários fungos patogênicos. Segundo Borba-Santos et al. (2015a), a miltefosina apresenta alta atividade *in vitro* contra isolados de *Sporothrix brasiliensis* ocasionando perda da integridade da membrana plasmática e alteração na estrutura da parede celular, levando a um aumento na concentração de melanina nas células leveduriformes.

Brilhante et al. (2014a) avaliaram a atividade *in vitro* da miltefosina contra 62 cepas de *Sporothrix* de diferentes espécies (*S. brasiliensis*, *S. schenckii strictu sensu*, *S. mexicana* e *S. globosa*) recuperadas de humanos, animais e ambiente. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações inibitórias mínimas contra as diferentes espécies avaliadas, apresentando bons resultados contra isolados de *S. brasiliensis* e *S. schenckii strictu sensu*. Brilhante et al. (2018) relataram que a

miltefosina reduziu a atividade metabólica de biofilmes de *Sporothrix* na forma filamentosa e leveduriforme em 67,7 e 51,6%, respectivamente.

Apesar de estudos *in vitro* mostrarem o potencial antifúngico da miltefosina e a possibilidade de torná-la uma alternativa no tratamento da esporotricose, em estudo recente com pacientes felinos esse potencial não foi confirmado. Segundo Da Silva et al. (2018), o uso da miltefosina oral (2 mg/kg/dia), durante 15 a 45 dias, não foi eficaz no tratamento de dez gatos refratários à terapia com itraconazol oral (100 mg/kg/dia) e iodeto de potássio oral. Os animais não apresentaram efeitos adversos importantes, contudo também não obtiveram remissão completa da esporotricose, contrariando os resultados obtidos em estudos *in vitro*.

Alguns trabalhos também têm relatado a ação antifúngica *in vitro* de extratos de plantas contra cepas de *Sporothrix*. De acordo com Waller et al. (2016a), cem espécies de plantas apresentaram atividade contra fungos do gênero *Sporothrix*, sendo estas espécies pertencentes a 39 famílias botânicas, nas quais destacaram as famílias Combretaceae (31%), Asteraceae (11%) e Lamiaceae (7%), que apresentaram o maior número de espécies com atividade confirmada. Muitos produtos naturais já demonstraram atividade antifúngica contra as espécies de *Sporothrix*, como própolis marrom (PETER et al., 2019), derivados de cumarina (FOREZI et al., 2018), extrato de orégano (*Origanum vulgare*) (COUTO et al., 2015), extrato de manjerona (*Origanum majorana*) (WALLER et al., 2016b), extrato de chá verde (*Camelia sinensis*) (WALLER et al., 2015), componentes de óleos essenciais de plantas, tais como o farnesol (BRILHANTE et al., 2014b) e o terpinen-4-ol (BRILHANTE et al., 2019). Porém, não há estudos *in vivo* que comprovem a eficácia desses produtos naturais no tratamento da esporotricose felina.

3.2.8 Outras Alternativas

Alguns autores relataram como alternativa auxiliar no tratamento da esporotricose felina o uso da ressecção cirúrgica associado com antifúngico oral, principalmente quando há insucesso no tratamento medicamentoso. Gremião et al.

(2006) relataram sucesso na remoção cirúrgica de uma lesão persistente na bolsa escrotal e testículos de um gato com esporotricose em tratamento com itraconazol 20 mg/kg/dia. Em outro relato, um gato com obstrução uretral parcial, ocasionando grave retenção urinária, o tratamento cirúrgico através da uretostomia perineal provou ser eficaz quando associado com itraconazol oral (10 mg/kg/dia) por dois meses (CORGOZINHO et al., 2006).

Thomson et al. (2019) descreveram o uso da técnica de remoção cirúrgica de um nódulo macio, elevado e não ulcerado associada ao posaconazol oral (7,5 mg/kg/dia) em um caso de esporotricose felina, resultando em resolução completa da lesão. Já Hirano et al. (2006) relataram a resolução completa de um abscesso no coxim plantar de um gato através da excisão cirúrgica associada com itraconazol oral (15 mg/kg/dia). Contudo, a principal limitação desta técnica é que a lesão deve estar localizada em um sítio anatômico que permita a intervenção cirúrgica, além de haver pouco embasamento na literatura para essa modalidade de tratamento (JUNG et al., 1979; PEREIRA et al., 2009; GREMIÃO et al., 2014).

A hipertermia local também tem sido descrita como uma boa alternativa no tratamento da esporotricose felina, principalmente devido ao seu baixo custo e ausência de reações adversas, desde que o paciente seja cooperativo e apresente uma única lesão em um local anatômico de fácil acesso. Estudos têm demonstrado que o crescimento de *Sporothrix* pode ser inibido em temperaturas acima de 40° C. Esta técnica tem sido utilizada na medicina humana principalmente em pacientes intolerantes ao uso de antifúngicos (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004).

Honse et al. (2010), relataram um caso de cura clínica de um gato doméstico com esporotricose cutânea localizada tratado apenas com hipertermia local, utilizando uma bolsa térmica com temperatura variando de 40 a 42°C, aplicada diretamente na lesão duas vezes por dia durante 15 minutos. Após três semanas, a lesão tinha cicatrizado completamente e a hipertermia local foi mantida por mais 4 semanas. Entretanto, as desvantagens do tratamento incluem localização das lesões, determinação do tempo adequado de sua interrupção, incorreto uso da bolsa térmica e temperatura inadequada (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004).

A fotomodulação a laser vermelho de baixa potência tem sido descrita como alternativa para tratar a forma cutânea da esporotricose. Estudo relatado em modelo murino concluiu que o uso da fotobiomodulação a laser de baixa potência promoveu efeitos positivos na inativação de *Sporothrix* em animais inoculados, quando comparados ao grupo controle. A análise histológica das biópsias coletadas após as sessões de laserterapia mostrou regressão progressiva da hiperplasia pseudoepiteliomatosa e do processo inflamatório crônico, comum na esporotricose. Foi observada, remissão total e retorno à normalidade após a segunda sessão de irradiação, sessenta dias após a inoculação (GUIRADO et al., 2018).

Outro método descrito é a criocirurgia que consiste no uso do frio com fins terapêuticos. A escolha da criocirurgia como uma opção alternativa para o tratamento da esporotricose felina, combinada com um antifúngico, tem como objetivo de aperfeiçoar o tratamento, reduzindo o tempo de cura, diminuindo os custos com antifúngicos e evitando as reações adversas. Em estudo realizado entre 2003 e 2013, 13 gatos com esporotricose cutânea, sem sinais sistêmicos, foram tratados com criocirurgia, como adjuvante ao tratamento oral com itraconazol (10 mg/kg/dia). Os gatos haviam recebido antifúngico por diferentes períodos de tempo antes da sessão de criocirurgia. Os animais foram anestesiados e as lesões foram congeladas com *spray* de nitrogênio. Foram realizados três ciclos de congelamento e descongelamento, aguardando o completo descongelamento do halo de gelo do ciclo anterior. Os pacientes foram medicados com itraconazol por quatro semanas após a cura clínica das lesões. Com esse esquema terapêutico, foram obtidos tempos de tratamentos de 14 a 64 semanas (média 32 semanas). O protocolo atingiu uma taxa de cura clínica de 84,6% em menor período de tempo que estudos com monoterapia de itraconazol oral. (DE SOUZA et al., 2016).

3.3. BASES DE SCHIFF COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

Bases de Schiff, também conhecidas como imina ou azometina, constituem uma classe de compostos orgânicos que foram primeiramente sintetizadas por Hugo Schiff (SCHIFF, 1864). Essas bases são formadas quando ocorre a condensação de uma amina

primária com um aldeído ou uma cetona. Estruturalmente, as bases de Schiff contêm uma dupla ligação entre carbono e nitrogênio, no qual o nitrogênio se liga a um grupo R diferente de hidrogênio, com fórmula mínima $R_2C=NR$. Representam um importante grupo de moléculas bioativas devido à facilidade de síntese e ampla gama de variedade estrutural. A síntese das bases de Schiff é realizada por meio de uma etapa única e com um bom rendimento, viabilizando a produção em larga escala e tornando o processo rápido e de baixo custo (DA SILVA et al., 2011b).

As bases de Schiff vêm sendo amplamente exploradas para aplicações industriais por apresentarem atividades antivirais, antibacterianas, antifúngicas, antimaláricas, antitumorais, anticonvulsivantes e antipiréticas (PRZYBYLSKI et al., 2009; BRODOWSKA; LODYGA-CHRUŚCIŃSKA, 2014). No entanto, a atividade biológica dessa classe merece uma investigação mais aprofundada. Embora a pesquisa ainda seja incipiente, o número de relatos revelando os efeitos das bases de Schiff sobre patógenos de interesse clínico tem aumentado recentemente, sendo potencialmente promissoras (DA SILVA et al., 2011b).

Uma série de bases de Schiff representadas na Figura 6, tem apresentado capacidade em inibir o crescimento de fungos de interesse clínico, apresentando ação antifúngica igual, ou melhor, a medicamentos comerciais. Por serem substâncias novas, a resistência dos patógenos é bastante reduzida. Estudos demonstraram a eficácia de bases de Schiff contra importantes espécies de *Aspergillus*.

Pandeya et al. (1999b) reagiram isatina e seus derivados com 4- (4'-clorofenil) -6- (4''-metil fenil) -2-aminopirimidina para formar bases de Schiff. Os autores observaram que todas as bases de Schiff mostraram atividade antifúngica significativa contra *A. niger*. Pannerselvam et al. (2005) sintetizaram e mostraram a atividade antifúngica *in vitro* de novas bases Schiff derivadas de 4-(4-aminofenil)-morfolina contra *A. niger*. As bases P2, P6 e P9 foram capazes de inibir o crescimento de *A. niger*. Em outro estudo, bases de Schiff sintetizadas com p-metoxifenil foram testadas contra *A. flavus* e *A. fumigatus*. A base 3C apresentou boa atividade contra todos os fungos testados e a base 3E mostrou boa inibição contra *A. fumigatus* (KARTHIKEYAN et al., 2006). Jesmin et al. (2008) relataram que as bases de Schiff PDH e HHP apresentaram

eficácia de 80-85%, respectivamente, contra cepas de *A. fumigatus* e *A. niger*, tendo a nistatina como referência. Saravanan et al. (2010) observaram que a base 4K exibiu maior atividade antifúngica contra *A. niger* e *A. fumigatus*.

Da Silva et al. (2011a) sintetizaram seis aril aldiminas oriundas da condensação de aminas aromáticas com benzaldeídos. As bases D3 e D8, mostraram atividades antifúngicas promissoras contra *A. fumigatus*, *A. clavatus* e *A. tamarii*. A base D8 inibiu o crescimento de isolados de *A. clavatus* e *A. fumigatus* usando concentrações seis e três vezes menores, respectivamente, que o fluconazol, que foi utilizado como referência no experimento. Lam et al. (2016) avaliaram quatorze bases de Schiff quanto à concentração inibitória mínima contra *A. niger*. As bases L5 e L6 com cadeia alquil contendo seis e sete átomos de carbono apresentaram boa atividade contra os fungos testados. Reddy et al. (2016) relataram que as bases de Schiff 3a-g, 4a-g e 7a-g conjugadas com éster de açúcar-boronato testadas foram ativas contra *A. fumigatus*. As bases 3c, 4e, 7a, 7f e 7g foram mais potentes do que os fármacos utilizados como padrão (fluconazol e cicloheximida).

Resultados promissores das bases de Schiff também têm sido relatados contra espécies de importância clínica de *Candida*. Pandeya et al. (1999b) relataram que as bases de Schiff oriundas da reação de derivados de isatina com 4- (4'-clorofenil) -6- (4''-metil fenil) -2-aminopirimidina apresentaram atividade antifúngica significativa contra *Candida albicans*. Sakiyan et al. (2004) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* de bases de Schiff derivadas da reação de 2-hidroxi-1-naftaleno associada a cinco aminoácidos (glicina, L-alanina L-fenilalanina, L-histidina, L-triptofano) e observaram boa ação dessas bases de Schiff contra *Candida albicans*. Pannerselvam et al. (2005) sintetizaram e exibiram a atividade antifúngica *in vitro* de novas séries de bases Schiff derivadas de 4-(4-aminofenil)-morfolina contra *Candida albicans*. A base P7 apresentou atividade significativa contra *C. albicans*. Em outro estudo, Jesmin et al. (2008) relataram que as bases PDH, HHP e PHP apresentaram eficácia contra cepas de *Candida albicans*, utilizando concentrações menores do que o fármaco controle (nistatina). Da Silva et al. (2011a) relataram que as bases D3 e D8 possuem atividades antifúngicas promissoras contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*.

Em outro estudo, os autores relataram que as bases 3c, 4a, 7f e 7g foram ativas contra *C. albicans*, apresentando valores de concentração inibitória mínima similares ao fluconazol (REDDY et al., 2016). Lam et al. (2016) avaliaram quatorze bases de Schiff quanto à concentração inibitória mínima contra isolados de *Candida albicans*. As bases L5 e L6 apresentaram boa atividade contra os isolados testados. Malik et al. (2019) sintetizaram algumas bases de Schiff e avaliaram o perfil de atividade antifúngica isoladamente e em combinação com medicamentos antifúngicos padrão (fluconazol e anfotericina B) contra isolados de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol e anfotericina B. A base SB5 mostrou potente atividade antifúngica contra todos isolados testados. Depois de combinar estas bases de Schiff com fluconazol e anfotericina B, 76% das combinações eram sinérgicas revelando uma redução de 4-10 vezes nos valores da concentração inibitória mínima, enquanto o restante das combinações foi indiferente.

