



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

MARIANA VERÍSSIMO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS DE
FENOXI-TIOSSEMICARBAZONAS E FENOXI-HIDRAZONA-TIAZÓIS FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix* spp.**

Recife
2024

MARIANA VERÍSSIMO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS DE
FENOXI-TIOSSEMICARBAZONAS E FENOXI-HIDRAZONA-TIAZÓIS FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos. Área de concentração: Micologia médica. Correspondente ao indicado na ata de defesa

Orientador: Prof^o. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Mariana Veríssimo de Souza.

Avaliação do potencial antifúngico de derivados de fenoxi-tiossemicarbazonas e fenoxi-hidrazona-tiazóis frente a isolados clínicos de *Sporothrix* spp / Mariana Verissimo de Souza. - Recife, 2024.

76f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2024.

Orientação: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Inclui referências e apêndices.

1. Perfil de suscetibilidade; 2. *Sporothrix mexicana*; 3. Citotoxicidade; 4. Tiossemicarbazonas; 5. Tiazóis. I. Neto, Reginaldo Gonçalves de Lima. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARIANA VERÍSSIMO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS DE
FENOXI-TIOSSEMICARBAZONAS E FENOXI-HIDRAZONA-TIAZÓIS FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *sporothrix* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia de Fungos da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Bruna Rodrigues de Sousa (Examinadora externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

A todas as pessoas que contribuíram para a finalização deste ciclo, singularmente filho, mãe, pai, irmã, avó e amigos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Orientador Professor Dr. Reginaldo Gonçalves, pelos aprendizados, correções, e pela disposição a ajudar e orientar no que fosse preciso.

À Co-Orientadora Dr^a. Ana Cristina Lima Leite, pela concessão das moléculas para a realização dos testes de sensibilidade, bem como pela disposição para tirar dúvidas.

A todo pessoal do Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Tropicais (LPDDT) do serviço de Dermatologia HC\UFPE pelo acolhimento, em especial à Doutora Bruna Sousa, pela grande ajuda nas instruções para a realização dos testes de sensibilidade e sinergismo, extração de DNA e PCR.

À minha família, que esteve presente em todos os momentos, em especial ao meu filho Isaac Veríssimo, e minha mãe Ana Veríssimo meus portos seguros; e minha irmã Juliana Veríssimo e minha avó Maria Júlia, por todo apoio e incentivo, sem os quais eu jamais teria chegado até aqui.

À minha turma de mestrado, em especial a Ana Elisa, sempre presente nos momentos difíceis como também celebrando conquistas.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar” (Josué 1:9)

RESUMO

A esporotricose é uma infecção micótica provocada por meio da inoculação traumática de inóculos de fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix*. A infecção clássica está associada à fungos presentes no solo, plantas ou matéria orgânica, porém a doença foi progressivamente concatenada à transmissão zoonótica, principalmente por meio da espécie *S. brasiliensis*. Os principais fármacos para o tratamento da esporotricose são o itraconazol e a anfotericina B. Embora ambos apresentem resultados eficientes na terapia da doença, eles possuem diversos efeitos adversos e toxicidade significativa. Desta forma, faz-se necessária a busca por alternativas para agregar o tratamento da esporotricose. Derivados moleculares contendo fenoxi-hidrazona-tiazóis são candidatos potenciais, uma vez que possuem ação antifúngica frente a diferentes espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico dos derivados fenoxi-hidrazona-tiazóis derivados nitrados e halogenados e seus precursores as fenoxi-tiossemicarbazonas, frente à *Sporothrix* spp. Para isso, foram utilizadas cepas de *Sporothrix* sp. que foram armazenados na coleção de culturas da URM/UFPE, bem como no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. Os táxons foram identificados a nível de espécie pelo sequenciamento parcial do gene da calmodulina e análise filogenética. Esta análise também identificou a primeira cepa clínica de *Sporothrix mexicana* de um dos táxons armazenados na coleção de culturas do Departamento de Dermatologia do HC/UFPE. O teste de suscetibilidade antifúngica também foi realizado de acordo com o protocolo M38-A2 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* com itraconazol, anfotericina B e 10 híbridos moleculares das fenoxi-tiossemicarbazonas e fenoxi-hidrazona-tiazóis. Quanto ao perfil de suscetibilidade, 88,8% das cepas foram caracterizadas como selvagens para itraconazol e 11,1% delas foram classificadas como não selvagens para anfotericina B. Híbridos moleculares contendo tiossemicarbazonas foram capazes de inibir o crescimento fúngico. Portanto, os derivados halogenados das tiossemicarbazonas são compostos promissores para incorporação no tratamento da esporotricose devido à sua ação anti-*Sporothrix*.

Palavras-chave: Perfil de susceptibilidade. *Sporothrix mexicana*. Citotoxicidade Tiossemicarbazonas. Tiazóis

ABSTRACT

Sporotrichosis is a mycotic infection caused by the traumatic inoculation of inocula of thermotrophic fungi of the genus *Sporothrix*. The classic infection is associated with fungi present in the soil, plants or organic matter, but the disease has been progressively linked to zoonotic transmission, mainly through the species *S. brasiliensis*. The main medications for treating sporotrichosis are itraconazole and amphotericin B. Although both present efficient results in treating the disease, they have several adverse effects and significant toxicity. Therefore, it is necessary to search for alternatives to add sporotrichosis treatment. Molecular derivatives containing phenoxyhydrazone-thiazoles are potential candidates, as they have antifungal action against different species. The aim of this study was to evaluate the antifungal potential of halogenated phenoxy-hydrazone-thiazole compounds against *Sporothrix* spp. To this, we used strains of *Sporothrix* sp. that were stored in the URM/UFPE culture collection, as well as in the Dermatology Department of the UFPE Hospital das Clínicas. The taxa were identified to species level by partial sequencing of the calmodulin gene and phylogenetic analysis. This analysis also identified the first clinical strain of *Sporothrix mexicana* from one of the taxa stored in the culture collection of the HC/UFPE Dermatology Department. Antifungal susceptibility testing was also carried out according to the M38-A2 protocol of the Clinical & Laboratory Standards Institute with itraconazole, amphotericin B and 10 molecular hybrids of phenoxyhydrazone-thiazoles. As for the susceptibility profile, 88.8% of the strains were characterized as wild-type for itraconazole and 11.1% of them were classified as non-wild-type for amphotericin B. Molecular hybrids containing thiosemicarbazones were able to inhibit fungal growth. Therefore, halogenated phenoxyhydrazone-thiazole derivatives containing mainly the thiosemicarbazone class are promising compounds for incorporating into the treatment of sporotrichosis due to their anti-*Sporothrix* action.

Keywords: Sensitivity test; *Sporothrix*; Synthetic derivatives; Thiosemicarbazones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Principais compostos bioativos da família das acilhidrazonas	33
Figura 2 –	Derivados de fenoxi-hidrazona-tiazóis	33
Figura 3 –	Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança com suporte de 1000 <i>bootstraps</i>	41
Figura 4 –	Esquema dos derivados de fenoxi-hidrazona-tiazóis halogenados.	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Códigos dos pacientes, identificações de *Sporothrix* por meio do sequenciamento CAL, acessos do GenBank e perfil de suscetibilidade antifúngica (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) frente a anfotericina B e itraconazol 44
- Tabela 2 – Atividade antifúngica de 10 derivados halogenados de fenoxihidrazona-tiazol contra nove cepas de *Sporothrix* obtidas por microdiluição em caldo (os valores de CIM estão em $\mu\text{g.mL}^{-1}$).....44
- Tabela 3 – Citotoxicidade em célula hospedeira dos seis compostos da classe das tiossemicarbazonas (série DT) 46
- Tabela 4 - Citotoxicidade dos compostos de tiazol (série ET).....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Acilhidrazonas
AMB	Anfotericina B
CIM	Concentração Inibitória Mínima
GlcCer	Glicosilceramida
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i> (Deoxinucleotídeo trifosfato)
HC	Hospital das Clínicas
ITC	Itraconazol
KI	Iodeto de potássio
LPDDT	Laboratório de Pesquisa em Diagnóstico de Doenças Tropicais
LpQM	Laboratório de Planejamento e Síntese em Química Medicinal
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 ESPOROTRICOSE	17
3.1.1 Histórico	19
3.1.2 Epidemiologia	19
3.1.2.1 <i>Sporothrix mexicana</i>.....	22
3.1.3 Manifestações clínicas	22
3.1.4 Diagnóstico	24
3.1.4.1 Clínico	25
3.1.4.2 laboratorial	25

3.1.4.3 Molecular	26
3.1.6 Tratamento	27
3.1.6.1 Itraconazol.....	28
3.1.6.2 Anfotericina B.....	28
3.1.4.3 Outros antifúngicos	29
3.2 HÍBRIDOS MOLECULARES	30
3.2.1 Derivados de fenoxi-hidrazona-tiazóis	31
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 TIPO E LOCAL DE ESTUDO.....	33
4.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	33
REATIVAÇÃO E VIABILIDADE DAS CEPAS	34
4.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA	34
4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE	36
4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS MOLÉCULAS DA SÉRIE ET SOBRE CÉLULAS DOS VERTEBRADOS L292.....	37
4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS MOLÉCULAS DA SÉRIE ET SOBRE CÉLULAS DE VERTEBRADOS RAW 264.7	38
4.8 TOXICIDADE DA CÉLULA HOSPEDEIRA DA SÉRIE DT	38
5 RESULTADOS	38
5.1 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA	38
5.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	39
5.3 CITOTOXICIDADE DOS HÍBRIDOS MOLECULARES	40
6 DISCUSSÃO.....	42
6.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE FRENTE AOS FÁRMACOS COMERCIAIS. 42	
6.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE FRENTE AOS HÍBRIDOS MOLECULARES.43	
6.3 CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS MOLECULARES.....	45
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A - CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO	52
APÊNDICE B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO.....	53
APÊNDICE C - MANUSCRITO.....	54
APÊNDICE D - FIGURAS DO MANUSCRITO.....	66
APÊNDICE E - TABELAS DO MANUSCRITO	68