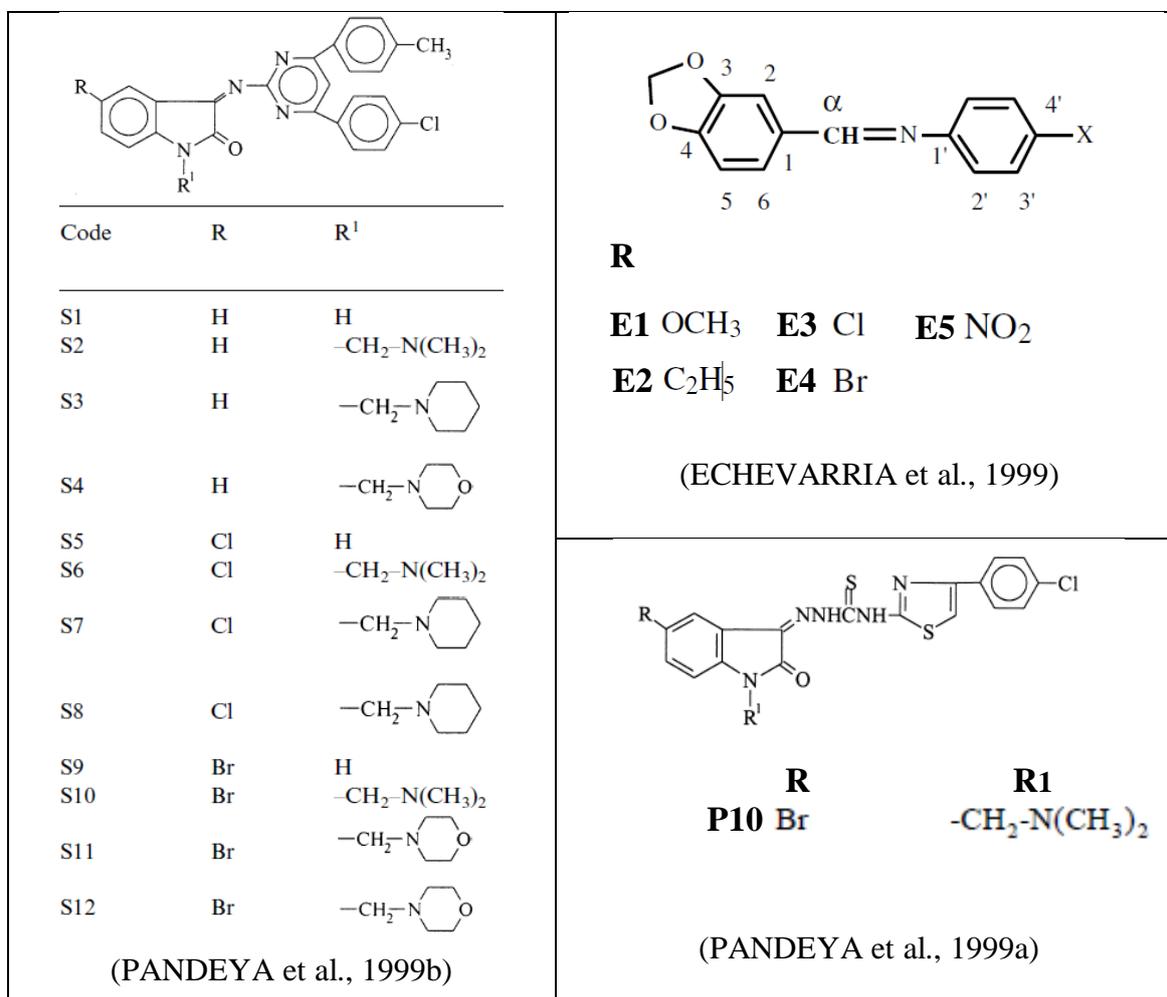
Estudos também mostraram a eficácia de algumas bases de Schiff contra espécies de *Cryptococcus*. Pandeya et al. (1999a) relataram que a base P10 possui atividade antifúngica favorável contra isolados de *C. neoformans*. Em outro estudo, Pandeya et al. (1999b) observaram que derivados de isatina associados a 4- (4'-clorofenil) -6- (4''-metil fenil) -2-aminopirimidina apresentaram atividade antifúngica moderada contra *C. neoformans*. Da Silva et al. (2011a) relataram que as bases D3 e D8 apresentaram atividades antifúngicas promissoras contra *C. neoformans* e foram capazes de reduzir em 40% a 50% a atividade metabólica do biofilme maduro de *C. neoformans*. Além disso, a base D8 foi duas vezes mais potente que o fluconazol contra *C. neoformans*. Magalhães et al. (2013) observaram que bases de hidroxaldiminas foram tão eficientes quanto o fluconazol contra 12 cepas de *C. neoformans* e 12 cepas de *C. gattii*, independentemente de o fungo ser um isolado de referência, clínico ou ambiental.

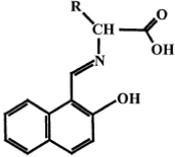
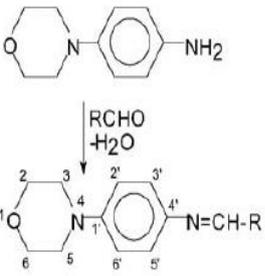
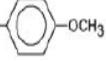
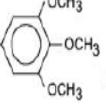
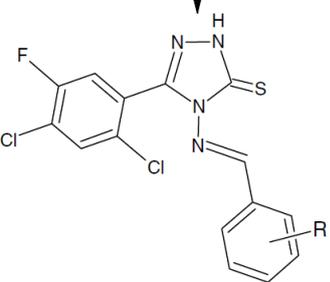
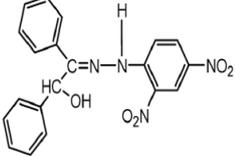
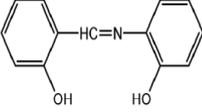
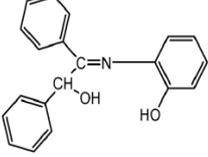
As bases de Schiff têm apresentado boa atividade antifúngica contra os dermatófitos. Pandeya et al. (1999a) relataram que a base P10 mostrou atividade antifúngica favorável contra isolados de *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* (*Nannizzia gypsea*), *M. audouinii* e *Trichophyton mentagrophytes*. Em outro

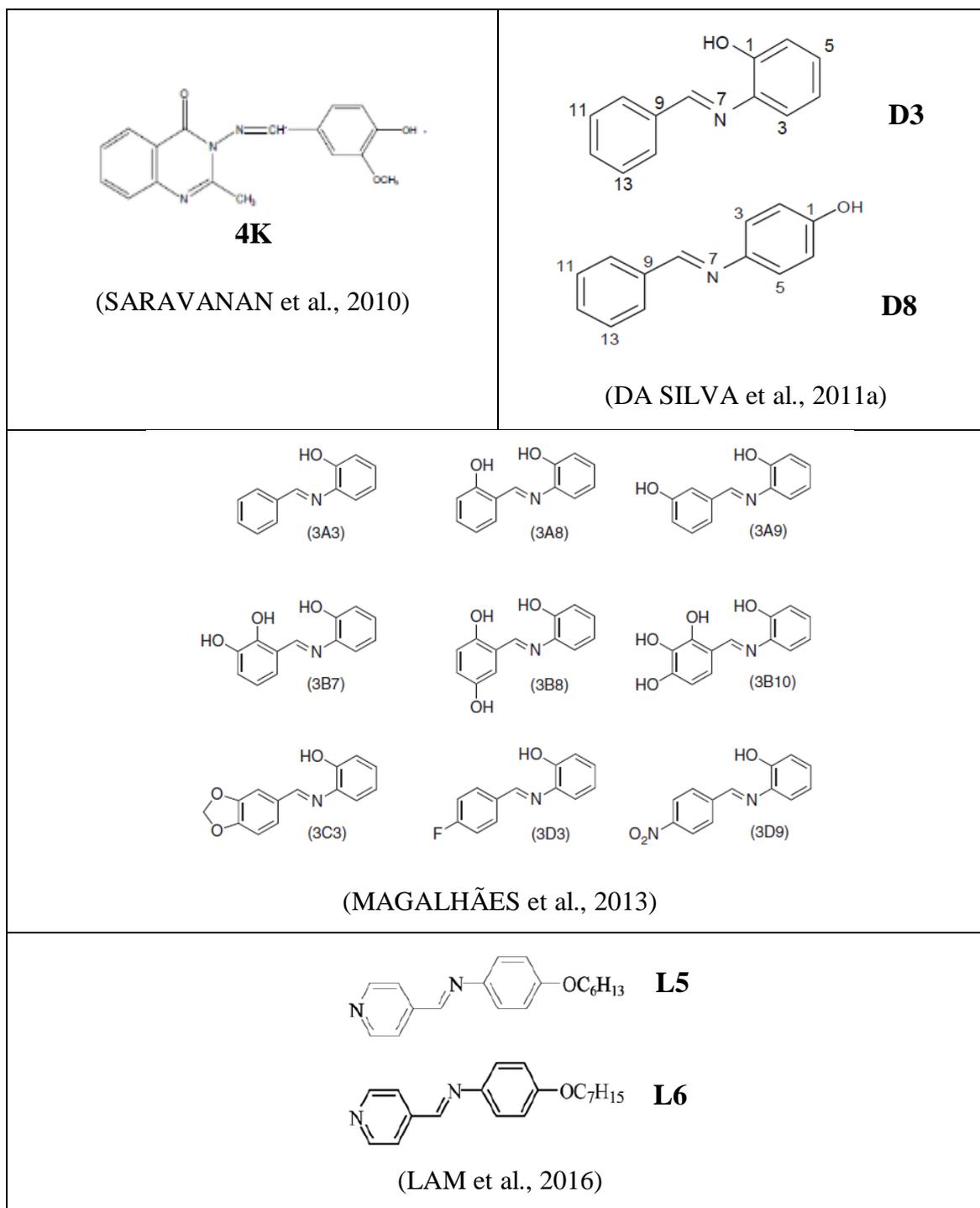
estudo, Pandeya et al. (1999b) observaram que todos as bases de Schiff mostraram atividade antifúngica significativa contra *E. floccosum*, *M. gypseum* (*Nannizzia gypsea*), *M. audouinii* e *T. mentagrophytes*. Quando comparado ao clotrimazol, as bases S2, S5, S7, S8, S9, S11 foram equipotentes e a base S6 foi mais ativa contra *Microsporum audouinii*; as bases S3, S4 e S9 foram equipotentes e a base S7 foi mais ativa contra *M. gypseum* (*Nannizzia gypsea*); e as bases S6, S7, S10 e S11 foram equipotentes contra *T. mentagrophytes*. Echevarria et al. (1999) sintetizaram bases de Schiff através da reação de condensação do piperonal (3,4-metilenodioxibenzaldeído) com as correspondentes aminas primárias aromáticas e observaram que as bases de Schiff apresentaram atividade significativa frente a fungos filamentosos, especialmente o *Epidermophyton floccosum*. Em outro estudo, os autores sintetizaram bases de Schiff com p-metoxifenil e observaram boa atividade antifúngica das bases 3C e 3E contra *Trichophyton mentagrophytes* (KARTHIKEYAN et al., 2006).

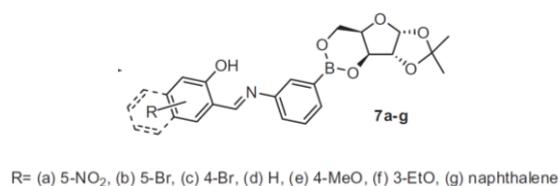
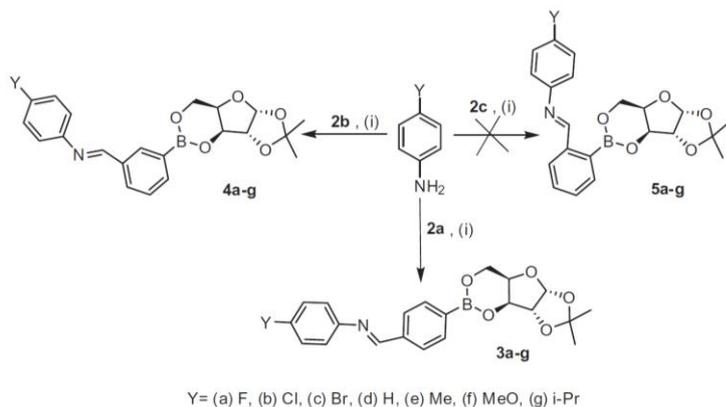
Pandeya et al. (1999b) relaram a eficácia de bases S2 e S3 foram equipotentes ao clotrimazol contra *Histoplasma capsulatum*. Jesmin et al. (2008) relataram que, em comparação com a nistatina as bases PDH e HHP apresentaram eficácia contra cepas de *Mucor* spp.

Figura 6 – Fórmula estrutural de bases de Schiff com atividade antifúngica.

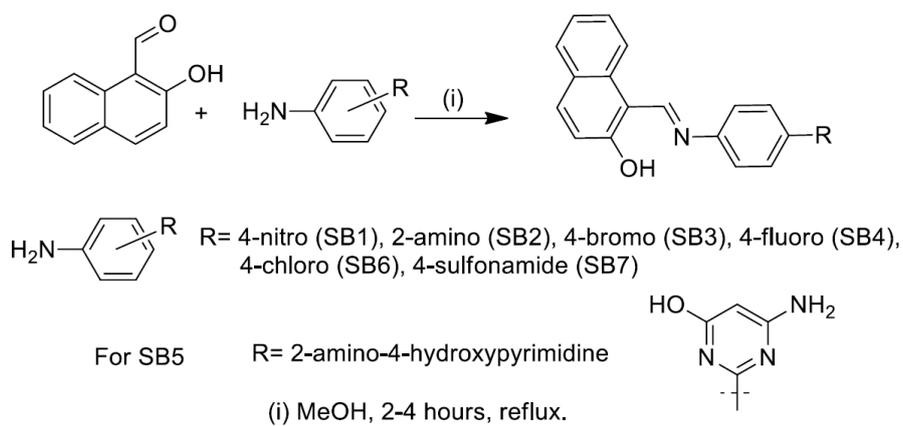


|  <table border="1" data-bbox="284 495 692 994"> <thead> <tr> <th colspan="2">Schiff bases</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>H₂L1</td> <td>H (Gly)</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>H₂L2</td> <td>CH₃ (Ala)</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>H₂L3</td> <td>H₂C- (Ph)</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>H₂L4</td> <td>H₂C- (His)</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>H₂L5</td> <td>H₂C- (Trp)</td> </tr> </tbody> </table> <p>(SAKIYAN et al., 2004)</p> | Schiff bases | | R | 1 | H ₂ L1 | H (Gly) | 2 | H ₂ L2 | CH ₃ (Ala) | 3 | H ₂ L3 | H ₂ C-  (Ph) | 4 | H ₂ L4 | H ₂ C-  (His) | 5 | H ₂ L5 | H ₂ C-  (Trp) |  <p>P2 </p> <p>P6 </p> <p>P7 </p> <p>P9 </p> <p>(PANNERSELVAM et al., 2005)</p> |
|--|------------------------------------|---|----|------------------------------------|-------------------|---------|----|--------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|--|----|----------------------------|---|---------------------|-------------------|---|---|
| Schiff bases | | R | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | H ₂ L1 | H (Gly) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | H ₂ L2 | CH ₃ (Ala) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | H ₂ L3 | H ₂ C-  (Ph) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | H ₂ L4 | H ₂ C-  (His) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | H ₂ L5 | H ₂ C-  (Trp) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  <table border="1" data-bbox="794 1128 1203 1496"> <thead> <tr> <th>Compound</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3a</td> <td>4-N(CH₃)₂</td> </tr> <tr> <td>3b</td> <td>4-Cl</td> </tr> <tr> <td>3c</td> <td>4-OCH₃</td> </tr> <tr> <td>3d</td> <td>4-NO₂</td> </tr> <tr> <td>3e</td> <td>4-F</td> </tr> <tr> <td>3f</td> <td>3,4-(O-CH₂-O)</td> </tr> <tr> <td>3g</td> <td>2,4-Cl₂</td> </tr> </tbody> </table> <p>(KARTHIKEYAN et al., 2006)</p> | Compound | R | 3a | 4-N(CH ₃) ₂ | 3b | 4-Cl | 3c | 4-OCH ₃ | 3d | 4-NO ₂ | 3e | 4-F | 3f | 3,4-(O-CH ₂ -O) | 3g | 2,4-Cl ₂ | | | |
| Compound | R | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3a | 4-N(CH ₃) ₂ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3b | 4-Cl | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3c | 4-OCH ₃ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3d | 4-NO ₂ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3e | 4-F | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3f | 3,4-(O-CH ₂ -O) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3g | 2,4-Cl ₂ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>PDH </p> <p>HHP </p> <p>PHP </p> <p>(JESMIN et al., 2008)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |





(REDDY et al., 2016)



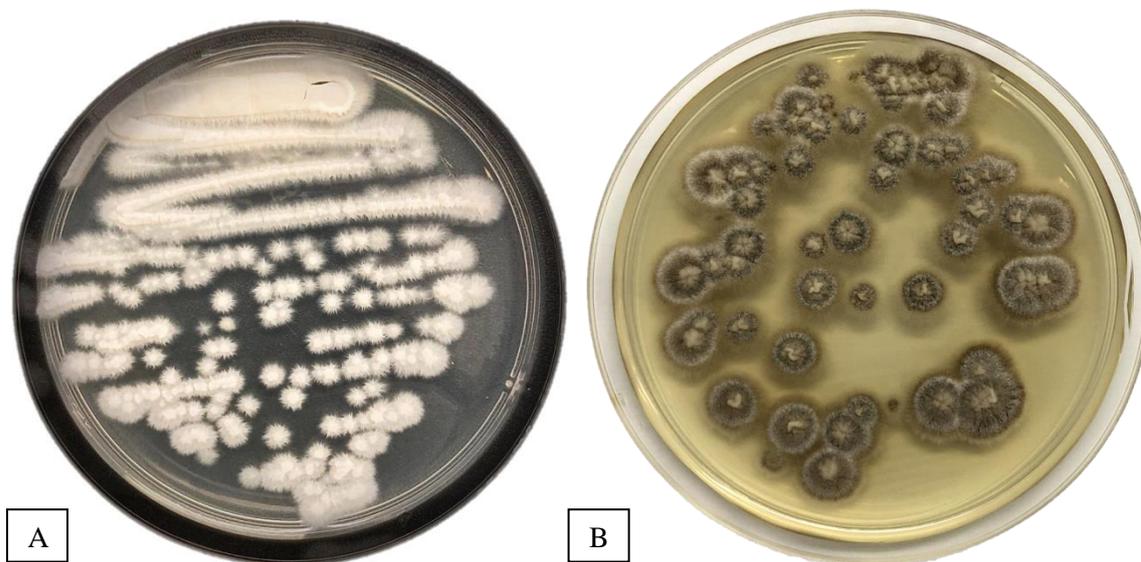
(MALIK et al., 2019)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS DE *Sporothrix brasiliensis*

Foram utilizados dez isolados previamente identificados como *Sporothrix* através da análise macromorfológica e micromorfológica de ambas as formas do fungo (Figuras 7, 8 e 9). Posteriormente foram caracterizados molecularmente como *Sporothrix brasiliensis* através da análise da sequência parcial do gene espécie específico da calmodulina. Os isolados são oriundos de casos clínicos de gatos com esporotricose pertencentes a Belo Horizonte e região metropolitana, os quais foram obtidos através do banco de amostras do Laboratório de Micologia e Micotoxinas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (LAMICO EV/UFGM). Os estudos foram realizados com *S. brasiliensis* na sua forma leveduriforme e filamentosa. Os isolados clínicos foram identificados como S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10.

Figura 7- Macroscopia de colônias filamentosas brancas (A) e marrom acastanhadas (B) de *Sporothrix brasiliensis* em meio Agar Sabouraud Dextrose (SDA), incubado em estufa a 25° C durante 7 dias.



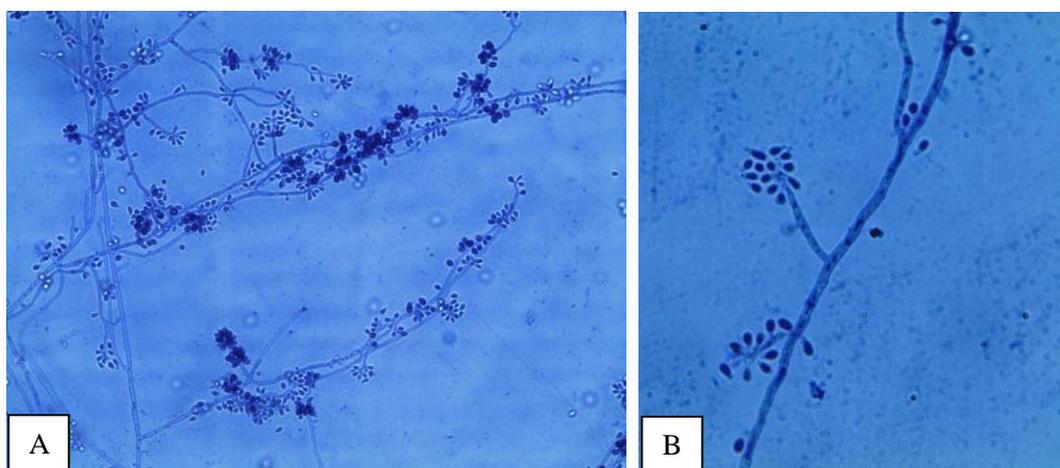
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 - Macroscopia de colônias leveduriformes de *Sporothrix brasiliensis* em meio Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI), incubado em estufa a 37°C durante 48 horas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 9 - Microscopia óptica de *Sporothrix brasiliensis*.



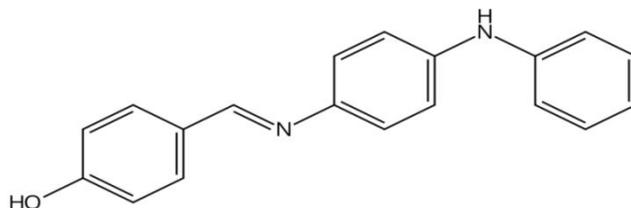
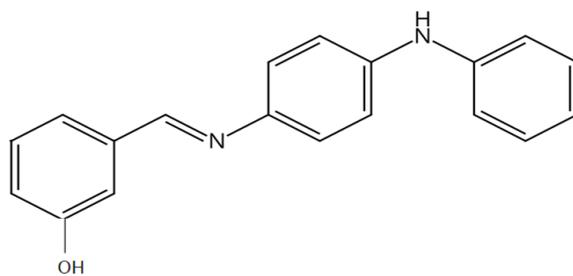
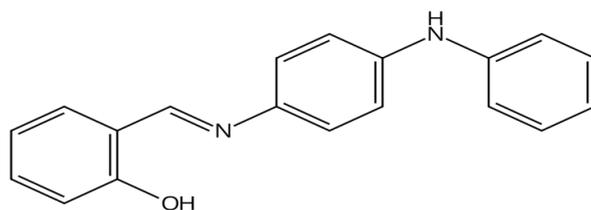
Legenda: (A) Microscopia óptica (400x) de *Sporothrix brasiliensis*. Hifas finas, septadas e hialinas que apresentam conidióforos, comumente solitários, saindo de diversos pontos da sua extensão; no ápice destes são formados conídios, geralmente em aglomerados. (B) Microscopia óptica (1000x) de *Sporothrix brasiliensis*. Os conídios aglomerados no ápice do conidióforo lembram as características de uma flor (conídios em forma de margarida). Os conídios são ovóides, hialinos e de parede lisa, de tamanho 3-6 x 2-3 μm . Corante: Lactofenol Azul de Algodão.

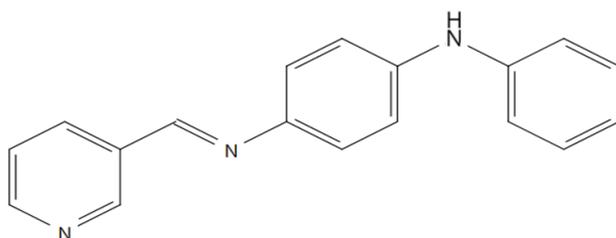
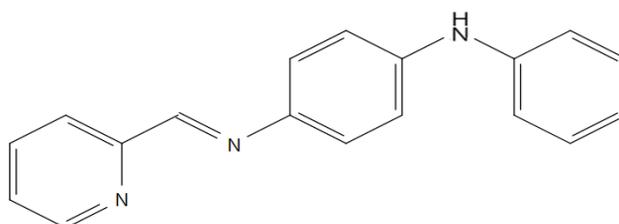
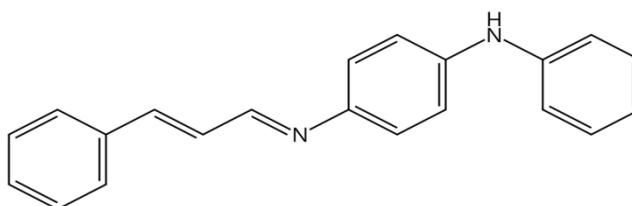
Fonte: Arquivo pessoal.

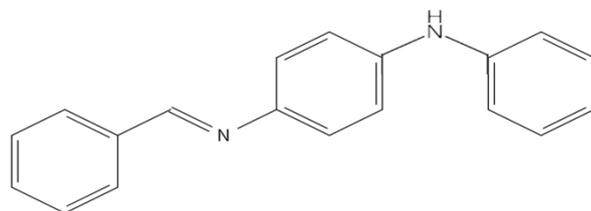
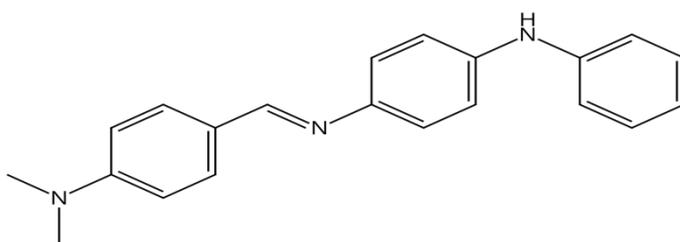
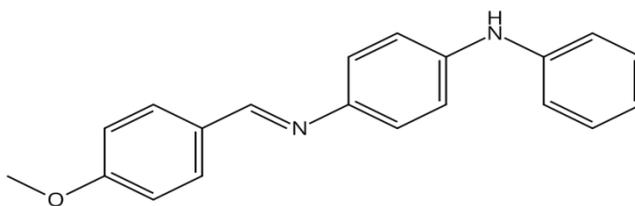
4.2 BASES DE SCHIFF E ITRACONAZOL

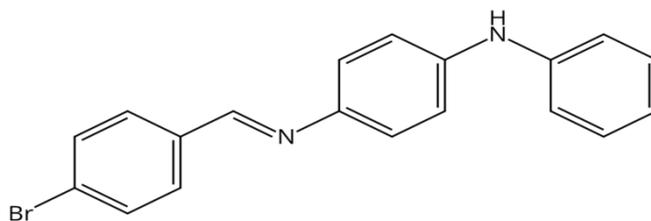
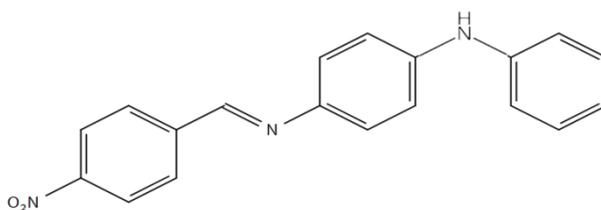
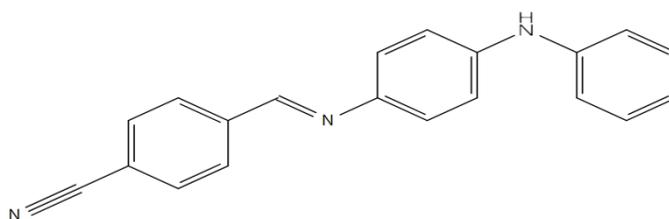
Foram sintetizadas 12 bases de Schiff derivadas de 4-aminodifenilamina, sendo fornecidas pelo Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. As bases de Schiff foram identificados como 7F1, 7F2, 7F3, 7F5, 7F6, 7F7, 7F9, 7F10, 7G1, 7G3, 7G4, 7G5. As bases de Schiff 7F2, 7F5, 7F7, 7F9, 7G3, 7G4 e 7G5 são inéditas de acordo com buscas realizadas na base de dados SciFinder. A fórmula estrutural das bases de Schiff está representada na Figura 10. O itraconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como antifúngico padrão para comparação. Para o controle de qualidade do itraconazol, isolados de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Aspergillus flavus* ATCC 204304 foram testados para a forma leveduriforme e filamentosa, respectivamente. As bases de Schiff e o itraconazol foram armazenados a -20 °C até o momento do uso.