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção micótica provocada por meio da inoculação traumática de inóculos de fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix*. As espécies com maior virulência são *Sporothrix schenckii* stricto sensu, *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix globosa* (ZHANG *et al.*, 2015 e GAGINI, 2018)

Historicamente, a esporotricose tem sido atribuída a uma única espécie, *Sporothrix schenckii* (BARROS, 2011 e ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014). Entretanto, segundo Marimon (2007), análises fenotípicas e genotípicas levaram à identificação de quatro novas espécies no complexo *Sporothrix* sp: *S.globosa*, um fungo de distribuição global (VIEILLE *et al.*, 2012 e OLIVEIRA *et al.*, 2010). *S. brasiliensis*, a espécie relacionada à epidemia zoonótica de esporotricose no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2011); *S. mexicana*, inicialmente limitada ao México (MARIMOM *et al.*, 2007), mas com casos recentes relatados em outras regiões (Dias *et al.*, 2011 e Rodrigues 2013), e *S. luriei*, anteriormente *S. schenckii* var. *luriei* (Marimon, 2008)

A infecção clássica está associada a fungos presentes no solo, plantas ou matéria orgânica, porém um número progressivo de casos tem sido relacionado à transmissão zoonótica, principalmente por gatos infectados com *S. brasiliensis*. Esta espécie apresenta importantes atributos de virulência, como maior de melanina e urease, sendo a espécie mais virulenta em modelos murinos e associada com frequência a apresentações clínicas mais graves em humanos, como reações de hipersensibilidade e infecção disseminada (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014 e BONILLA *et al.*, 2021).

Há pouco tempo, precisamente nos últimos cinco anos, um grande número de casos de esporotricose em humanos têm sido encaminhados ao Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco. Um surto de esporotricose vem acometendo humanos e gatos numa escala progressiva, nos municípios de Olinda, Paulista, Igarassu, Abreu e Lima e Mesorregião Metropolitana de Recife, com casos registrados desde 2012. Isso se dá mediante as regiões apresentarem características ambientais semelhantes, o que provavelmente influencia na ocorrência da doença.

O itraconazol (ITC) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose felina e humana (BONIFAZ *et al.*, 2017 e OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Contudo, os relatos de cepas resistentes ao ITC estão aumentando (BORBA-SANTOS *et al.*, 2015 e ALMEIDA-PAES *et al.*, 2017), bem como os casos clínicos refratários, principalmente em gatos. De fato, na esporotricose felina, excetuando o ITC, as opções terapêuticas disponíveis são o iodeto de potássio (KI) e a anfotericina B (AmB), esta última indicada principalmente para a esporotricose disseminada (REIS *et al.*, 2016 e ISHIDA., 2015). Além da ocorrência variável de reações adversas agudas ou crônicas e interações medicamentosas, esses antifúngicos também apresentam limitações em seu uso devido ao alto custo (DA ROCHA *et al.*, 2018 e HAMILL *et al.*, 2013). O tratamento da esporotricose felina é um desafio em muitos casos (PEREIRA *et al.*, 2010), incluindo um número limitado de antifúngicos orais e relatos de falha terapêutica e recrudescência, mesmo quando são utilizados protocolos terapêuticos estabelecidos (GREMIÃO *et al.*, 2020).

Diante do aumento de casos de esporotricose, a Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, lançou uma portaria, onde a esporotricose foi adicionada à lista de doenças de notificação compulsória. Fica perceptível, que há uma necessidade de um diagnóstico assertivo, que traz como objetivo mitigar os efeitos maléficos que essa patologia pode trazer ao organismo humano. Adicionalmente, em conjunto com a problemática do diagnóstico tardio, a ineficácia de alguns fármacos atualmente utilizados para o tratamento da patologia, a exemplo do itraconazol, são fatores que tem contribuído para a existência de quadros clínicos severos e de difícil resolução clínica.

Recentemente, Bonilla e colaboradores (2021) descobriram que as acilidrazonas (AH) têm como alvo o transporte vesicular e a progressão do ciclo celular fúngico, e impactam indiretamente a síntese de glicosilceramida (GlcCer), e que constituem novas alternativas a serem exploradas. Em seu estudo verificaram a atividade fungicida contra *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, principais agentes causadores da esporotricose. As moléculas do presente estudo são derivadas de halogenadas e nitrotiossemicarbazonas substituídas (série DT) e fenoxi-hidrazona-tiazóis halogenados (série ET) (Fig. 1), o que apresenta semelhança estrutural com os compostos estudados no já citado trabalho de Bonilla e outros (2021).

As tiosemicarbazonas possuem atividades anticancerígenas, antimicrobianas

e antioxidantes quando se ligam a íons metálicos. Os metais são seletivos para suas células-alvo e afetam a forma como os ligantes se ligam às proteínas e enzimas. Suas características eletrônicas e estruturais, que também proporcionam uma diversidade de átomos doadores e um alto nível de deslocalização eletrônica, promovem uma variedade de modos de ligação para biomoléculas e estão relacionadas à sua atividade. De acordo com Singh et al. (2023) a presença de um íon metálico aumenta significativamente a atividade do ligante na grande maioria dos casos.

Diante desse contexto, o presente estudo tem como objetivo a avaliação *in vitro* de novos compostos bioativos frente a isolados clínicos de *Sporothrix*, visando esclarecer a importância do estudo de novos aspectos terapêuticos para tratamento dos pacientes acometidos pela esporotricose.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial antifúngico dos derivados das fenoxi-tiossemicarbazonas fenoxi -tiazóis halogenados frente à *Sporothrix* spp.

2.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar os isolados clínicos estocados da coleção do LPDDT/UFPE;
- Identificar genotipicamente os táxons da coleção que não apresentam confirmação genômica;
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas de AMB e ITZ com os antifúngicos utilizados atualmente no tratamento de esporotricose;
- Realizar os testes de susceptibilidade com os compostos derivados das fenoxi-tiossemicarbazonas e fenoxi-hidrazona-tiazóis.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESPOROTRICOSE

3.1.1 Histórico

O primeiro caso clínico de esporotricose, foi publicado em 1898 por Benjamin Schenck (SCHENK,1898). A segunda descrição desta micose foi realizada por Hektoen e Perkins em 1900, na qual, os autores, pela primeira vez, classificaram o agente etiológico como *Sporothrix schenckii* (ROSSATO, 2017). Posteriormente, Lutz e Splendore, 1907, registraram o primeiro caso de infecção natural por *S. schenckii* em animais e também demonstraram que era possível cultivar a levedura *in vitro* (LUTZ & SPLENDORE, 1907; ROSSATO, 2017).

Os autores Pijper e Pullinger em 1927 registraram um surto no qual 14 mineradores foram acometidos em Witwater, cidade próxima à capital Johannesburgo, África do Sul, que seguidamente, entre 1941 e 1944, também ocorreu o maior surto epidêmico de esporotricose pulmonar documentado, envolvendo aproximadamente 3.000 mineradores (ROSSATO, 2017). Foi constatado que o reservatório para o

crescimento saprofítico do fungo passava-se nas madeiras as quais sustentavam a mina (KWON-CHUNG & Bennett, 1992; ROSSATO, 2017).

O gênero *Sporothrix* inclui fungos cosmopolitas que abrange não apenas sapróbios comuns do solo, mas também parasitas humanos, de insetos e de plantas. O termodimorfismo apresentado pelos fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, foi demonstrado apenas em 1961, por Howard (HOWARD, 1961; ROSSATO, 2017). Em razão disto, o fungo apresenta-se na forma filamentosa no ambiente e nos cultivos *in vitro* sob temperatura de 25°C; passando para a fase leveduriforme *in vivo* e *in vitro* a 37°C (LACAZ, 1998; ROSSATO, 2017).

Este gênero anamórfico (forma assexuada), possui características morfológicas e fisiológicas idênticas ao ascomiceto *Ophiostoma* sp., (anteriormente *Ceratocystis* sp., e ambos os gêneros estão amplamente distribuídos na natureza (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011).

Subsequentemente, análises filogenéticas, feitas com materiais sólidos oriundos de diversas regiões do mundo, evidenciaram variações na sequência de nucleotídeos de três genes: β -tubulina, quitina-sintase e calmodulina. As referidas pesquisas detectaram o gene da calmodulina como um marcador eficaz para a identificação de novas espécies, resultando no estabelecimento do complexo *Sporothrix*. Ademais, outros métodos fenotípicos, tais como características macro e microscópicas (presença de conídios sésseis pigmentados e diâmetro das colônias), testes de assimilação rafinose e sacarose, como também a capacidade de crescer a 37°C podem ser utilizados na identificação (GUARO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; ROSSATO, 2017).

Os estudos supracitados além de identificarem novas espécies, também possibilitam reuni-las de acordo com sua distribuição geográfica (MARIMON *et al.*, 2006; ROSSATO, 2017). O clado clínico é composto pelas seguintes espécies: *Sporothrix brasiliensis*, principal causador da epidemia zoonótica no Rio de Janeiro, Brasil; *S. schenckii* stricto sensu, isolado principalmente nos Estados Unidos e na América do Sul; *S. globosa*, de distribuição mundial; *S. albicans*, relacionado à Europa, e *S. luriei*, considerada rara, com poucos relatos de infecção em humanos (MARIMON *et al.*, 2006; ROSSATO, 2017).

Análises filogenéticas de DNAr e β -tubulina indicam que *S. albicans*, *S. pallida* e *S. nivea*, devido a similaridade, deveriam ser classificados como uma espécie

única, *S. Pallida* (DE MEYER *et al.*, 2008). Tornou-se claro que as novas espécies do complexo *Sporothrix* relatadas – *S. albicans*, *S. luriei*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii stricto sensu* - possuem características fenotípicas e genotípicas diferentes e são de interesse clínico (MARIMON *et al.*, 2006; MARIMON *et al.*, 2007; ROSSATO, 2017).

3.1.2 Epidemiologia

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix* sp., e possui prevalência nas áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo (CHAKRABARTI *et al.*, 2014). Pacientes geralmente são acometidos pela infecção por meio de uma inoculação traumática na qual conídios do fungo são inseridos no hospedeiro (MAHAJAN, 2014).

Embora grupos etários e/ou sexos específicos possam ter alta susceptibilidade à esporotricose, esta micose pode afetar qualquer pessoa, independente da idade ou sexo, pois a infecção está relacionada com a o modo de exposição ao fungo. Determinadas profissões e hábitos recreativos podem aumentar o risco de infecção. No Uruguai, por exemplo, a esporotricose tem maior prevalência entre homens e pessoas que realizam caça de tatu (RODRIGUES *et al.*, 2014) as quais são infectados por arranhões recebidos durante a captura. No nordeste da Índia e no Japão, há maior prevalência em mulheres devido ao seu maior envolvimento em atividades agrícolas (HADDAD, *et al.*, 2002). A esporotricose no Brasil tem dois padrões de transmissão: A zoonótica (por meio de gatos e cães infectados), como também, a ambiental (por meio de plantas, solo ou matéria orgânica que contém o patógeno). As mulheres idosas que se dedicam a atividades domésticas são frequentemente infectadas devido à sua exposição ao patógeno enquanto cuidam de animais infectados em casa (BARROS, *et al.*, 2008). Na África do Sul, por outro lado, o número de homens supera o de mulheres em uma proporção de 3:1 porque os homens envolvem-se com mais frequência em atividades ao ar livre e de mineração (VISMER, *et al.*, 1997). Nos Andes peruanos, as crianças têm três vezes mais incidência em comparação com adultos. Estudos de caso indicam que brincar em campos agrícolas e em pisos sujos em casas são os possíveis modos de exposição dessas crianças (NEYRA *et al.*, 2005).

A esporotricose tem sido frequentemente relatada na África do Sul desde que o primeiro caso foi descrito em 1914 (PIJPER *et al.*, 1927; VISMER *et al.*, 1997;). O país oferece condições adequadas para a disseminação de *S. schenckii* sensu lato , e a doença foi relatada na província de Gauteng, incluindo Pretória, províncias de Botswana, Mpumalanga e Noroeste, especialmente entre os trabalhadores das minas de ouro (VISMER *et al.*, 1997; QUINTAL *et al.*, 2000). Um pequeno surto entre trabalhadores que manuseavam tijolos na região de Pretória foi descrito de 1959 a 1961 (FINDLAY, 1970). Depois daqueles relatados na África do Sul, vários casos foram notificados de Zimbábue (ROSS, 1978), com casos ocasionais da Nigéria (JACYK *et al.*, 1991) e Sudão também (GUMMA, 1978}). Contudo, a distribuição da esporotricose na África não foi claramente mapeada porque existem poucos laboratórios de micologia neste país.

3.1.2.1 *Sporothrix brasiliensis*

A infecção clássica está associada à inoculação subcutânea traumática de solo, plantas ou matéria orgânica contaminada com fungo, com casos raros de transmissão ocorrendo a partir de animais infectados. No entanto, nos últimos anos no Brasil, a esporotricose está ocorrendo em grande parte por meio da transmissão de gatos infectados para humanos pela espécie *S. brasiliensis* (XAVIER, 2023)

Infecções por *S. brasiliensis* foram identificadas na Argentina e no Paraguai, os quais foram os primeiros relatos desta espécie fora do Brasil (FILHO, 2020). Esses relatos recentes de esporotricose associada ao *S. brasiliensis* em locais com poucos ou nenhum caso relatado antes do início dos anos 2000 levantam a questão de saber se o surto se espalhou recentemente a partir do Rio de Janeiro ou se os casos de esporotricose zoonótica não foram reconhecidos. Esta questão é crucial para estabelecer políticas de saúde pública para lidar com a esporotricose emergente (FILHO, 2020).

Pesquisas anteriores de genética populacional revelam que *S. brasiliensis* é amplamente clonal, com fortes padrões biogeográficos de distribuição (FILHO, 2020). Recentemente estudos tem demonstrado que os surtos zoonóticos no Brasil são causados por *S. brasiliensis*, que tem sido reconhecido como o agente etiológico prevalente da esporotricose humana no país. É mais termotolerante que as demais espécies do gênero (GÓMEZ-GAVIRA, 2023).

Almeida-Paes e colaboradores constataram que *S. brasiliensis* é responsável por algumas manifestações clínicas incomuns da esporotricose, como infecção disseminada em pacientes imunocompetentes e reações de hipersensibilidade. Além disso, o tratamento com itraconazol parece ser extremamente eficaz na maioria dos casos de infecção por *S. brasiliensis*.

3.1.2.2 *Sporothrix mexicana*

A virulência é baixa ou ausente em cepas de *S. mexicana*, evidenciando a importância de diferenciação das espécies envolvidas em quadros clínicos (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; ABREU, 2017).

Em um estudo, Dias *et al* (2011), relataram um caso de esporotricose humana em que a espécie *Sporothrix mexicana* foi isolada de um paciente em Portugal. Um homem de 34 anos procurou atendimento numa clínica de podologia em Vila Nova de Famalicão, Portugal, em 2009, devido a múltiplas erupções polimorfas e úlceras em ambos os pés. Não havia uma causa clara para a doença. Embora o paciente tivesse viajado para a Malásia em 2003 e tivesse usado calçado aberto todos os dias, não se recordava de ter recebido uma ferida cutânea. Em 2004, em Portugal, surgiram nódulos subcutâneos em ambos os pés, que ulceraram e sararam espontaneamente. Em 2005, surgiram mais lesões graves que se tornaram uma infecção crónica em ambos os pés e membros inferiores. Os sintomas foram erroneamente diagnosticados como eczema disidrótico e o tratamento com corticosteroides tópicos não teve êxito. Vários fragmentos de pele das lesões foram submetidos a avaliação micológica. Não foram encontrados fungos nas lâminas de hidróxido de potássio de todas as amostras. Foram observadas colônias de fungos filamentosos após 7 dias de cultura em ágar Sabouraud dextrose inclinado a 25°C. O fungo apresentava hifas hialinas septadas, com conídios hialinos compatíveis com *Sporothrix* spp. O isolado foi preservado na coleção de culturas fúngicas da Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Braga, Portugal). As características macroscópicas e a esporulação foram analisadas. O DNA genômico foi obtido da

fase leveduriforme de *S. mexicana* MUM 11.02, e o sequenciamento parcial do gene da calmodulina foi baseado na reação de PCR utilizando os primers CL1 e CL2A. O sequenciamento foi realizado na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Uma análise BLAST comparando a sequência do gene da calmodulina com as sequências AM398382, AM398393, AM117444, AM116899 e AM116908 no banco de dados GenBank confirmou a identidade deste isolado como *S. mexicana*. Testes de suscetibilidade in vitro com fluconazol, itraconazol e terbinafina foram realizados pelo método de microdiluição e revelaram CIMs de 128 µg/mL, 32 µg/mL e 0,5-1,0 µg/mL, respectivamente, o que corresponde aos achados de Marimon *et al.* para *S. mexicana*.

Uma pesquisa realizada por Bonifaz *et al* (2020) evidenciou outro caso clínico de esporotricose humana causada por *Sporothrix mexicana*. Um homem de 56 anos de idade apresentou-se para avaliação de uma dermatose localizada no membro inferior direito, na fossa poplíteia, na face anterior e posterior da perna e no calcanhar, constituída por placas verrucosas com escamas espessas, crostas de sangue e exsudado sero-hemático. O paciente começou 2 anos antes com uma lesão pápulo-nodular na fossa poplíteia que se tornou escamosa e progrediu para a perna e calcanhar. Os diagnósticos clínicos iniciais foram cromoblastomicose e tuberculose verrucosa cutânea. Estudos micológicos foram feitos por meio de exame direto, no qual foram observadas poucas leveduras. A cultura obteve uma colônia descrita macroscopicamente como uma colônia glabra sem pigmento e identificada microscopicamente como *Sporothrix* sp., a análise por meio da biologia molecular foi realizada por meio de dois genes de acesso (GenBank): ITS: MN166089 e calmodulina: MN167165 confirmou *Sporothrix mexicana*. A reação intradérmica à esporotricina foi positiva. A histopatologia revelou um processo granulomatoso misto com a presença de algumas células leveduriformes. O paciente foi tratado com itraconazol 400 mg por dia durante 8 meses, obtendo-se uma cura clínica e micológica.

Govender *et al* (2015) relataram um surto de esporotricose linfocutânea que foi investigado numa mina de ouro sul-africana em 2011. Os trabalhadores que ficavam numa seção reaberta da mina foram recrutados para um estudo transversal descritivo. Foram recolhidas amostras de participantes com lesões linfocutâneas ativas ou parcialmente cicatrizadas. As amostras ambientais foram recolhidas em níveis de minas subterrâneas. Os isolados de *Sporothrix* foram identificados por

sequenciamento da região espaçadora transcrita interna do gene ribossômico e do gene nuclear da calmodulina.

De 87 mineiros do sexo masculino, 81 (93%) foram entrevistados e examinados, dos quais 29 (36%) tinham lesões cutâneas; foram recolhidas amostras de 17 (59%). A esporotricose foi confirmada laboratorialmente em 10 pacientes e sete tinham lesões clinicamente compatíveis. Dos 42 mineiros, 11 (26%) estavam infectados pelo HIV. Não foram detectados casos de doença disseminada. Os isolados de 8 pacientes foram identificados como *Sporothrix schenckii* sensu stricto por sequenciamento do gene da calmodulina, enquanto os isolados ambientais foram identificados como *Sporothrix mexicana*.