Figura 10 – Fórmula estrutural das bases de Schiff derivadas de 4-aminodifenilamina.

7F1 $C_{19}H_{16}N_2O$ **7F2** $C_{19}H_{16}N_2O$ **7F3** $C_{19}H_{16}N_2O$

7F5 $C_{18}H_{15}N_3$ **7F6** $C_{18}H_{15}N_3$ **7F7** $C_{21}H_{18}N_2$

7F9 $C_{19}H_{16}N_2$ **7F10** $C_{21}H_{21}N_3$ **7G1** $C_{20}H_{18}N_2O$

7G3**7G4****7G5**

Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO RPMI 1640

O meio utilizado para estudos de microdiluição em caldo, foi o Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com vermelho de fenol como indicador de pH (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O meio RPMI 1640 foi obtido comercialmente na forma de pó e sua suspensão foi preparada conforme recomendação do fabricante. Foram elaboradas duas soluções de meio RPMI 1640. Uma solução foi utilizada na preparação das bases de Schiff e no teste de microdiluição em caldo para a forma leveduriforme, que continha uma embalagem de 10,4 g de meio RPMI 1640 em pó, acrescidos de 34,53 g/L de tampão ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) 0,165 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e água destilada em quantidade suficiente para 1L. A outra solução empregada no teste de microdiluição em caldo para a forma filamentosa continha os mesmos componentes, porém foi suplementado com 20% de Glicose Anidra P.A. (Neon, Suzano, SP, Brasil) com o intuito de facilitar o crescimento do fungo. A diluição completa do meio foi realizada com o auxílio de um agitador magnético (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) e o potencial hidrogeniônico (pH) foi ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L até alcançar pH 7,0, sendo este procedimento verificado com o auxílio de um pHmetro de bancada (PG 1800, Gehaka, São Paulo, SP, Brasil). Posteriormente, o meio foi esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm, utilizando pressão positiva e armazenado a -8°C até a sua utilização.

4.4 TESTES DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)

Para a avaliação da sensibilidade dos isolados fúngicos as bases de Schiff, estudos para identificação da concentração inibitória mínima (MIC) foram conduzidos conforme o método de microdiluição em caldo, seguindo os documentos M38-A2 (CLSI, 2008a) e M27-A3 (CLSI, 2008b) propostos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com modificações.

4.4.1 Preparo das bases de Schiff e do itraconazol

As soluções-estoque das bases de Schiff e do itraconazol foram preparadas na concentração de 12,8 mg/mL e 1,6 mg/mL, respectivamente, utilizando o dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha) como diluente. Foram realizadas diluições das suspensões das bases de Schiff e do itraconazol em meio líquido RPMI 1640 tamponado para atingir uma concentração duas vezes a necessária para o teste de microdiluição em caldo (256 mg/L para as bases de Schiff e 32 mg/L para o itraconazol). A partir dessa solução, foram realizadas oito diluições seriadas usando o meio líquido RPMI 1640 tamponado.

As diluições seriadas foram realizadas na própria placa de microdiluição, de modo que as concentrações de teste das bases de Schiff variaram de 128 mg/L a 1 mg/L e do itraconazol de 16 mg/L a 0,0125 mg/L (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações das bases de Schiff e do itraconazol avaliadas nos estudos de microdiluição em caldo.

| POÇO | BASES DE SCHIFF | ITRACONAZOL |
|-------------|------------------------|--------------------|
| 1 | 128 mg/L | 16 mg/L |
| 2 | 64 mg/L | 8 mg/L |
| 3 | 32 mg/L | 4 mg/L |
| 4 | 16 mg/L | 2 mg/L |
| 5 | 8 mg/L | 1 mg/L |
| 6 | 4 mg/L | 0,5 mg/L |
| 7 | 2 mg/L | 0,25 mg/L |
| 8 | 1 mg/L | 0,125 mg/L |

4.4.2 Controle de diluição

A maior concentração de DMSO utilizada nos estudos foi testada para garantir que não estivesse inviabilizando as células fúngicas. Assim, a maior concentração do DMSO utilizado nos estudos após a diluição no meio RPMI 1640 tamponado sem bases de Schiff ou itraconazol foi avaliada como controle de diluição para os dez isolados fúngicos na forma leveduriforme e filamentosa em uma placa de 96 poços.

4.4.3 Preparo do inóculo leveduriforme

Para o preparo do inóculo das leveduras, os isolados foram cultivados em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (Becton Dickinson, East Rutherford, NJ, EUA) e incubados em estufa com circulação de ar (ACBLABOR, Americana, SP, Brasil) a 37°C por 48-72h. Após este período, as culturas de leveduras foram removidas separadamente com uma alça estéril e adicionadas a um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85%) com Tween 20 (PROQuimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 0,1%. A suspensão obtida foi homogeneizada em vórtex (Quimis, Diadema, SP, Brasil) por 15 segundos e lida em espectrofotômetro digital (Coleman, Santo André, SP, Brasil) no comprimento de onda de 530 nm, ajustando a uma transmitância de 75 a 77%. Em seguida, a suspensão foi diluída em duas etapas com o meio RPMI 1640 tamponado: uma primeira na proporção de 1:50 e uma segunda na proporção de 1:20, resultando em uma concentração de 1×10^3 a 5×10^3 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, ou seja, duas vezes mais concentrado do que o inóculo final ($0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL).

4.4.4 Preparo do inóculo filamentoso

Para a obtenção do fungo na forma filamentosa, os isolados foram cultivados em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e incubados em estufa com circulação de ar a 25°C por 7 dias. As placas com as colônias

filamentosas foram inicialmente lavadas com 1 mL de solução salina estéril (0,85%) contendo 0,1% de Tween 20. Após este processo, a suspensão com conídios e fragmentos de hifas, foi transferida para um tubo de ensaio vazio estéril, onde ficou de 3 a 5 minutos para que ocorresse a decantação dos fragmentos de hifas. Após este período, o sobrenadante contendo os conídios foi transferido para outro tubo de ensaio vazio estéril e homogeneizado em vórtex por 15 segundos. A suspensão obtida foi utilizada para o inóculo, após ajuste em espectrofotômetro digital para uma transmitância de 80 a 82%, em comprimento de onda de 530 nm. Em seguida, foi realizada a diluição de 1:50 da suspensão em meio RPMI 1640 tamponado acrescido de glicose, resultando em uma suspensão duas vezes mais concentrada que o inóculo final ($0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC / mL).

4.4.5 Preparo da placa de microdiluição

Os estudos de microdiluição foram realizados em placas estéreis de 96 poços de fundo em formato de U, distribuídos em oito fileiras horizontais (A-H) e doze colunas verticais (1-12). Os estudos foram realizados em duplicata. Desta forma, considerando todas as bases de Schiff, o itraconazol e as duas formas do fungo, totalizaram 52 placas. Para cada base de Schiff, foram utilizadas quatro placas sendo duas placas para a forma leveduriforme e duas para forma filamentosa.

Foram avaliadas oito concentrações das bases de Schiff e do itraconazol nas fileiras horizontais contra dez isolados de *S. brasiliensis* nas colunas verticais, sendo cinco isolados por placa. Foram adicionadas alíquotas de 100 µL de meio líquido RPMI 1640 tamponado nos poços das fileiras B-H, nas colunas 1-10 com uma pipeta multicanal. Em seguida foram adicionados aos poços na fileira A de 1-10, 200 µL das bases de Schiff, previamente diluídas para uma concentração de 256 mg/L (dobro da concentração mais alta desejada) e do itraconazol, previamente diluído para uma concentração de 32 mg/L (dobro da concentração mais alta desejada). Deste modo, os poços 1-10 da fileira A ficaram com um volume de 200 µL. Com o auxílio de uma pipeta automática, realizou-se diluições seriadas passando 100 µL, começando da fileira

A, para cada poço subsequente até a fileira H, desprezando-se ao final os 100 μ L restantes. Em seguida, foram adicionados os inóculos nas colunas 1-10. As colunas onze e doze corresponderam ao controle dos inóculos (100 μ L de meio RPMI 1640 tamponado e 100 μ L do inóculo) e controle de esterilidade do meio (200 μ L de meio RPMI 1640 tamponado). A representação esquemática das placas do estudo está ilustrada nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Representação esquemática da placa de microdiluição em caldo das bases de Schiff para determinação da concentração inibitória mínima.

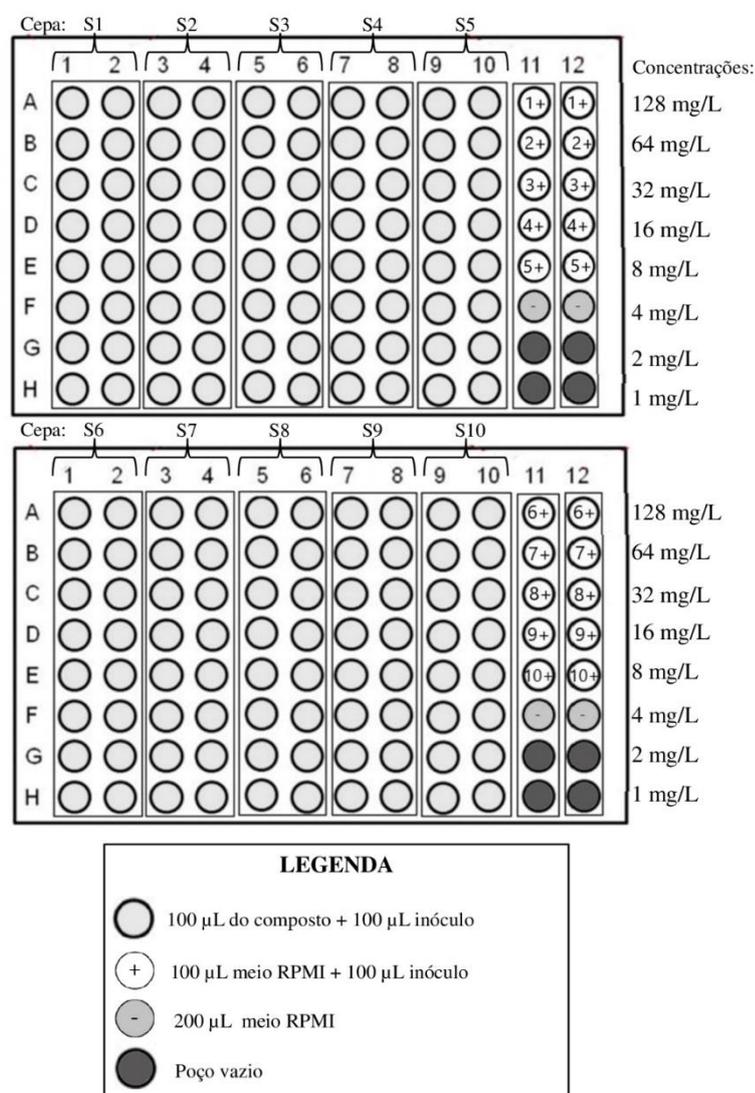
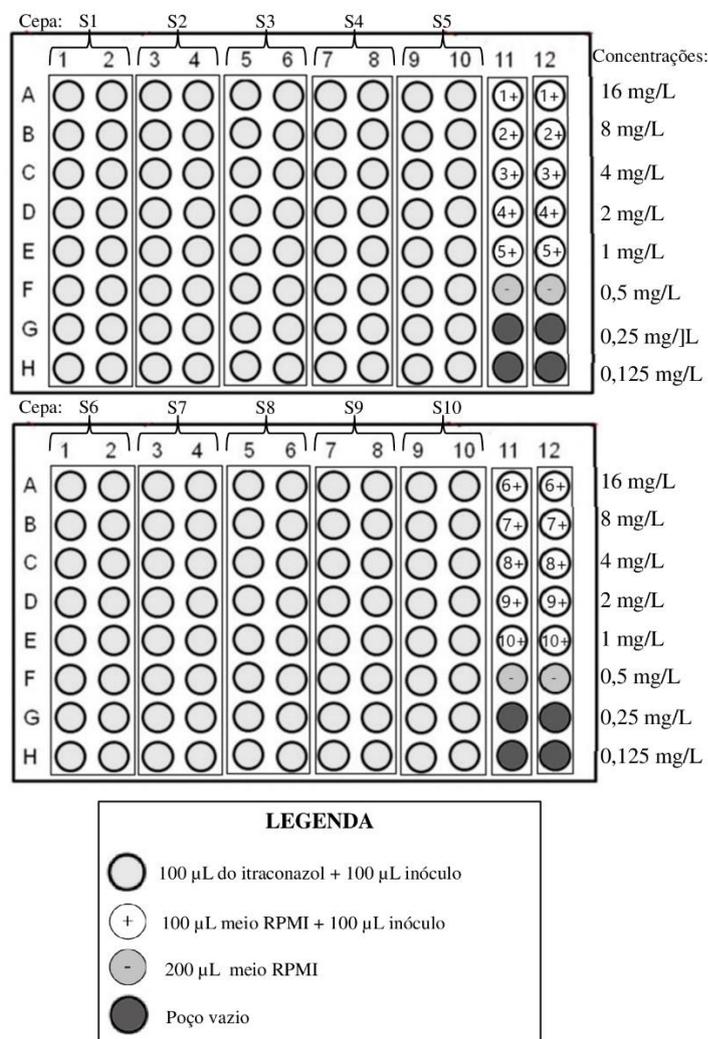


Figura 12 - Representação esquemática da placa de microdiluição em caldo do itraconazol para determinação da concentração inibitória mínima.



4.4.6 Armazenamento das placas e leitura do teste

As placas foram incubadas em estufa com circulação de ar a 35°C e a leitura foi realizada após 72 horas de incubação para as duas formas do fungo. A concentração inibitória mínima foi determinada visualmente (inspeção visual no fundo da placa) como a menor concentração da base de Schiff capaz de inibir o crescimento fúngico. Para interpretação dos resultados foi feita a comparação do crescimento em cada poço com o do controle do inóculo.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas primeiramente para as cepas filamentosas e logo em seguida para as cepas leveduriformes. Para a análise inicial da MIC em relação às bases de Schiff estudadas foram calculados os valores mínimos e máximos, média, desvio padrão e os quartis de MIC em relação a cada base de Schiff. A normalidade das MICs observadas para cada base de Schiff foi analisada por meio de histogramas e do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados não apresentaram distribuição normal. Portanto, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre as MICs observadas para cada base de Schiff e o fármaco de referência itraconazol. Quando observadas diferenças estatisticamente significativas no teste de Kruskal-Wallis, foi realizado o pós-teste de Dunn. Para todas as análises foi utilizado o programa Stata versão 16 (StataCorp), seguindo os procedimentos descritos por Favero e Belfiore (2017). Foi considerado um nível de significância estatística de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estatísticas descritivas e os histogramas das concentrações inibitórias mínimas (MICs) obtidas para as formas filamentosas e leveduriformes de *S. brasiliensis* a partir das bases de Schiff avaliadas e do itraconazol estão apresentados na Tabela 2 e Figuras 13 e 14.

Tabela 2 – Estatística descritiva das concentrações inibitórias mínimas (MICs) obtidas para as bases de Schiff e do itraconazol frente às cepas fúngicas (filamentosas e leveduriformes) de *S. brasiliensis*.

| Formas fúngicas | Bases de Schiff | Concentração inibitória mínima (MIC - mg/L) | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|---|--------|--------|--------|---------------|-----------|---------|-----------|
| | | n | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão | Quartil 1 | Mediana | Quartil 3 |
| Filamentosas | 7F1 | 10 | 32 | 64 | 57,60 | 13,49 | 64 | 64 | 64 |
| | 7F2 | 10 | 32 | 64 | 38,40 | 13,49 | 32 | 32 | 32 |
| | 7F3 | 10 | 8 | 32 | 21,60 | 9,28 | 16 | 16 | 32 |
| | 7F5 | 10 | 16 | 64 | 56,00 | 17,28 | 64 | 64 | 64 |
| | 7F6 | 10 | 32 | 64 | 35,20 | 10,12 | 32 | 32 | 32 |
| | 7F7 | 10 | 128 | 128 | 128,00 | 0,00 | 128 | 128 | 128 |
| | 7F9 | 10 | 64 | 128 | 70,40 | 20,24 | 64 | 64 | 64 |
| | 7G1 | 10 | 16 | 64 | 36,80 | 15,18 | 32 | 32 | 32 |
| | 7G4 | 10 | 64 | 128 | 83,20 | 30,91 | 64 | 64 | 128 |
| | | Itraconazol | 10 | 0,125 | 0,125 | 0,125 | 0,00 | 0,125 | 0,125 |
| Leveduriformes | 7F1 | 10 | 16 | 32 | 17,60 | 5,06 | 16 | 16 | 16 |
| | 7F2 | 10 | 16 | 32 | 17,60 | 5,06 | 16 | 16 | 16 |
| | 7F3 | 10 | 128 | 128 | 128,00 | 0,00 | 128 | 128 | 128 |
| | 7F5 | 10 | 32 | 32 | 32,00 | 0,00 | 32 | 32 | 32 |
| | 7F6 | 10 | 16 | 32 | 20,80 | 7,73 | 16 | 16 | 32 |
| | 7F7 | 10 | 128 | 128 | 128,00 | 0,00 | 128 | 128 | 128 |
| | 7F9 | 10 | 128 | 128 | 128,00 | 0,00 | 128 | 128 | 128 |
| | 7G1 | 10 | 16 | 64 | 44,80 | 21,06 | 32 | 48 | 64 |
| | 7G4 | 10 | 128 | 128 | 128,00 | 0,00 | 128 | 128 | 128 |
| | | Itraconazol | 10 | 4 | 8 | 7,20 | 1,69 | 8 | 8 |

Figura 13 – Histograma das distribuições de frequências das concentrações inibitórias mínimas das bases de Schiff e do itraconazol avaliadas frente às cepas filamentosas de *S. bralisiensis*.

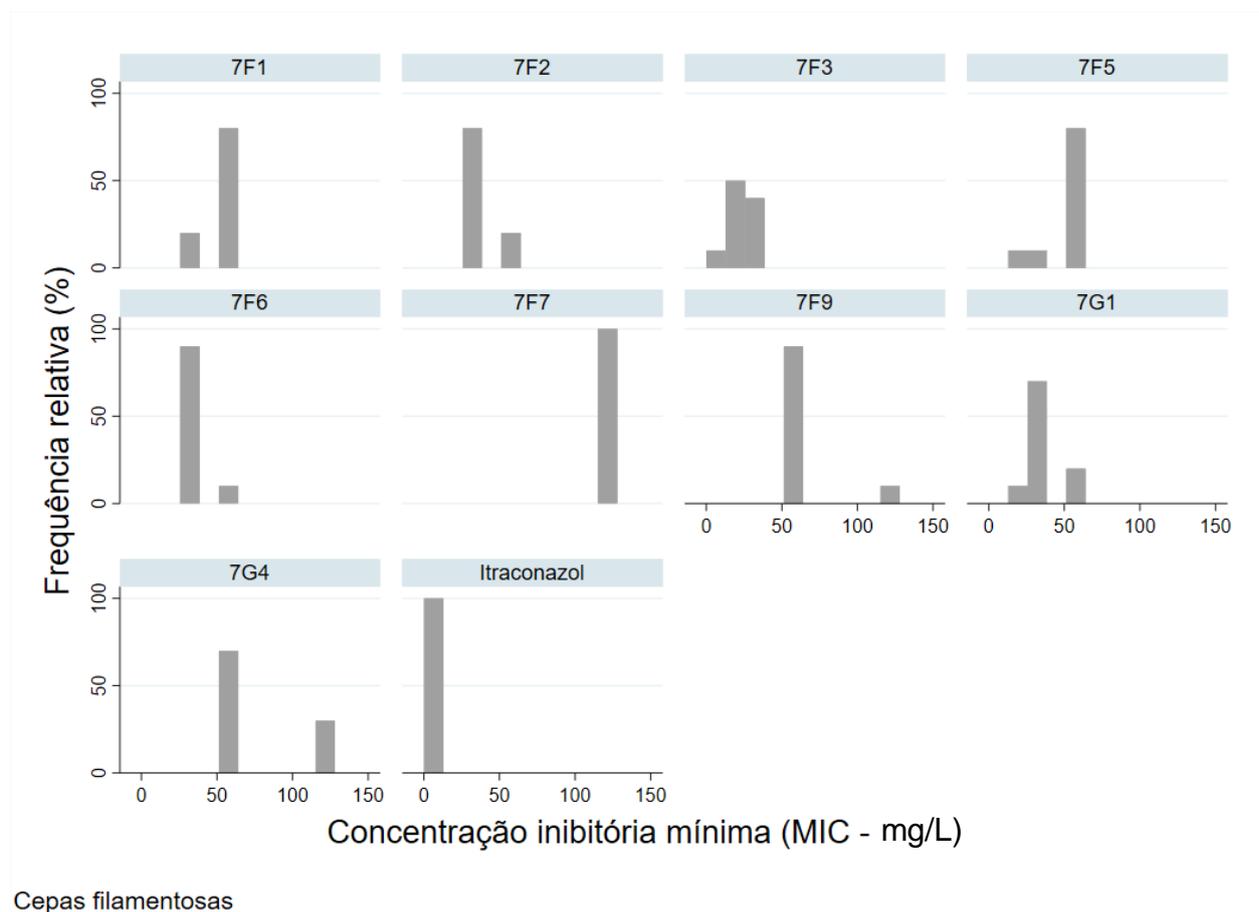
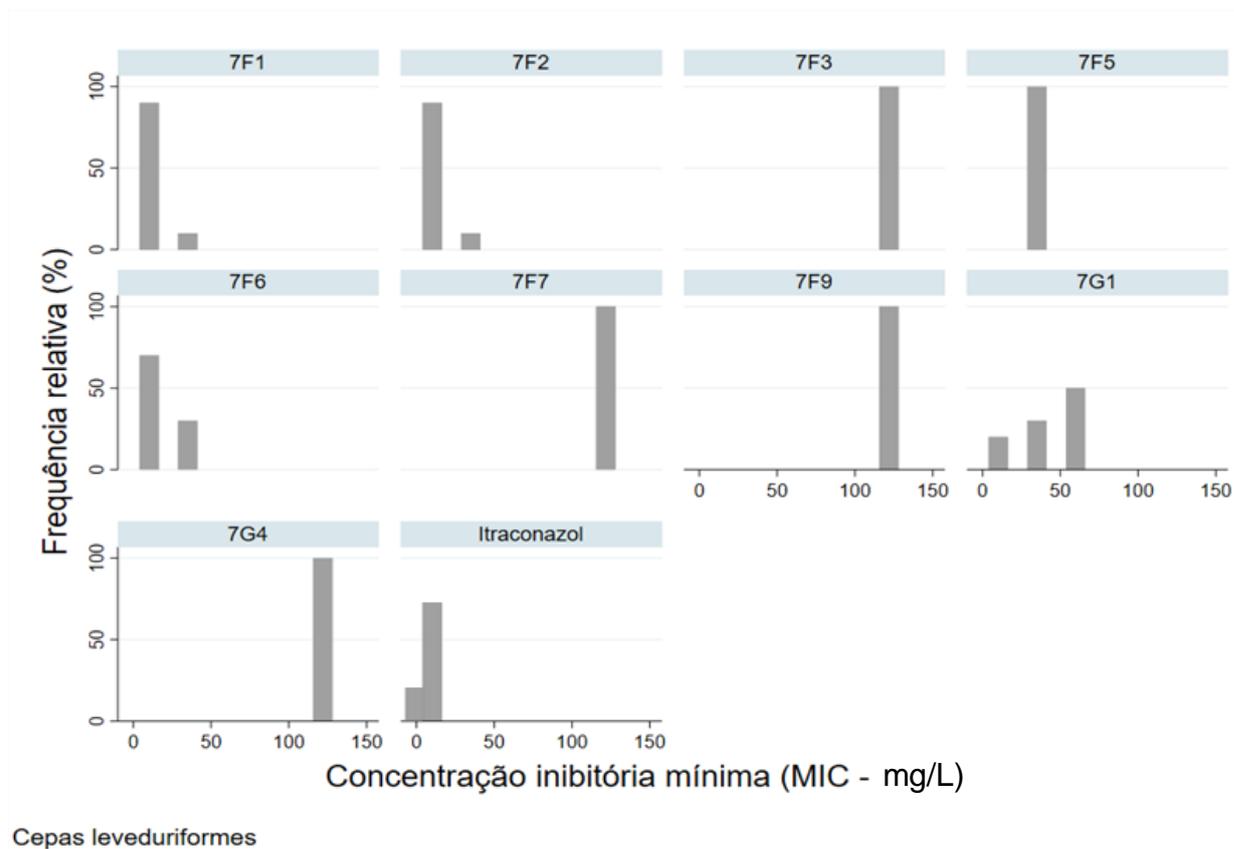


Figura 12 – Histograma das distribuições de frequências das concentrações inibitórias mínimas das bases de Schiff e itraconazol avaliadas frente às cepas leveduriformes de *S. bralisiensis*.



Os histogramas apresentados e o teste de Shapiro-Wilk mostraram que os resultados obtidos para as MICs não apresentaram uma distribuição normal. Sendo assim, a mediana foi considerada como uma melhor medida de tendência central para a comparação dos dados.