Atualmente, de acordo com Rodrigues *et al* (2013) *S. brasiliensis* é epidêmica e geograficamente restrita ao Brasil. Em contraste, *S. mexicana* e *S. globosa* foram raramente relatadas ao longo das décadas. No trabalho feito pelos autores supracitados foi visto que as cepas estão presentes em coleções de cultura de casos clínicos desde 1955 e foram reidentificados seis isolados originalmente classificados como *S. schenckii* para *Sporothrix mexicana* (três isolados) e *Sporothrix globosa* (três isolados). Apesar de serem vistos como potenciais agentes patogênicos, não mostraram qualquer aumento de frequência como agentes etiológicos de infecções humanas.

3.1.3. Manifestações clínicas

Lopes-Bezerra; Schubach e Costa (2006) classificam de forma mais elaborada as manifestações clínicas da esporotricose humana, com base não somente na disposição das lesões causadas, como também no local da lesão. De acordo com tal classificação, as manifestações da esporotricose são: Cutânea, subdividida em linfocutânea, fixa e

disseminada ou múltipla; Mucosa, subdividida em ocular, nasal e outras; Extracutânea, subdividida em pulmonar, osteoarticular, meningeal e generalizada; residual, deixando sequelas; e formas especiais, que apresentam regressão e hipersensibilidade (VALERIANO, 2017).

A forma linfocutânea da esporotricose é a mais comum, correspondendo de 70 a 80% dos casos (MAHAJAN, 2021, SILVA 2022). A lesão começa no sítio da implantação do fungo no tecido subcutâneo, formando um nódulo ou pápula com base eritematosa, ulcerosa ou não (cancro esporotricótico), o qual pode ser imperceptível ao paciente. Com o início da primeira semana após a lesão inicial, uma cadeia ascendente de nódulos indolores, ulcerados ou não, seguindo a trajetória dos vasos linfáticos começa a se formar. Esta cadeia de nódulos, conhecida como linfangite ascendente, é considerada a imagem clássica da esporotricose e pode permanecer no paciente mesmo após a cicatrização da lesão inicial (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017, SILVA 2022).

A forma cutânea fixa ocorre em menor frequência e é definida por lesões localizadas no sítio de inoculação. Representa cerca de 20% dos casos de esporotricose. Acometimento facial ocorre mais frequentemente na esporotricose cutânea fixa que na linfocutânea, porém em certas regiões da Índia, parece prevalecer em membros (RAMESH *et al.*, 2011; MAHAJAN *et al.*, 2014, SILVA, 2018). As lesões são assintomáticas, eritematosas e apresentam-se sob forma de lesões papulosas, papulopustulosas, nódulos ou placas verrucosas e ocasionalmente como úlceras que não cicatrizam ou pequenos abscessos. Lesões satélites podem ser observadas. As lesões podem se assemelhar a ceratoacantomas, celulite facial, pioderma gangrenoso, prurigo nodular, lúpus vulgar, sarcoma de partes moles, carcinomas basocelulares, erisipelóide ou rosácea (MAHAJAN *et al.*, 2014, SILVA 2018). Esta forma clínica ocorre frequentemente em hospedeiros com alta resistência em que lesões mínimas podem envolver espontaneamente ou persistir se não for introduzido tratamento. Tende a responder melhor a intervenções farmacológicas. (RATHI *et al.*, 2003, MAHAJAN *et al.*, 2014, SILVA, 2018).

Na forma cutânea disseminada há formação de lesões subcutâneas que, posteriormente, podem resultar em ulcerações fagedênicas, lesões acneiformes, placas enrijecidas ou crostas, no estágio final da AIDS (RAMOS-ESILVA *et al.*, 2007; VALERIANO, 2017). Além do acometimento cutâneo, a forma disseminada da esporotricose pode levar a quadros como febre, dor, mal-estar e perda de peso

(ROMERO-CABELLO et al., 2011, VALERIANO, 2017), ocorrendo em alguns casos envolvimento visceral, afetando estruturas mucosas como olhos e boca (ROMERO-CABELLO et al., 2011; SILVA-VERGARA et al., 2012, VALERIANO, 2017); meninges e pulmão, podendo levar o indivíduo a óbito (RAMOS-E-SILVA et al., 2007); e ossos e articulações (principalmente joelhos), e em casos raros, osteomielite (LEDERER; SULIVAN E CRUM-CIANFLONE, 2016, VALERIANO 2017).

A forma extracutânea e a cutânea disseminada estão geralmente associadas a algum tipo de imunossupressão do indivíduo, sendo consideradas um sinal clínico de pacientes que apresentam taxas muito baixas de linfócitos CD4, como os HIV positivos (CHANG, et al., 2013, VALERIANO, 2017), como nos casos relatados por Gutierrez-Galhardo et al. (2008), em que dois pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida apresentaram esporotricose disseminada como resposta a um quadro que se manifesta após tratamento antiretroviral altamente ativo chamado de síndrome da reconstituição inflamatória imune.

3.1.5. Diagnóstico

A suspeita clínica é primordial para o diagnóstico precoce da esporotricose humana. Porém, para confirmar o diagnóstico, é necessária a realização de exames laboratoriais (MAHAJAN, 2021, SILVA, 2022). O isolamento do agente etiológico requer a coleta de distintas amostras biológicas, de acordo com a forma clínica manifestada. Como exemplo, pode-se citar, biópsia do tecido afetado e fluidos corporais, como pus, punção ganglionar, escarro e líquido sinovial (MAHAJAN, 2014; SILVA 2022).

3.1.5.1. Clínico

Na esporotricose humana a análise das características clínicas é necessária em qualquer manifestação da doença (linfocutânea, cutânea fixa, cutânea disseminada ou extracutânea). A manifestação das distintas formas clínicas da esporotricose estão associadas principalmente às condições imunológicas do indivíduo, assim como à sensibilização deste ao agente etiológico em áreas endêmicas, como no caso da forma cutânea fixa (ZANCOPÉ, 2015, VALERIANO, 2017). Em vista disso, é fundamental que o profissional de saúde tenha o histórico clínico do indivíduo que apresente lesões típicas da esporotricose, bem como seu perfil socioeconômico, o que poderá facilitar o diagnóstico da doença. A observação dessas medidas também é interessante no que diz respeito aos diagnósticos diferenciais da esporotricose, como é o caso da leishmaniose, paracoccidioidomicose, cromoblastomicose, blastomicose, tuberculose, sífilis primária, tularemia e micobacterioses (RAMOS-E-SILVA, 2007, VALERIANO, 2017).

3.1.5.2 Laboratorial

O isolamento em cultura de cepas para o complexo *S. schenckii* em meio artificial é o padrão-ouro para definir o diagnóstico de esporotricose). O isolado clínico de *Sporothrix* pode crescer a partir de fragmento de biópsia de pele ou outras amostras (escarro, pus, líquido sinovial, material de drenagem óssea e líquido cefalorraquidiano) no meio Ágar Sabouraud dextrose (SDA) ou Mycosel a 25º C e o crescimento em fase filamentosa é visível após 3-5 dias a 2 semanas do cultivo. Em 89% dos casos, o isolamento das cepas de *sporothrix* ocorre em 8 dias (PAPPAS et al., 2000, SILVA ,2018). A conversão para a fase de levedura é possível para identificar cepas do complexo *S. schenckii*, a formação dos conídios é característica na fase filamentosa (KAUFFMAN et al., 2007, SILVA 2018). Incubação de culturas a 37ºC no ágar sangue cisteína-glicose ou infusão coração-cérebro pode produzir formas leveduriforme.

As colônias cultivadas crescem inicialmente com cor creme em ASD a 25°C, têm superfície suave e úmida, mas tornam-se marrom-enegrecidas após algumas semanas devido à produção de melanina, que o protege da fagocitose e da morte por monócitos e macrófagos humanos e proteinases extracelulares (MORRIS-JONES et al., 2002; MAHAJAN et al., 2014, SILVA, 2018).

Microscopicamente, *Sporothrix* spp. apresentam hifas septadas de ramificações delicadas com conidióforos com extremidades afiladas que suportam conídios piriformes em arranjo de “flor”, ou como conídios individuais de parede grossa castanha escura anexadas diretamente à hifa, muitas vezes em padrão denso, em forma de “manga de camisa”. Na prática, *Sporothrix* sp. é geralmente identificado pela morfologia da colônia, aparência microscópica e dimorfismo de temperatura (capacidade de existir como filamento filamentoso a 25° C e como levedura a 37 °C) (MORRIS-JONES et al., 2002; KAUFMANN et al., 1999). A análise morfológica do microcultivo não é capaz de distinguir as diferentes espécies do complexo *Sporothrix*. (RODRIGUES et al., 2015).

3.1.5.3 Molecular

A ferramenta molecular é importante no diagnóstico rápido da esporotricose e também em casos de não isolamento em cultura em razão da baixa carga fúngica ou devido a infecções secundárias (BARROS, PAES E SCHUBACH, 2011, VALERIANO, 2017). Além disso, estudos recentes têm sugerido que a sensibilidade antifúngica e a virulência, bem como os mecanismos de lesão, diferem entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (OLIVEIRA, 2014).

Um dos estudos pioneiros no desenvolvimento do diagnóstico molecular de infecções fúngicas foi realizado em 1995 por Sandhu e colaboradores, no qual foram desenvolvidas 21 sondas de ácidos nucleicos específicas, as quais tinham como alvo a maior subunidade de genes rRNA de diversos fungos patógenos. Hu et al. (2003) desenvolveram um protocolo de uma Nested PCR para detecção de *Sporothrix schenckii* usando a sequência do gene 18S do rRNA como alvo. Os resultados mostraram que a PCR pôde detectar o total de DNA de uma Unidade Formadora de Colônia (UFC) de *S. schenckii* diretamente de amostras de tecidos. O estudo demonstrou altas sensibilidade e especificidade, comprovando a eficácia desse método no diagnóstico da esporotricose.