Importante salientar que no momento da dissolução da solução estoque das bases de Schiff 7F10, 7G3 e 7G5 em meio líquido RPMI 1640 tamponado houve precipitação, diminuindo a quantidade de substância disponível para a ação antifúngica. Devido a esta limitação, os resultados obtidos para essas bases de Schiff foram descartados.

As bases de Schiff 7F2 - Fenol, 3 - [[[4- (fenilamino) fenil] imino] metil]; 7F3 - Fenol, 2 - [[[4- (fenilamino) fenil] imino] metil]; 7F6 - 1,4-benzenodiamina, N1-fenil-N4- (2-piridilmetileno); 7G1 - 1,4-benzenodiamina, N1 - [(4-metoxifenil) metileno] -

N4-fenil foram as mais eficazes para os fungos filamentosos. A base de Schiff 7F3 apresentou o melhor resultado para a forma filamentosa, com mediana de 16 mg/L e MIC variando de 8-32 mg/L; seguida pelas bases de Schiff 7G1 (mediana de 32 mg/L e MIC variando de 16-64 mg/L), 7F6 (mediana de 32 mg/L e MIC variando de 32-64 mg/L) e 7F2 (mediana de 32 mg/L e MIC variando de 32-64 mg/L).

Nas condições experimentais realizadas, para a base de Schiff 7F7 foi identificada atividade inibitória de crescimento indetectável para a forma filamentosa, onde todas as cepas fúngicas apresentaram $MIC \geq 128$ mg/L. Já para as bases de Schiff 7G4 e 7F9, três cepas fúngicas e uma cepa fúngica, respectivamente, apresentaram $MIC \geq 128$ mg/L.

Utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi possível identificar diferenças estatisticamente significativa entre as MICs obtidas para as bases de Schiff avaliadas e o itraconazol nas cepas filamentosas ($P < 0,001$). Entretanto, na comparação pareada dos compostos, realizada a partir do pós-teste de Dunn, verificou-se que a MIC observada para o itraconazol foi estatisticamente igual à MIC observada para o composto 7F3 ($P > 0,05$). As MICs dos demais compostos apresentaram diferenças estatisticamente significativa em relação a MIC do itraconazol ($P < 0,05$).

As bases de Schiff 7F1 - Fenol, 3 - [[4- (fenilamino) fenil] imino] metil], 7F2 e 7F6 foram mais eficazes para a forma leveduriforme. Essas bases apresentaram mediana de 16 mg/L com MIC variando de 16-32 mg/L. Não foi possível detectar a atividade inibitória para as bases de Schiff 7F3, 7F7, 7F9 e 7G4, visto que para todas as cepas fúngicas testadas apresentaram $MIC \geq 128$ mg/L.

A partir do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as MICs observadas para as bases de Schiff avaliadas e o itraconazol nas cepas leveduriformes ($P < 0,001$). Na comparação pareada das bases de Schiff a partir do pós-teste de Dunn, verificou-se que a MIC observada para o itraconazol foi estatisticamente diferente das MICs observadas para todas as bases de Schiff ($P < 0,05$).

Espécies de *Sporothrix* de casos humanos e animais têm mostrado capacidade de desenvolver resistência aos antifúngicos convencionais, principalmente ao itraconazol,

que tem sido o antifúngico de referência para o tratamento da esporotricose felina. Estudos mostram que *S. brasiliensis* têm apresentado alta capacidade de adquirir mecanismo mutacional ou de resistência ao itraconazol (WALLER et al., 2020a).

Além das bases de Schiff, o itraconazol também foi avaliado frente às cepas de *S. brasiliensis* em suas duas formas. Houve uma diferença no perfil de suscetibilidade entre as formas filamentosas e leveduriforme. Embora não haja ponto de interrupção para espécies de *Sporothrix* como critério de sensibilidade, esse trabalho seguiu Espinel-Ingroff et al. (2017), que propôs um valor de corte epidemiológico, onde isolados que apresentarem MIC ≤ 2 mg/L podem ser considerados sensíveis ao itraconazol e MIC > 2 mg/L podem ser considerados como isolados resistente ao itraconazol.

No presente estudo, todos os isolados de *S. brasiliensis* testados na forma filamentosa, apresentaram MIC $\leq 0,125$ mg/L, sendo considerados como sensíveis. Estes resultados então em concordância com o observado por Brilhante et al. (2016), que relataram isolados filamentosos de *S. brasiliensis* sensíveis ao itraconazol, com MIC de 0,125 mg/L. Entretanto, difere dos resultados encontrados por Nakasu et al. (2020), que relataram isolados de *S. brasiliensis* apresentando MIC variando entre 4 a ≥ 16 mg/L, sendo a maioria (58,33%) com MIC ≥ 16 mg/L, mostrando a resistência desses isolados ao itraconazol.

Waller et al. (2015) e Peter et al. (2019), também relataram cepas filamentosas de *S. brasiliensis* resistentes ao itraconazol, com MIC > 16 mg/L. Waller et al. (2020b) observaram que 34,5% dos isolados filamentosos de *S. brasiliensis* apresentaram resistência a todas cinco formulações de itraconazol disponíveis no mercado para uso em humanos e veterinário, sendo que alguns isolados apresentando MIC superior a 16 mg/L.

Todos os isolados da forma leveduriforme apresentaram resistência ao itraconazol, com mediana de 8 mg/L e MIC variando entre 4-8 mg/L. O alto valor de MIC encontrado no presente trabalho estão em concordância com os resultados apresentados por Waller et al. (2016b), que identificaram cepas leveduriformes com MIC de até 16 mg/L. Borba-Santos et al. (2015a) também identificaram resistência em

38,5% dos isolados de *S. brasiliensis* na forma leveduriforme, com MIC variando entre 4 -16 mg/L.

De um modo geral, a literatura mostra que a sensibilidade de isolados de *S. brasiliensis* frente ao itraconazol apresentaram MIC mais elevado para a forma filamentosa quando comparado com a forma leveduriforme. Ishida et al. (2015) observaram que a forma filamentosa foi menos sensível ao itraconazol (MIC - 4 mg/L) do que a forma leveduriforme (MIC - 0,5 mg/L). Já Sanchotene et al. (2017) encontraram altos valores de MIC (≥ 4 mg/L) em ambas as fases, sendo que 20% dos isolados filamentosos apresentaram MIC entre 4-8 mg/L e 14,2% dos isolados leveduriformes apresentaram MIC entre 8-32 mg/L. Borba-Santos et al. (2015b) identificaram resistência em 37,5% de isolados filamentosos e 28,12% de isolados leveduriformes. Os achados do presente trabalho mostraram que 100% dos isolados da forma leveduriforme apresentaram resistência ao itraconazol, diferente da forma filamentosa, que mostrou sensibilidade. Embora nenhum estudo tenha investigado contra qual forma de fungos dimórficos a atividade *in vitro* se correlaciona melhor com o resultado do tratamento, sabe-se que a forma leveduriforme é a forma parasitária do fungo.

A promissora atividade antifúngica *in vitro* das bases de Schiff tem sido relatada na literatura contra espécies de *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. (DA SILVA et al., 2011b; MAGALHÃES et al., 2013), *Epidermophyton* sp., *Microsporum* spp., *Trichophyton* sp. e *Histoplasma capsulatum* (PANDEYA et al., 1999a; PANDEYA et al., 1999b; KARTHIKEYAN et al., 2006) que são fungos de importância clínica. Entretanto, as bases de Schiff avaliadas no presente trabalho não estão descritas na literatura e, conseqüentemente, não possuem relatos sobre sua atividade antifúngica. Além disso, não há relatos de outras bases de Schiff frente a isolados de *Sporothrix*. Nesse contexto, nosso estudo traz novas contribuições mostrando o potencial antifúngico de bases de Schiff derivadas da 4-aminodifenilamina contra *S. brasiliensis*.

A síntese das bases de Schiff é realizada através de um processo com etapa única em que a reação se desenvolve no tempo de dois minutos e com rendimentos de até 96%, o que torna sua produção em larga escala um processo rápido e de baixo custo,

quando comparado ao processo de síntese de outros fármacos, principalmente do itraconazol, que demanda de mais etapas para ser produzido, o que torna o custo do processo de síntese elevado (DA SILVA et al., 2011b; RAMAKRISHNANA; PAMUJULA, 2011). Considerando esse fator juntamente com os dados encontrados, a base de Schiff 7F3 apresentou os melhores resultados para isolados na forma filamentosa, sendo estatisticamente semelhante ao itraconazol, e as bases de Schiff 7F2 e 7F6 apresentaram ação antifúngica para ambas as formas.

O conjunto dos resultados obtidos mostram que as bases de Schiff podem ser relevantes no combate de *S. brasiliensis*. Porém, estudos complementares precisam ser realizados para elucidar a ação desses compostos, além de testes de citotoxicidade, considerando que são compostos novos e pouco se sabe sobre eles. Adicionalmente, como perspectiva, é importante avaliar o impacto da associação das bases de Schiff avaliadas no presente trabalho com o itraconazol, visando sinergismo. Como apresentado na revisão da literatura, a associação de antifúngicos tem sido benéfica em casos refratários ao itraconazol. Além disso, a associação também pode reduzir o custo do tratamento, ponderando que as bases de Schiff relatadas apresentam um custo reduzido de processo quando comparado ao processo de síntese do itraconazol.

6 CONCLUSÕES

- A base de Schiff 7F3 nas concentrações de 8-32 mg/L foi capaz de inibir o crescimento de isolados de *Sporothrix brasiliensis* em sua forma filamentosa, sendo estatisticamente semelhante ao itraconazol.
- A base de Schiff 7F1, 7F2 e 7F6 nas concentrações de 16-32 mg/L foram capazes de inibir o crescimento de isolados de *Sporothrix brasiliensis* em sua forma leveduriforme, embora tenham apresentado desempenho inferior ao itraconazol.
- As bases de Schiff derivados de 4-aminodifenilamina constituem um amplo campo de estudo promissor de busca alternativas antifúngicas, frente ao problema de resistência no tratamento da esporotricose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. J.; REIS, N. F.; LOURENÇO, C. S.; COSTA, N. Q.; BERNARDINO, M. L. A.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. Esporotricose em felinos domésticos (*Felis catus domesticus*) em Campos dos Goytacazes, RJ. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.7, p. 1438-1443, 2018.

ALMEIDA-PAES, R.; BRITO-SANTOS, F.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; MACHADO, A. C. S.; OLIVEIRA, M. M. E.; PEREIRA, S. A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. 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.

ALSPAUGH, J. A. New Spins on Old Drugs: Enhancing Activity of Antifungals. **Cell Chemical Biology**, v. 27, n. 3, p. 255–256, 2020.

ANTUNES, T. A.; NOBRE, M. O.; FARIA, R. A.; MEINERZ, A. R. M.; MARTINS, A. A.; CLEFF, M. B.; FERNANDES, C. G.; MEIRELES, M. C. A. Esporotricose cutânea experimental: Avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 706-710, 2009.

ARENAS, R.; SANCHEZ-CARDENAS, C. D.; RAMIREZ-HOBAN, L.; RUIZ ARRIAGA, L. F.; VEGA MEMIJE, M. E. Sporotrichosis: from KOH to molecular biology. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 2018.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINE, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651–655, 2009.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; DO VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529-535, 2004.

BOECHAT, J. S.; OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; GREMIÃO, I. D. F.; MACHADO, A. C. DE S.; OLIVEIRA, R. DE V. C.; FIGUEIREDO, A. B. F.; RABELLO, V. B. F.; SILVA, K. B. L.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological

agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 185–196, 2018.

BORBA-SANTOS, L. P.; GAGINI, T.; ISHIDA, K.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 415-422, 2015a.

BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; CAMARGO, Z. P.; NUCCI, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.; ROZENTAL, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 178–188, 2015b.

BRILHANTE, R. S. N.; MALAQUIAS, Â. D. M.; CAETANO, É. P.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; LIMA, R. A. C.; MARQUES, F. J. F.; ALENCAR, L. P.; MONTEIRO, A. J.; CAMARGO, Z. P.; BANDEIRA, T. J. RODRIGUES, A. M.; CORDEIRO, R. A.; MOREIRA, J. L.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. *In vitro* inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 320–325, 2014a.

BRILHANTE, R. S. N.; PEREIRA, V. S.; OLIVEIRA, J. S.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; PEREIRA-NETO, W. A.; ROCHA, M. F. Terpinen-4-ol inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future Microbiology**, v. 14, n. 14, p. 1221–1233, 2019.

BRILHANTE, R. S. N.; RODRIGUES, A. M.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F.; PEREIRA, S. A.; GREMIAO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; DE CAMARGO, Z. P. *In vitro* susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p.275–279, 2016.

BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, M.; PEREIRA, V. S.; OLIVEIRA, J. S.; MACIEL, J. M.; SILVA, I, N. G. GARCIA, L. G. S.; GUEDES, G. M. M.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Medical Mycology**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2018.

BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, N. F.; MARQUES, F. J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; LIMA, R. A. C.; MALAQUIAS, A. D. M.; CAETANO, E. P.; BARBOSA, G. R.; CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. ROCHA, M. F. G. *In vitro* inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 93–98, 2014b.

BRODOWSKA, K.; LODYGA-CHRUŚCIŃSKA, E. Schiff bases - interesting range of applications in various fields of science. **CHEMIK**, v. 68, n. 2, p. 129-134, 2014.

BURKE, M.; GRAUER, G.; MACY D. Successful treatment of cutaneolymphatic sporotrichosis in cat with ketoconazole and sodium iodine. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 19, n. 1; p. 542-547, 1983.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 2, n. 1, p. 85–94, 2004.