Usando como marcador a região ITS do rRNA, Zhou et al. (2012) identificaram 124 isolados (68 clínicos e 54 ambientais) identificados morfológicamente como *Sporothrix* e *Ophiostoma*. Ao final do estudo, os autores concluíram que ITS é suficiente para distinção de espécies de *Sporothrix* clinicamente relevantes. Após os estudos de Marimon et. al. (2006, 2007, 2008), a partir dos quais novas espécies patogênicas do gênero *Sporothrix* foram estabelecidas, diversos estudos objetivando a identificação molecular do agente da esporotricose se basearam no sequenciamento do gene CAL (CAMACHO, 2015; DIAS, 2011; OLIVEIRA, 2010, 2013b, 2014, 2015). Rodrigues, de Hoog e Camargo (2015) desenvolveram um painel de novos marcadores, baseado na sequência do gene CAL, que permite a identificação de espécies do Complexo, e de seu teleomorfo, *Ophiostoma*. Nesse estudo foi desenvolvido um modelo animal de esporotricose disseminada com o objetivo de otimizar a PCR para detecção de espécimes clínicos de *Sporothrix* onde, a partir dos tecidos desses animais, foram detectados DNA de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* (VALERIANO, 2017)

3.1.6. Tratamento

O tratamento para a esporotricose inclui o uso de medicamentos, bem como terapia não-medicamentosa.

Intervenções terapêuticas são necessárias para o alcance da cura pois a remissão espontânea tem baixa frequência. A severidade da doença, bem como o estado imunológico do paciente, são fatores determinantes na escolha do tratamento. Fatores relacionados ao medicamento, como o preço, a via de administração e a extensão da janela terapêutica, também são levados em consideração para essa escolha (KAUFFMAN *et al.*, 2007; MAHAJAN, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2020, SILVA, 2022).

Intervenções não farmacológicas, como termoterapia e cirurgias, são utilizadas como adjuvantes à terapia medicamentosa (VALERIANO *et al.*, 2020). A aplicação de compressas mornas é capaz de inibir o crescimento de *Sporothrix* sp. e melhorar a resposta inflamatória no hospedeiro. Essas devem ser utilizadas com temperatura entre 42 °C e 43 °C, duas a três vezes por dia, por cerca de 30 minutos, nas lesões cutâneas (REISS; SHADOMY, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2020;

MAHAJAN, 2021). A intervenção cirúrgica, por sua vez, é útil no acometimento pulmonar, e mais raramente, osteoarticular (KAUFFMAN *et al.*, 2007; MAHAJAN, 2014).

Quanto ao tratamento farmacológico, o itraconazol é o medicamento de primeira escolha para diferentes manifestações clínicas. Iodeto de potássio e terbinafina são considerados tratamentos alternativos para as formas cutâneas quando o itraconazol não pode ser utilizado. As formas severas da esporotricose frequentemente necessitam de tratamento invasivo com a administração de anfotericina B (KAUFFMAN *et al.*, 2007; MAHAJAN, 2021).

A duração do tratamento pode variar de semanas a mais de um ano, dependendo da manifestação clínica da doença. É indicado que o tratamento permaneça por pelo menos quatro semanas após a remissão dos sintomas. A cura é atingida quando há a resolução da infecção ativa juntamente com a ausência de *Sporothrix* sp. nos tecidos afetados (KAUFFMAN *et al.*, 2007; MAHAJAN, 2014).

3.1.6.1. Itraconazol

Itraconazol é considerada o fármaco de primeira escolha no tratamento da esporotricose, principalmente, em sua forma linfocutânea (KAUFFMAN; HAJJEH E CHAPMAN, 2000, VALERIANO, 2017). Os azólicos, em geral, inibem o sistema enzimático do citocromo P450 e a administração conjunta de drogas metabolizadas por essas enzimas (digoxina, fenitoína, warfarim, carbamazepina, fenobarbital, rifampicina, cisaprida, astemizol, triazolam, midazolam, sinvastatina, antagonistas H-2, agentes hipoglicemiantes orais) está contra-indicada devido a toxicidade potencialmente grave. Os azólicos são também contra-indicados na gestação e em casos de hipersensibilidade aos azólicos. (MAHAJAN *et al.*, 2014, SILVA, 2018).

O itraconazol é também utilizado para as formas cutâneas, fixa ou linfática, osteoarticular (CARNERO *et al.*, 2018, SILVA, 2023), ocular (FURTADO *et al.*, 2019) e formas disseminadas menos severas (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). A dose usual é de 100 mg a 200 mg diárias, podendo chegar a 400 mg em casos mais graves. A terapia pode ser administrada de forma contínua ou intermitente (pulsoterapia), atingindo de 90% a 100% de eficácia (KAUFMANN *et al.*, 2007; MAHAJAN, 2014, SILVA, 2023).

3.1.6.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico lipofílico sintetizado a partir do *Streptomyces nodosus*, e está disponível em apresentação intravenosa. Este fármaco se liga ao ergosterol e a outros esteróis da membrana citoplasmática fúngica causando aumento da permeabilidade da membrana dos fungos para íons monovalentes (sódio e potássio) e outras moléculas levando à morte celular; contudo a principal atividade fungicida deve-se à sua capacidade de provocar auto-oxidação da membrana citoplasmática e liberação de radicais livre letais (MAHAJAN *et al.*, 2014, SILVA, 2018).

É uma droga segura na gravidez, sendo também escolha para tratamento de pacientes severamente comprometidos, como os casos de esporotricose cutânea disseminada, pulmonar, meníngea ou em pacientes imunodeprimidos. Também pode ser indicado para esporotricose osteoarticular extensa ou que estejam não responsivos ao itraconazol (KAUFFMAN *et al.*, 2007, SILVA 2018).

A dose diária usual é de 0,7 a 1 mg/kg para a forma desoxicolato e 2 a 3 mg/kg para as formas lipídicas. É recomendado que a anfotericina B seja administrada até que haja melhora clínica, e, após isso, o tratamento seja continuado com itraconazol. Essa sugestão é baseada nos índices de cardiotoxicidade e nefrotoxicidade apresentados por essa droga (KAUFFMAN *et al.*, 2007; MAHAJAN, 2014; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

3.1.6.3 Outros antifúngicos

O iodeto de potássio continua sendo amplamente utilizado no tratamento da forma linfocutânea, devido sua alta eficiência, baixo custo, fácil administração e poucos efeitos colaterais (BONIFAZ E VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, 2013; VALERIANO 2017).

Terbinafina é uma alternativa para tratamento da esporotricose cutânea fixa e linfocutânea para os casos não responsivos ao itraconazol ou quando o itraconazol é não tolerado ou contra-indicado. É bem absorvida por via oral e tem baixa ligação ao citocromo enzimático microssomal P450 (cerca de 5% de sua capacidade total), não interferindo na biodisponibilidade de outras drogas metabolizadas por esta via

(FRANCESCONI et al., 2009; SILVA, 2018). É altamente lipofílica e sua atividade antifúngica é mantida por algumas semanas após a interrupção do tratamento pelo depósito no tecido adiposo da droga. Seu efeito fungicida decorre de sua atuação inibitória sobre a enzima esqualeno epoxidase que resulta na inibição da síntese de ergosterol (MAHAJAN et al., 2014; SILVA 2018).

O uso do posaconazol e do ravuconazol em pacientes com esporotricose ainda é pouco estudado. Posaconazol mostrou boa atividade contra as cinco espécies do complexo *Sporothrix* sp., enquanto a atividade do ravuconazol é limitada apenas a estudos *in vitro* contra o *S. brasiliensis*. Equinocandinas não têm mostrado atividade contra o *S. schenckii*, e o voriconazol não está recomendado para o tratamento da esporotricose devido à sua limitada atividade *in vitro* contra *Sporothrix* spp. (KAUFFMAN et al., 2007; MARIMON et al., 2008; PAPPAS et al., 2011).

3.2 HÍBRIDOS MOLECULARES

A hibridização molecular é um método utilizado na química medicinal que consiste na ligação de dois grupos farmacofóricos distintos para obtenção de uma única molécula que consiga superar a eficácia destes isoladamente. Essa é uma das principais estratégias que a química medicinal recorre em busca da descoberta de

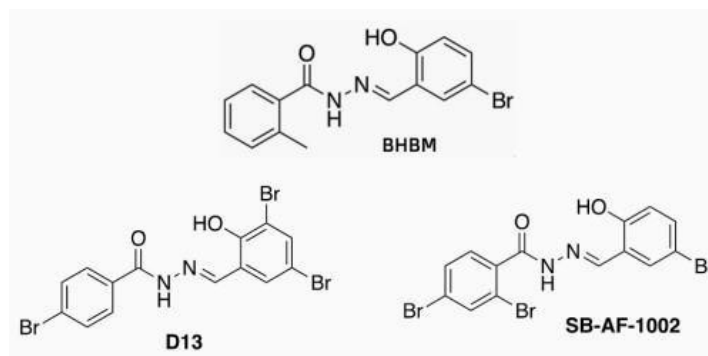
novos fármacos para serem utilizados como alternativa terapêutica aos já existentes na prática clínica (KUMAR; HERRMANN; TSOGOEVA, 2020; SILVA, 2022).

3.2.1 Derivados de fenoxi-hidrazona-tiazóis

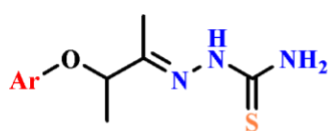
Derivados de tiazol contendo átomos de nitrogênio e enxofre tem grande importância devido a suas atividades farmacológicas. O sistema de anel aminotiazol é um elemento estrutural útil na química medicinal e possui amplas aplicações no desenvolvimento de medicamentos como antialérgicos anti-hipertensivos anti-inflamatórios antibacterianos, anti-hipertensivos e agentes anti-HIV (SINGH, 2023). Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de descobrir os valores terapêuticos dos derivados do tiazol, que estão entre os heterociclos mais frequentemente encontrados em compostos de interesse biológico, juntamente com muitas outras aplicações.

Recentemente, dois estudos envolvendo derivados de hidrazonas evidenciaram sua atividade anti-*Sporothrix* spp. Artunduaga Bonilla e colaboradores (2021) encontraram valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 0.12 e 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a cepas padrão de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* no teste de microdiluição em caldo, além de verificarem que a família das acilhidrazonas (AH) (Figura 1), Essas impactam o transporte vesicular e a progressão do ciclo celular de fungos e impactam indiretamente na síntese de glicosilceramida (GlcCer), e que constituem novas alternativas a serem exploradas. Em seu estudo, os autores verificaram a atividade fungicida contra *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, os principais agentes causadores da esporotricose. De Souza e colaboradores (2022), por outro lado, realizaram experimentos com seis isolados clínicos de *S. brasiliensis* provenientes de felinos. Eles encontraram valores de CIM para os híbridos moleculares de hidrazonas inferiores ao do itraconazol para ambas as cepas.

Figura 1. Principais compostos bioativos da família das acilhidrazonas

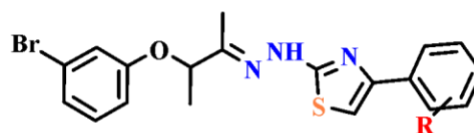


Fonte: Bonilla *et al* (2021)



Série DT

Composto	Ar
DT. 06	3-Br-Ph
DT. 20	3-Cl-Ph
DT. 24	4-NO ₂ -Ph
DT. 34	2-Cl-Ph
DT. 38	2,4-diCl-Ph
DT. 40	3-Cl, 4-F-Ph



Série ET

Composto	R
ET.04	4-F-Ph
ET.05	4-Cl-Ph
ET.07	2,4-Br-Ph
ET.09	4-NO ₂ -Ph

Figura 2: Derivados de fenoxi-hidrazona-tiazóis halogenados

4 METODOLOGIA

4.1. LOCAL DE ESTUDO

Os testes de susceptibilidade com os fármacos convencionais e a avaliação da atividade antifúngica dos derivados de fenoxi-tiossemicarbazonas e fenoxi-hidrazona-tiazóis, foram realizados no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Tropicais (LPDDT) do ambulatório do serviço de dermatologia do Hospital das Clínicas - HC\UFPE.

4.2. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Foram incorporadas na pesquisa nove cepas clínicas de *Sporothrix*, das quais 22,2% (n=2/9) foram obtidas da Coleção de Culturas URM do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e tinham identificação pré-estabelecida, e 77,7% (n=7/9) obtidos no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Tropicais do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE que foram identificados neste trabalho (**tabela 1**).

4.3 REATIVAÇÃO E VIABILIDADE DAS CEPAS

Para reativação, as culturas preservadas em óleo mineral (BUELL E WESTON, 1947) foram transferidas para Caldo Glicosado e mantidas à 28°C por três dias. Após crescimento observado por turvação, foram transferidas para meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura (SDA+YE) contidos em tubos de ensaio, e posteriormente mantidas à mesma temperatura. Para verificar a viabilidade dos isolados forneceu-se o método de cultura em lâmina (LACAZ et. al, 2002). Foram feitos repiques das colônias crescidas em SDA+YE, para meio Ágar Batata Dextrose (BDA) em tubos de ensaio, os quais foram mantidos à temperatura ambiente durante 8 dias. Foram consideradas viáveis as culturas que se apresentaram típicas de *Sporothrix* sp., tanto macro quanto micromorfológicamente. As estruturas morfológicas dos isolados foram observadas ao microscópio óptico, em aumento de 400x. As lâminas foram preparadas para observação corando-se um fragmento de colônia em lactofenol azul de algodão (azul de Aman).

4.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

A identificação genotípica foi realizada para sete isolados de *Sporothrix* que não apresentavam identificação em nível de espécie no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Micologia/CB/UFPE.

A extração de DNA foi realizada com o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Resumidamente, as colônias fúngicas foram transferidas para tubo de extração de DNA contendo pérolas de vidro e foi adicionado 300 µL da solução de lise nuclear, em seguida, os tubos foram agitados a 5.5m/s em FastPrep (BIO 101, Farmingdale, NewYork, USA) e incubados a 65° C por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 100 µL da solução de precipitação de proteína com posterior agitação e centrifugação a 14.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, que continha 400 µL de isopropanol. O novo tubo foi homogeneizado por inversão e submetido a centrifugação a 14.000 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e, adicionou-se 400 µL de etanol70% a temperatura ambiente e, novamente centrifugado. Após a centrifugação o tubo foi invertido para a completa eliminação do sobrenadante. O DNA extraído foi ressuspenso em 50µL de água Milli-Q autoclavada e refrigerado a 4 °C overnight. A quantificação de DNA foi realizada em Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

A amplificação da região genômica da calmodulina (CAL) foi realizada conforme descrito por Marimon (2007). As reações de PCR foram realizadas em volumes finais de 20µL utilizando os primers senso CL1 (5'GA (GA) T (AT) CAA GGA GGC CTTCTC-3') e antisenso CL2A (5'-TTT TTG CATCATGAGTTGGAC-3'). A PCR foi realizada em termociclador Veriti™ Termociclador de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) seguindo os parâmetros de ciclagem: desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 60° C por 45 segundos, e extensão a 72° C durante 1 minuto, com uma extensão final a 72° C por 10 minutos.

As sequências obtidas a partir do sequenciamento dos genes que codificam a CAL foram editadas no software BioEdit™, versão 7.2.6.1, e submetidas à pesquisa de sequências similares utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Análises filogenéticas foram realizadas utilizando nossas sequências e sequências de referência. As sequências foram alinhadas usando a interface online

MAFFT v.7 (disponível em <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server>) e editadas com software MEGA V.11 (disponível em <https://www.megasoftware.net/>). *Grosmannia sersens* (CBS 141.36) foi utilizada como grupo externo. A análise de Máxima Verossimilhança (ML) foi realizada usando o RAxML-HPG BlackBox v. 8.2.12 no CIPRES Science Portal (disponível em <https://www.phylo.org/portal2/login>) com 1000 réplicas de bootstrap e valores iguais ou superiores a 70% de suporte foram mostrados próximos aos nós. A árvore filogenética resultante foi visualizada usando o software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para edição. As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no banco de dados NCBI GenBank.

4.5 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados de *Sporothrix* spp. seguiu o protocolo M38-A3 (CLSI, 2017). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) esterilizado em membranas de 0,22mm (Millipore, Darmstadt, Alemanha), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio pH 7,0±0,1 tamponado com 3-[N-morfolino] propano-ácido sulfônico (MOPS; 0,165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich). Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B e itraconazol em concentrações variando de 0,03 a 16µg.mL⁻¹.

Os isolados de *Sporothrix* foram mantidos em meio BDA e incubados a 35°C durante 7 dias. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (0,85g/L), e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 80% a 82% da absorbância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo será posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2-5x10³ céls.mL⁻¹. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos e as placas incubadas a 35°C, durante 48h. Para leitura, foi considerado o poço onde não se observou nenhum crescimento discernível (inibição de 100%) do inóculo, como sendo o poço onde ocorreu a CIM.

Os valores de corte para isolados clínicos de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, pela metodologia do CLSI, são, respectivamente, anfotericina B, 4 e 4 µg/mL; itraconazol, 2 e 2 µg/mL.

A atividade antifúngica dos novos compostos seguiu as mesmas condições do teste de susceptibilidade (M38-A3), onde as concentrações avaliadas variaram de 2 a 1.024 µg.mL⁻¹. As placas foram incubadas a 35°C, durante 48h. Para leitura, foi considerado o poço onde não se observou nenhum crescimento discernível (inibição de 100%) do inóculo, como sendo o poço onde ocorreu a CIM.

4.6. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS MOLÉCULAS DA SÉRIE ET SOBRE CÉLULAS DE VERTEBRADOS – L929

Os compostos com atividade tripanocida prévia foram testados contra as células L929 para determinação da citotoxicidade (ROMANHA et al., 2010), uma vez que estas células foram utilizadas como hospedeiras nos ensaios com o *T. cruzi*. A viabilidade das células submetidas aos tratamentos foi determinada utilizando-se o indicador de viabilidade celular alamarBlue® (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram testadas em concentrações crescentes a partir da IC₅₀ encontrada sobre o parasita, utilizando o mesmo número de células, tempo de desenvolvimento celular e tempo de exposição aos compostos usados no ensaio da beta-galactosidase. Após a adição do alamarBlue®, a placa foi incubada por 6 h e a leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando-se dois comprimentos de onda. Os resultados foram expressos como a diferença percentual na redução entre células não tratadas e tratadas usando a equação recomendada pelo fabricante. Por meio de interpolação linear, o programa Excel foi utilizado para calcular a concentração que inibe a viabilidade das células em 50% (CC₅₀).