CARVALHO, B. W.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, A. B. F.; MIRANDA, L. H. M.; PEREIRA-OLIVEIRA, G. R.; SCHUBACH, T. M. P.; GREMIÃO, I. D. F. Iodeto de sódio: uma alternativa de tratamento para a esporotricose felina?. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, p. 1-7, 2018.

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.; DE CAMPOS, M. P.; BARROS, M. B. L.; DO CARMO, C. N.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis – Study of 147 Cases. **Zoonoses and Public Health**. v. 60, n. 2, p. 149-153, 2012.

CHEN, M.; ZENG, J.; DE HOOG, G. S.; STIELOW, B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; LIAO, W.; LACKNER, M. The “species complex” issue in clinically relevant fungi: A case study in *Scedosporium apiospermum*. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 137–146, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, approved standard, M38-A2, 2nd ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, approved standard, M27-A3, 3rd ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008b.

COIACETTO, F.; ARTHUR, I.; SULLIVAN, L.; LEUNG, M. Disseminated Sporotrichosis in a Bilby (*Macrotis lagotis*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 170, n. 1, p. 74–77, 2019.

CÓRDOBA, S.; ISLA, G.; SZUSZ, W.; VIVOT, W.; HEVIA, A.; DAVEL, G.; CANTEROS, C. E. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 441–448, 2018.

CORGOZINHO, K. B.; SOUZA, H. J. M.; NEVES, A.; FUSCO, M. A.; BELCHIOR, C. Um caso atípico de esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2; p. 167-170, 2006.

COUTO, C.; RAPOSO, N.; ROZENTAL, S.; BORBA-SANTOS, L.; BEZERRA, L.; DE ALMEIDA, P.; BRANDÃO, M. Chemical Composition and Antifungal Properties of Essential Oil of *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 1207-1212, 2015.

CROTHERS, S. L.; WHITE, S. D.; IHRKE, P. J.; AFFOLTER, V. K. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 4, p. 249–259, 2009.

DA ROCHA, R.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; DOS REIS, E. G.; CARVALHO, B. W.; GREMIAO, I. D. F. Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide. **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, n. 11, p. 720–721, 2018.

DA SILVA, C. M.; DA SILVA, D. L.; MARTINS, C. V. B.; DE RESENDE, M. A.; DIAS, E. S.; MAGALHÃES, T. F. F.; RODRIGUES, L. P.; SABINO, A. A.; ALVES, R.; Synthesis of Aryl Aldimines and Their Activity against Fungi of Clinical Interest. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 78, n. 5, p. 810-815, 2011a.

DA SILVA, C. M.; DA SILVA D. L.; MODOLO, L. V.; ALVES, R. B.; DE RESENDE, M. A.; MARTINS, C. V. B.; DE FÁTIMA, A. Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. **Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2011b.

DA SILVA, D. T.; PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; CHAVES, A. R.; CAVALCANTI, M. C. H.; SILVA, J. N.; SCHUBACH, T. M. P. Esporotricose conjuntival felina. **Acta Scientiae Veterinarie**, n. 36, n. 2, p. 181-184, 2008.

DA SILVA, F. S.; CUNHA, S. C. S.; BAPTISTA, A. R. S.; BAPTISTA, V. S.; DA SILVA, K. V. G. C.; COELHO, T. F. Q.; FERREIRA, A. M. R. Miltefosine Administration in Cats with Refractory Sporotrichosis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, p. 1–7, 2018.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, n. 1, p. 165–191, 2016.

DE BEER, Z. W.; HARRINGTON, T. C.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras*: *Sporothrix schenckii* Complex. **Mycologia**, v. 95, n. 3, p. 434-441, 2003.

DE MIRANDA, L. H. M.; SILVA, J. N.; GREMIAO, I. D. F.; MENEZES, R. C.; ALMEIDA-PAES, R.; DOS REIS, E. G. Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin lesions of cats for predicting antifungal treatment response. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 1-11, 2018.

DE SOUZA, C. P.; LUCAS, R.; RAMADINHA, R. H. R.; PIRES, T. B. C. P. Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 137-143, 2016.

DE SOUZA, E. W.; BORBA, C. M.; PEREIRA, S. A.; GREMIAO, I. D. F.; LANGOHR, I. M.; OLIVEIRA, M. M. E.; DE OLIVEIRA, R. V. C.; DA CUNHA, C. R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; DE MIRANDA, L. H. M.; MENEZES, R. C. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1. p. 1-10, 2018.

DE SOUZA, L. L.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEINERZ, A. R. M.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 372-374, 2006.

DUNSTAN, R. W.; LANGHAM, R. F.; REIMANN, K. A.; WAKENELL, P. S. Feline sporotrichosis: A report of five cases with transmission to humans. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 1, p. 37-45, 1986.

ECHEVARRIA, A.; NASCIMENTO, M. G.; GERÔNIMO, V.; MILLER, J.; GIESBRECHT, A. NMR spectroscopy, hammett correlations and biological activity of some Schiff bases derived from piperonal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 1, p. 60-64, 1999.

ESPINEL-INGROFF, A.; ABREU, D. P. B.; ALMEIDA-PAES, R.; BRILHANTE, R. S. N.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; HAGEN, F.; CÓRDOBA, S.; GONZALEZ, G. M.; GOVENDER, N. P.; GUARRO, J.; JOHNSON, E. M.; KIDD, S. E.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; ROZENTAL, S.; SZESZS, M. W.; BALLESTÉ ALANIZ, R.; BONIFAZ, A.; BONFIETTI, L. X.; BORBA-SANTOS, L. P.; CAPILLA, J.; COLOMBO, A. L.; DOLANDE, M.; ISLA, M. G.; MELHEM, M. S. C.; MESA-ARANGO, A. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; PANIZO, M. M.; PIRES DE CAMARGO, Z.; ZANCOPE- OLIVEIRA, R. M.; MEIS, J. F.; TURNIDGE, J. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 10, p. 1-17, 2017

ETCHECOPAZ, A.; SCARPA, M.; MAS, J.; CUESTAS, M. L. *Sporothrix brasiliensis*: A growing hazard in the Northern area of Buenos Aires Province?. **Revista Argentina de Microbiología**, v.1, n. 1, p. 1-2, 2020.

FÁVERO, L. P.; BELFIORE, P. **Manual de análise de dados: estatística e modelagem multivariada com Excel®, SPSS® e Stata®**. Elsevier Brasil, 2017.

FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; AMARAL, C. C.; SASAKI, A. A.; GODOY-MARTINEZ, P.; CAMARGO, Z. P. D. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: a forgotten and re-emergent Pathogen. **The Open Mycology Journal**, v. 3, n. 1, p. 48–58, 2009

FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; RODRIGUES, A. M.; SASAKI, A. A.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. 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.

FERNÁNDEZ-SILVA, F.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; GUARRO, J. Efficacy of Posaconazole in Murine Experimental Sporotrichosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2273–2277, 2012.

FOREZI, L. S. M.; BORBA-SANTOS, L. P.; CARDOSO, M. F. C.; FERREIRA, V. F.; ROZENTAL, S.; DA SILVA, F. C. Synthesis and antifungal activity of coumarins derivatives against *Sporothrix* spp. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 164–171, 2018.

GINTJEE, T. J.; DONNELLEY, M. A.; THOMPSON, G. R. Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 28, p. 1-14, 2020.

GONDIM, A. L. C. L.; LEITE, A. K. A. Aspectos gerais da esporotricose em pequenos animais e sua importância como Zoonose. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 10, n. 2, p. 37-44, 2020.

GONZALEZ-CABO, J. F.; DE LAS HERAS GUILLAMON, M.; LATRE CEQUIEL, M. V.; GARCIA DE JALON CIERCOLES, J. A. Feline sporotrichosis: a case report. **Mycopathologia**, v. 108, n. 3, p. 149-154, 1989.

GOUGEROT, H. New insight gained in general pathology and practical medicine by the study of sporotrichoses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1348-1356, 1950.

GREMIÃO, I. D. F.; MENEZES, R. C.; SCHUBACH, T. M.; FIGUEIREDO, A. B.;

CAVALCANTI, M. C.; PEREIRA, S. A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15–21, 2014.

GREMIÃO, I. D. F.; OLIVEIRA, M. M. E.; MIRANDA, L. H. M.; FREITAS, D. F. S.; PEREIRA, S. A. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 621-624, 2020.

GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; FIGUEIREDO, F. B.; NASCIMENTO-JÚNIOR, A.; SANTOS, I. B.; SCHUBACH, T. M. P. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 221-223, 2006.

GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; CHAVES, A. R.; BARROS, M. B. L. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 8, p. 720-723, 2009.

GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; HONSE, C. O.; BARROS, M. B. L. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 9, p. 346-351, 2011.

GREMIÃO, I. D. F.; MIRANDA, L. H. M.; REIS, E. G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2017.

GUIRADO, G. M. P.; FEITOSA, L. S.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; NAVARRO, R. S. Analysis of laser therapy effects in *Sporothrix schenckii* inactivation *in vivo*. **Research on Biomedical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 93–101, 2018.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MONZÓN, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal susceptibility profile *in vitro* of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 227–231, 2010.

HADDAD, V.J.; MIOT, H. A.; BARTOLI, L. D.; CARDOSO, A. C.; DE CAMARGO, R. M. Localized lymphatic sporotrichosis after fish-induced injury (*Tilapia* sp.). **Medical Mycology**, v. 40, n. 4, p. 425–427, 2002.

HAN, H. S.; KANO, R.; CHEN, C.; NOLI, C. Comparison of two *in vitro* antifungal sensitivity tests and monitoring during therapy of *Sporothrix schenckii sensu stricto* in Malaysian cats. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 156-162, 2017.

HIRANO, M.; WATANABE, K.; MURAKAMI, M.; KANO, R.; YANAI, T.; YAMAZOE, K.; FUKATA, T.; KUDO, T. A Case of Feline Sporotrichosis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 3, p. 283–284, 2006.

HONSE, C. O.; RODRIGUES, A. M.; GREMIAO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. **Veterinary Record**, v. 166, n. 7, p. 208–209, 2010.

INSTITUTO PET BRASIL. **CENSO PET: 139,3 MILHÕES DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO NO BRASIL, 2019.** Disponível em: <<http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/>>. Acesso em: 11 de março de 2020.

ISHIDA, K.; DE CASTRO, R. A.; BORBA DOS SANTOS, L. P.; QUINTELLA, L. P.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ROZENTAL, S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 34–41, 2015.

JESMIN, M.; ALI, M. M.; SALAHUDDIN, M. S.; HABIB, M. R.; KHANAM, J. A. Antimicrobial activity of some Schiff bases derived from benzoin, salicylaldehyde, aminophenol and 2,4-dinitrophenyl hydrazine. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 70–73, 2008.

JUNG, J. Y.; ALMOND, C. H.; CAMPBELL, D. C.; ELKADI, A.; TENORIO, A. Role of surgery in the management of pulmonary sporotrichosis. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 77, n. 2, p. 234-239, 1979.

KARTHIKEYAN, M. S.; PRASAD, D. J.; POOJARY, B.; BHAT, K. S.; HOLLA, B. S.; KUMARI, N. S. Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 22, p. 7482-7489, 2006.

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

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

LAM, P. L.; LEE, K. K. H.; KOK, S. H. L.; GAMBARI, R.; LAM, K. H.; HO, C. L.; MA, X.; LO, Y. H.; WONG, W. Y.; DONG, Q. C.; BIAN, Z. X.; CHUI, C. H.

Antifungal study of substituted 4-pyridylmethylene-4'-aniline Schiff bases. **RSC Advances**, v. 6, n. 106, 104575–104581, 2016.

LARSSON, C. E.; GONÇALVES, M. A.; ARAUJO, V. C.; DAGLI, M. L. Z.; CORREA, B.; FAVA NETO, C. Esporotricosis felina: aspectos clínicos e zoonóticos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 5, p. 351-358, 1989.

LARSSON, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

LLORET, A.; HARTMANN, K.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HOSIE, M. J.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Sporotrichosis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 619–623, 2013.

LOPES-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M.; ZHANG, Y.; NINO-VEGA, G.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; DE HOOG, S. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. S126–S143, 2018.

MACDONALD, E.; EWERT, A.; REITMEYER, J. C. Reappearance of *Sporothrix schenckii* lesions after administration of Solu-MedrolR to infected cats. **Medical Mycology**, v. 18, n. 4, p. 295–300, 1980.

MACKAY, B. M.; MENRATH, V. H.; RIDLEY, M. F.; KELLY, W. R. Sporotrichosis in a cat. **Australian Veterinary Practitioner**, v. 16, n. 1, p. 3-5, 1986.

MADRID, I. M.; MATTEI, A.; MARTINS, A.; NOBRE, M.; MEIRELES, M. Feline Sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande Do Sul, Brazil: Clinical, Zoonotic and Therapeutic Aspects. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 2, p. 151–154, 2010.

MAGALHÃES, T. F. F.; DA SILVA, C. M.; DE FÁTIMA, Â.; DA SILVA, D. L.; MODOLO, L. V.; MARTINS, C. V. B.; ALVES, R. B.; RUIZ, A. L. T. G.; LONGATO, G. B.; DE CARVALHO, J. E.; DE RESENDE-STOIANOFF, M. A. Hydroxyaldimines as potentes in vitro anticryptococcal agents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 137–143, 2013.

MAKRI, N.; PATERSON, G. K.; GREGGE, F.; URQUHART, C.; NUTTALL, T. First case report of cutaneous sporotrichosis (*Sporothrix* species) in a cat in the UK. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2020.

MALIK, R.; CRAIG, A.; WIGNEY, D.; MARTIN, P.; LOVE, D. Combination chemotherapy of canine and feline cryptococcosis using subcutaneously administered amphotericin B. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, n. 4, p. 124–128, 1996.