4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS MOLÉCULAS DA SÉRIE ET SOBRE CÉLULAS DE VERTEBRADOS – RAW 264.7

Os compostos com atividade leishmanicida foram testados contra as células RAW 264.7 para determinação da citotoxicidade, uma vez que estas células foram

utilizadas como hospedeiras nos ensaios com amastigotas de *Leishmania* spp. A citotoxicidade foi avaliada através de ensaios com MTT. Esse ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que deve ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância. Os macrófagos RAW 264.7 foram soltos das garrafas de cultura e foram plaqueados em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 0,78 a 100 µg/mL e incubados novamente por um período de 48h. Foram utilizados poços apenas com células e meio de cultura como controle negativo. Após a incubação foi acrescentado 25µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)

-2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. O meio de cultura juntamente com o MTT foi descartado e 100µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC50) foi determinada por análise de regressão não linear pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

4.8 TOXICIDADE DA CÉLULA HOSPEDEIRA DAS MOLÉCULAS DA SÉRIE DT

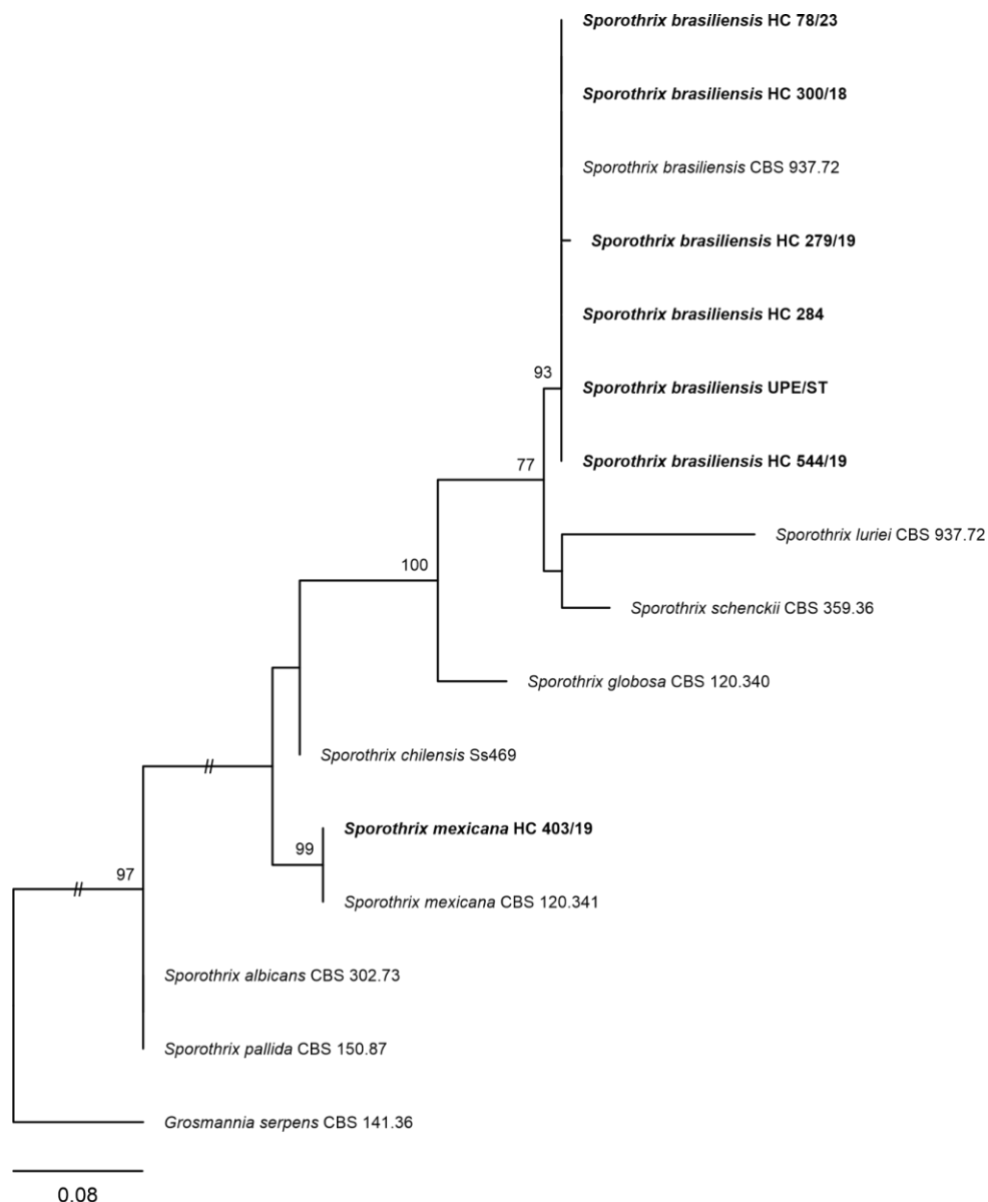
Esplenócitos de ratos BALB/c foram colocados em placas de 96 poços, a um número de células de 5×10⁶ células/poço em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS e 50µg/mL de gentamicina. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio RPMI-1640 em cinco concentrações diferentes (1,23, 3,70, 11,11, 33,33 e 100µg / mL) e adicionado às respectivas cavidades, em triplicata. A placa foi incubada durante 24h a 37 °C e CO₂ a 5%, contendo 1,0µCi de 3Htimidina (Perkin-Elmer, Waltham, MA). A placa foi, em seguida, transferidos para um contador de β-radiação (Multilabel Reader, Finlândia) e a porcentagem de 3H-timidina foi determinada. A concentração mais elevada não tóxica foi determinada para cada composto.

5 RESULTADOS

5.1. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

A Árvore de máxima verossimilhança foi obtida usando sequências de rDNA de calmodulina de espécies de *Sporothrix*. Seis espécies descritas no estudo foram *Sporothrix brasiliensis* e uma foi *S. mexicana*. Valores iguais ou superiores a 70% de suporte a bootstrap ML são mostrados próximos aos nós. A árvore foi enraizada em *Grosmannia sersens* CBS 141.36. A barra de escala na parte inferior representa o número esperado de substituições por local (**figura 3**).

Figura 3 - Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança com suporte de 1000 *bootstraps*.



5.2. SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Dez isolados de *Sporothrix* sp., desta pesquisa, apresentaram sensibilidade ao itraconazol, com variação da concentração inibitória mínima de 0,03 a 0,125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Uma cepa de *Sporothrix brasiliensis* (LPDDT 78/23), apresentou CIM maior que 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, demonstrando uma possível resistência. Em relação a anfotericina B, os isolados exibiram diferentes padrões de susceptibilidade, com CIMs variando entre 0,03 e 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. O isolado URM 2439 (*Sporothrix chilensis*), apresentou CIM de 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e segundo o *guideline*, a variação nas CIM para fungos filamentosos

não-dermatófitos está agrupado entre 0,5 e 2 µg/mL para anfotericina B, sendo, portanto, o isolado URM 2439 considerado resistente para esta droga (**tabela 1**).

Tabela 1- Códigos dos pacientes, identificações de *Sporothrix* por meio do sequenciamento CAL, acessos do GenBank e perfil de suscetibilidade antifúngica (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) frente a anfotericina B e itraconazol

ID do paciente	Cepas	GenBank CAL	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
			AMB	ITC
HC 78/23	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505842	0,125	>16
HC 284/21	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505838	0,25	0,125
HC 544/19	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505841	0,25	0,25
HC 403/19	<i>Sporothrix mexicana.</i>	PP537789	0,03	0,03
HC 279/19	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505840	0,125	0,125
HC 300/18	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505839	0,06	0,5
UPE/ST 01	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505843	0,125	0,06
URM 301	<i>Sporothrix mexicana</i>		1	0,5
URM 2439	<i>Sporothrix chilensis</i>		4	0,5
¥ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>		0,25	0,125

CIM - Concentração Inibitória Mínima

AMB.- Anfotericina B

ITC - Itraconazol

¥ ATCC- American Typical Culture Collection

Fonte: A autora (2023)

Tabela 2. Atividade antifúngica de 10 derivados halogenados de fenoxihidrazona-tiazol contra nove cepas de *Sporothrix* obtidas por microdiluição em caldo (os valores de CIM estão em $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

ID do paciente	Cepas	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)									
		ET 04	ET 05	ET 07	ET 09	DT 06	DT 20	DT24	DT34	DT 38	DT40
HC 78/23	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	128	256	32	128	512	512
HC 284/21	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	128	256	32	128	64	128
HC 544/19	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	64	64	128	256	128	256
HC 403/19	<i>S. mexicana</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	16	64	64	64	64	512
HC 279/19	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	128	32	64	64	128	512
HC 300/18	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	64	64	32	256	128	16
UPE/ST 01	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	128	256	64	64	>1024	64
URM 301	<i>S. mexicana</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	64	128	64	256	64	1024
URM 2439	<i>S. chilensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	16	128	128	128	32	128
¥ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	16	32	16	32	16	16

Fonte: A autora (2024)

Baseado no perfil de susceptibilidade descrito acima (**tabela 2**), e devido à ausência de classificação de padrões de susceptibilidade para novos derivados sintéticos, foi adotada a seguinte classificação: As moléculas testadas que

apresentaram CIMs variando de 128 a 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram consideradas com baixa atividade, e as que mostraram CIMs variando de 16 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram considerados com atividade intermediária, bem como as que exibiram CIMs variando de 2 a 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram consideradas com alta atividade. Ao todo, dez compostos foram utilizados no teste de susceptibilidade antifúngica.

Foram realizados também os cálculos das médias geométricas e menores médias foram obtidas em relação a DT 24 (59), seguida do DT06 (64), com base nisso, pode-se inferir que eles são os compostos com alta atividade. No entanto, avaliando a citotoxicidade destes, 31.6 μM e 88.5 μM respectivamente, pode-se estabelecer que doses do composto DT 06 maiores que 31.6 são tóxicas, nesse caso, apenas as cepas HC 403 e URM 2439 poderiam ter aplicabilidade. Já com relação ao DT24, a dose limite é 88.5 μM , portanto, mais cepas tem atividade, com exceção da HC 544 e a URM 2439.

5.3 CITOTOXICIDADE DOS HÍBRIDOS MOLECULARES

A citotoxicidade das moléculas da série DT foi determinada em esplenócitos de camundongos BALB/c (**tabela 3**) e os resultados foram expressos como a concentração mais elevada não tóxica em μM . Benznidazol e nifurtimox foram usados como medicamentos de referência. Os valores de CC_{50} , citotoxicidade sobre L929, da série ET estão expressos na **tabela 4**.