MALIK, M. A.; LONE, S. A.; GULLI, P.; DAR, O. A.; WANI, M. Y.; AHMAD, A.; HASHMI, A. A. Efficacy of Novel Schiff base Derivatives as Antifungal Compounds in Combination with Approved Drugs Against *Candida Albicans*. **Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2019.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENE, 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, 2007a.

MARIMON, R.; GENE, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; DOS SANTOS LAZERA, M.; GUARRO, J. Molecular Phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251-3256, 2006.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENE, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In vitro* Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 732–734, 2007b.

MASCARENHAS, M. B.; BOTELHO, C. B.; MANIER, B. S. M. L.; COSTA, T. S.; FERNANDES, J. I. An unusual case of feline otitis externa due to sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2019.

MCGINNIS, M. R.; NORDOFF, N.; LI, R. K.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 369–371, 2001.

MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; BRUM, C. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. DE B. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 60–62, 2007.

MIGAKI, G.; FONT, R. L.; KAPLAN, W.; ASPER, E. D. Sporotrichosis in a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 12, p. 1916-1919, 1978.

MIRANDA, L. H. M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; QUINTELLA, L. P.; KURAIEM, B. P.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation.

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v. 36, n. 4, p. 425–432, 2013.

MIRANDA, L. H. M.; MELI, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; NOVACCO, M.; MENEZES, R. C.; PEREIRA, S. A.; SUGIARTO, S.; REIS, E. G.; GREMIÃO, I. D. F.; HOFMANN-LEHMANN, R. Co-infection with feline retrovirus is related to changes in immunological parameters of cats with sporotrichosis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1-16, 2018.

MIRANDA, L. H. M.; SANTIAGO, M. DE A.; SCHUBACH, T. M. P.; MORGADO, F. N.; PEREIRA, S. A.; OLIVEIRA, R. DE V. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8^{low} cells and a decrease in CD4⁺ cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 29-39, 2015.

NAKAMURA, Y.; SATO, H.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, H.; KOIDE, K.; HASEGAWA, A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan. **Mycoses**, v. 39, n. 4, p. 125–128, 1996.

NAKASU, C. C. T.; WALLER, S. B.; RIPOLL, M. K.; FERREIRA, M. R. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; GOMES, A. R.; OSÓRIO, L. G.; FARIA, R. O.; CLEF, M. B. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 1, 2020.

NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; CAETANO, D.; SOUZA, L. L.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, n. 1, p. 137-140, 2001.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Antifungal drugs for small and large animals. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

NUSBAUM, B. P.; GULBAS, N.; HORWITZ, S. N. Sporotrichosis acquired from a cat. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 3, p. 386-391, 1983.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OLIVEIRA, D. C.; LOPES, P. G. M.; 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**, v. 49, n. 8, p. 3047–3049, 2011.

OLIVEIRA, M. M. E.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P.; ROMEO, O.; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C.; LIMA, N.; ZANCOPE-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, 2015.

OROFINO-COSTA, R. C.; MACEDO, P. M.; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A.; R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 92, n. 5, p. 606–20, 2017.

PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DE CLERCQ, E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and *N*-[4-(49-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 25–31, 1999a.

PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DE CLERCQ, E. Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine. **Il Farmaco**, v. 54, n. 9, p. 624-628, 1999b.

PANNEERSELVAM, P.; NAIR, R. R.; VIJAYALAKSHMI, G.; SUBRAMANIAN, E. H.; SRIDHAR, S. K. Synthesis of Schiff bases of 4-(4-aminophenyl)- morpholine as potential antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 225-229, 2005.

PEASTON, A. Clinical Vignette. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 1, p. 44–45, 1993.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; BOECHAT, J. S.; VIANA, P. G.; SHUBACH, T. M. P. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392-393, 2014.

PEREIRA, S. A.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; SILVA, J. N. O.; HONSE, C.; FIGUEIREDO, F. B.; SILVA, D. T.; KITADA, A. A. B.; REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M. P. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 4, p. 220–223, 2011.

PEREIRA, S. A.; PASSOS, S. R. L.; SILVA, J. N.; GREMIÃO, I. D. F.; FIGUEIREDO, F. B.; TEIXEIRA, J. L.; MONTEIRO, P. C. F.; SCHUBACH, T. M. P. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 166, n. 10, p. 290-294, 2010.

PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M.; GREMIÃO, I. D.; SILVA, D. T.; FIGUEIREDO F. B.; ASSIS, N. V.; PASSOS, S. R. L. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 331-341, 2009.

PETER, C. M.; WALLER, S. B.; PICOLI, T.; OSÓRIO, L. G.; ZANI, J. L.; MEIRELES, M. C. A.; FARIA, R. O.; MELLO, J. R. B.; HUBNER, S. O.; LIMA, M.; FISCHER, G. Chemical and cytotoxic analyses of three varieties of Brazilian propolis (green propolis, jataí própolis and Brown propolis) and its anti-*Sporothrix brasiliensis* in vitro activity. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 3, p. 819-827, 2019.

PRZYBYLSKI, P.; HUCZYNSKI, A.; PYTA, K.; BRZEZINSKI, B.; BARTL, F. Biological Properties of Schiff Bases and Azo Derivatives of Phenols. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 124-148, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F.; FAHAL, A. H.; FALCI, D. R.; CACERES, D. H.; CHILLER, T.; PASQUALOTTO, A.C. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11., p. 367-377, 2017.

RAIMER, S. S.; EWERT, A.; MACDONALD, E. M.; REITMEYER, J. C.; DOTSON, A. D.; MADER, J. T. Ketoconazole therapy of experimentally induced sporotrichosis infections in cats: a preliminary study. **Current Therapeutic Research**, v. 33, n. 4, p. 670-680, 1983.

RAMAKRISH-NANA, A.; PAMUJULA, S. **A process for the preparation of itraconazole**. Depositantes: Neuland Laboratories LTD. WO 2U11/121594 A1, 2011.

REDDY, E. R.; TRIVEDI, R.; SUDHEER KUMAR, B.; SIRISHA, K.; SARMA, A. V. S.; SRIDHAR, B.; PRAKASHAM, R. S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel Schiff base tethered boronate esters of 1,2-O-isopropylidene- α -D-xylofuranose, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 15, p. 3447-3452, 2016.

REIS, É. G.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; ROCHA, R. F. D. B.; CASTRO, V. S. P.; BARROS, M. B. L.; MENEZES, R. C.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 399-404, 2012.

REIS, É. G.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; SILVA, J. N.; CARVALHO, B. W.; QUINTANA, M. S. B.; GREMIÃO, I. D. F. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p. 684-690, 2016.

RODRIGUES, A. M. *Anfotericina B subcutânea associada ao itraconazol no tratamento da esporotricose em gatos domésticos*. 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado

em pesquisa clínica em doenças infecciosas) -Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

RODRIGUES, A. M.; CRUZ CHOAPPA, R.; FERNANDES, G. F.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 246–264, 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2013.

RODRIGUES, A. M., DE HOOG, G. 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, 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, p. 1-7, 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n.12, p. 1-22, 2015.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CÁSSIA PIRES, D.; BRIHANTE, R. S. N.; DA COSTA SIDRIM, J. J.; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L. DE CAMARGO, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014a.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z. P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 5, p. 1-10, 2014b.

RODRIGUES, A. M.; DELLA TERRA, P. P.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; OROFINO-COSTA, R.; DE CAMARGO, Z. P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia.**, v. 1, n. 1, p. 1-30, 2020.

ROSSI, C. N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C. E. Retrospective Assessment of the Treatment of Sporotrichosis in Cats and Dogs Using Itraconazole. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, p. 1-5, 2013.

SAKIYAN, I.; LO GO GLU, E.; ARSLAN, S.; SARI, N.; SAKIYAN, N. Antimicrobial activities of N-(2-hydroxy-1-naphthalidene)-amino acid (glycine, phenylalanine, histidine, tryptophane) Schiff bases and their manganese (III) complexes. **BioMetals**, v. 17, n. 2, p. 115–120, 2004.

SANCHOTENE, K. O.; BRANDOLT, T. M.; KLAFKE, G. B.; POESTER, V. R.; XAVIER, M. O. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: Comparison of yeast and mycelial phases. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p. 869–876, 2017.

SANCHOTENE, K. O.; MADRID, I. M.; KLAFKE, G. B.; BERGAMASHI, M.; TERRA, P. P. D.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v.58, n.11, p.652–658, 2015.

SANTOS, A. F.; ROCHA, B. D.; BASTOS, C. V.; OLIVEIRA, C. S. F.; SOARES D. F. M.; PAIS, G. C. T.; XAULIM, G. M. D.; KELLER, K. M.; SALVATO, L. A.; LECCA, L. O.; FERREIRA, L.; SARAIVA, L. H. G.; ANDRADE M. B.; PAIVA M. T.; ALVES, M. R. S.; MORAIS, M. H. S.; AZEVEDO, M. I.; TEIXEIRA, M. K. I.; ECCO, R.; BRANDÃO S. T. Guia Prático para enfrentamento da Esporotricose Felina em Minas Gerais. **Revista V&Z Em Minas**, v. 1, n.137, p. 16-27, 2018.

SARAVANAN, G.; PANNERSELVAM, P.; PRAKASH, C. R. Synthesis and antimicrobial screening of novel Schiff bases of 3-amino-2-methyl quinazolin 4-(3H)-one. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 3, p. 320-325, 2010.

SCHIFF, H. Mittheilungen aus dem Universitäts labororium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. **Annalen Der Chemie Und Pharmacie**, v. 131, n. 1, p. 118–119, 1864.

SCHUBACH, T. M. P.; VALLE, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MONTEIRO, P. C. F.; REIS, R. S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MARZOCHI, K. B. F.; SCHUBACH, A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v. 39, n.1, p. 147-149, 2001.

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B. L.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; PEREZ, M. A.; WANKE, B. T. 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.

SHERDING, R. G. Systemic Mycoses. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Saunders Manual of Small Animal Practice**. 3ª edição. W. B. Saunders Company, 20 de dezembro de 2005. Cap. 20, p. 205-218.

SILVA, J. N.; MIRANDA, L. H. M.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; OLIVEIRA, R. V. C.; VIEIRA, S. M. M.; CONCEIÇÃO, S.; FERREIRO, L.; PEREIRA, S. A. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 160, n. 1, p. 72–78, 2018.

SILVEIRA, C. P.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; ALVARADO-RAMIREZ, E.; MURCIANO-GONZALO, F.; DOLANDE, M.; PANIZO, M.; REVIKINA, V. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n.12, p.1607–1610, 2009.

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 susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1; p. 56–64, 2014.

SUNDRIYAL S.; SHARMA R.K.; JAIN R. Current advances in antifungal targets and drug development. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, n. 11, p.1321-1335, 2006.

THOMSON, J.; TROTT, D. J.; MALIK, R.; GALGUT, B.; ALLISTER, M. M.; NIMMO, J.; RENTON, D.; KIDD, S. E. An atypical cause of sporotrichosis in a cat. **Medical Mycology Case Reports**, v. 23, p. 72–76, 2019.

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

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; DOS SANTOS LAZÉRA, M.; WANKE, B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA PAES, R.; INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 9, p. 3952–3954, 2005.

VAN DAELE, R.; SPRIET, I.; WAUTERS, J.; MAERTENS, J.; MERCIER, T.; VAN HECKE, S.; BRÜGGEMANN, R. Antifungal drugs: What brings the future?. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 328-343, 2019.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; FARIA, R. O.; CLEFF, M. B.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Anti- *Sporothrix* spp. Activity of medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 2, p. 221–237, 2016a.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; FERRAZ, V.; PICOLI, T.; CLEFF, M. B.; DE FARIA, R. O.; DE MELLO, J. R. B. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum jorana* Linn. oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 896–901, 2016b.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; SERRA, E. F.; GOMES, A. R.; CLEFF, M. B.; FARIA, R. O. *In vitro* susceptibility of the *Sporothrix brasiliensis* to aqueous extracts of the green tea (*Camelia sinensis* L. Kuntze). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 4, p. 342-347, 2015.

WALLER, S. B.; DALLA LANA, D. F.; QUATRIN, P. M.; FERREIRA, M. R. A.; FUENTEFRIA, A. M.; MEZZARI, A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 1, n. 1, p. 1-8, 2020a.

WALLER, S. B., RIPOLL, M. K., MADRID, I. M., ACUNHA, T., CLEFF, M. B., CHAVES, F. C.; DE MELLO, J. R. B. DE FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. Susceptibility and resistance of *Sporothrix brasiliensis* to branded and compounded itraconazole formulations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.1, n. 1, p. 1-8, 2020b.

WELSH, R. D. Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 8, p. 1123-1126, 2003.

WILLARD, M. D.; NACHREINER, R. F.; HOWARD, V. C.; FOOSHEE, S. K. Effect of long-term administration of ketoconazole in cats. **American Journal of American Veterinary Research**, v. 47, n.12, p. 2510-2513, 1986.

YAMADA, K.; ZAITZ, C.; FRAMIL, V. M.; MURAMATU, L. H. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide: a 24-year experience in Sao Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 89–93, 2011.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A. M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L.; CHEN, M.; DENG, S.; LI, S.; LIAO, W.; LI, R.; LI, F.; MEIS, J. F.; GUARRO, J.; TEIXEIRA, M.; AL-ZAHRANI, H. S.; PIRES DE CAMARGO, Z.; ZHANG, L.; DE HOOG, G. S. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, n. 1, p. 1–20, 2015.

ZHOU, X.; RODRIGUES, A. M.; FENG, P.; HOOG, G. S. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2013.