Tabela 3 - Citotoxicidade em célula hospedeira dos seis compostos da classe das tiossemicarbazonas (série DT)
--

Código	Radical	Toxicidade em células hospedeiras (µM)*
DT 06	3-BrPh	31.6
DT 20	3-ClPh	36.8
DT 24	4-NO ₂ Ph	88.5
DT 34	2-ClPh	36.8
DT 38	2,3-diClPh	34.5
DT 40	3-Cl-4-FPh	34.5
Nfx	-	3.4

*Viabilidade das células de esplenócitos de ratos Balb/c determinados 24 h após o tratamento, os resultados foram expressos como a concentração mais elevada não-tóxica. Bdz = benznidazol. Nfx = Nifurtimox.

Fonte: A autora (2024)

Tabela 4 - Citotoxicidade dos compostos de tiazol (série ET)

Código	Radical ¹	Radical ²	Citotoxicidade (CC ₅₀) µM L929
ET 04	4-F-Ph	H	177,4
ET 05	4-Cl-Ph	H	83,2
ET 07	2,4-Br-Ph	H	124,4
ET 09	4-NO ₂ -Ph	H	148,3
BZD	-	-	2.228,6

* Concentração do composto que inibe a viabilidade em 50% dos macrófagos L292

**Bdz= benznidazol

Fonte: A autora (2024)

6 DISCUSSÃO

6.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE FRENTE AOS FÁRMACOS COMERCIAIS

Foi observado um padrão de sensibilidade entre nove isolados clínicos de *S. brasiliensis*, e uma cepa de *S. mexicana* frente ao itraconazol, cuja concentração inibitória mínima mais elevada reportada foi de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Apesar de não existirem *breakpoints* clínicos determinados pelo CLSI para a *Sporothrix* sp. (CLSI, 2008), o *cutoff* epidemiológico foi estabelecido em algumas espécies para diferenciar cepas que possuem resistência adquirida (não-selvagens) frente aos antifúngicos comerciais das que não possuem (selvagens). O valor de *cutoff* epidemiológico do itraconazol para *S. brasiliensis* corresponde a $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto para anfotericina B esse número é igual a $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017). Baseado neste perfil, um isolado clínico de *S. brasiliensis* (LPDDT 323/22) demonstrou uma possível resistência adquirida, evidenciada pelo valor de CIM maior que $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O isolado de *S. chilensis* apresentou CIM de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para anfotericina B, porém, a pesquisa que estabelece os valores de *cutoff* epidemiológico não fornece estes dados para *S. chilensis* (ESPINEL-INGROFF, 2017). No entanto, diante do valor de CIM, demonstrado no presente estudo, a anfotericina B pode não ser o fármaco de melhor escolha para o tratamento da esporotricose causada por esta espécie. Valeriano e colaboradores (2020) obtiveram resultados semelhantes em estudo realizado com onze cepas distintas de *S. chilensis*, onde a CIM obtida para itraconazol e terbinafina apresentaram uma faixa de ECV correspondente a *S. brasiliensis* e *S. schenckii sensu strictu* o que sugeriu um potencial aplicável destes antifúngicos para terapia da esporotricose causada por esta espécie. Por outro lado, a anfotericina B demonstrou não ser a escolha mais adequada para a mesma terapia.

Cepas consideradas não-selvagens para determinado fármaco não são necessariamente classificadas desta forma para outros. Esse fato pode ser devido aos mecanismos de resistência apresentados para diferentes classes terapêuticas serem diferentes. A resistência ao itraconazol, por exemplo, está relacionada principalmente às enzimas CYP450 (WALLER *et al.* 2020, SILVA, 2023), enquanto a resistência à anfotericina B está relacionada a alterações na composição da

membrana plasmática (esteróis) e maior tolerabilidade ao estresse oxidativo. (CAROLUS *et al* 2020., SILVA, 2023).

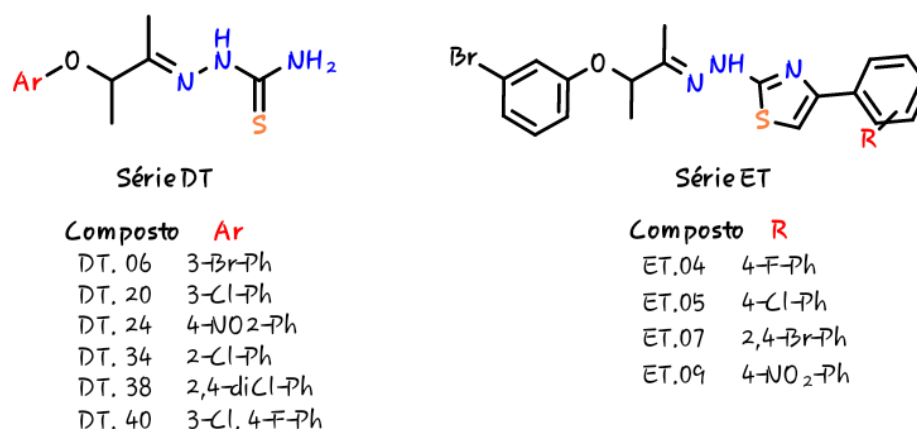
6.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE FRENTE AOS HÍBRIDOS MOLECULARES

A atividade antifúngica das hidrazonas vem sendo significativamente analisada por meio de testes *in vitro* no decurso desta década (SHARMA *et al.*,2020). Diferentemente dos derivados de tiazóis, as hidrazonas já foram reportadas como capazes de inibir o crescimento de *S. brasiliensis*, com CIM variando entre 0,25 a 16 µg.mL⁻¹ (ARTUNDUAGA BONILLA *et al*, 2021; DE SOUZA *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de derivados heterocíclicos progrediu consideravelmente nas últimas décadas e muitos novos agentes de origem sintética e natural foram produzidos. Entre os compostos heterocíclicos, o tiazol (**figura 4**) é um composto heterocíclico único de cinco membros caracterizado por átomos de nitrogênio e enxofre, que é amplamente utilizado como um importante esqueleto central em uma variedade de compostos farmacologicamente importantes devido às suas diversas atividades biológicas, como antibacteriana, antiviral e antifúngico (PETROU *et al.*, 2021). Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de descobrir os valores terapêuticos dos derivados tiazólicos, que estão entre os heterociclos mais frequentemente encontrados em compostos de interesse biológico, juntamente com muitas outras aplicações.

Os híbridos moleculares da série ET possuem o núcleo tiazol, e é classificado como uma estrutura privilegiada que é um bloco de construção molecular utilizado na concepção e síntese de medicamentos. Como estruturas potencialmente privilegiadas, os derivados do tiazol podem ser ainda mais extensivamente explorados para procurar novos medicamentos caracterizados por uma eficácia terapêutica melhorada e alvos biológicos semelhantes (PETROU 2021). Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de descobrir os valores terapêuticos dos derivados do tiazol, que estão entre os heterociclos mais frequentemente encontrados em compostos de interesse biológico, juntamente com muitas outras aplicações.

Figura 4 - Estruturas químicas e farmacomodulação das séries DT (tiosemicarbazonas) e ET (tiazóis).



Fonte: A autora (2024)

Todos os derivados moleculares da série DT apresentaram maior atividade contra os isolados clínicos de *Sporothrix* deste estudo, apresentando CIMs variando de 16µg.mL⁻¹ a 128 µg.mL⁻¹ frente ao menos um dos isolados clínicos. Pode-se destacar compostos DT06 (*S. chilensis* e *S. mexicana*) e DT40 (*S. brasiliensis*) que exibiram valores de CM de 1616µg.mL frente aos isolados DT06. Essas moléculas e outras da série DT pertencem à classe das tiosemicarbazonas (**figura 4**). As tiosemicarbazonas demonstraram uma variedade de possíveis atividades anticancerígenas, antimicrobianas e antioxidantes quando se ligam a íons metálicos. Os metais presentes na estrutura das tiosemicarbazonas são seletivos para suas células-alvo e sua coordenação afeta a forma como os ligantes se ligam às proteínas e enzimas. Suas características eletrônicas e estruturais, que também fornecem uma diversidade de átomos doadores para coordenação metálica e um alto nível de deslocalização eletrônica, facilitam uma variedade de modos de ligação para biomoléculas e estão relacionadas à sua atividade. O aparecimento de um íon metálico aumenta significativamente a atividade do ligante na grande maioria dos casos (SINGH *et al.*,2023).

Um estudo realizado por Lima-neto (2023) e colaboradores demonstrou a atividade de nove híbridos moleculares contendo tiosemicarbazonas e tiazolidinedionas frente espécies patogênicas de *Sporothrix* sp, na qual nove híbridos de 5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]pirazina foram testados frente a 30 isolados do complexo *Sporothrix schenckii*. Quatro compostos com baixa toxicidade apresentaram atividade antifúngica frente a 4 isolados clínicos de *Sporothrix* que

possuíam resistência adquirida (não-selvagens). Este dado corrobora com os achados do presente estudo em que os híbridos moleculares pertencentes à classe das tiossemicarbazonas, (série DT), apresentaram atividade frente às cepas com possível resistência adquirida (1 isolado clínico de *S. brasiliensis* - HC 78/23 e 1 de *sporothrix chilensis* - URM 2439).

6.3 CITOTOXIDADE DOS DERIVADOS MOLECULARES

No que diz respeito a citotoxicidade das células de esplenócitos de ratos Balb/c, os cinco híbridos moleculares da série DT, pertencentes à classe das tiossemicarbazonas, em especial, os compostos DT 06 E DT 40, os quais exibiram maior atividade anti-*sporothrix*, apresentaram a concentração mais elevada não-tóxica inferior ao do benznidazol que é o medicamento de referência utilizado neste estudo, demonstrando uma baixa toxicidade destes derivados moleculares.

Quanto à toxicidade frente às células RAW, é possível notar que a maioria dos compostos apresentou valor de CC₅₀ superior ao da Miltefosina. Apenas o composto ET-09, apresentou menor citotoxicidade frente às células RAW. No entanto, nenhum dos compostos da série ET demonstrou atividade frente aos isolados clínicos de *Sporothrix* da presente pesquisa.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos, demonstrou sensibilidade ao itraconazol e anfotericina B, com a ocorrência de 2 cepas não-selvagens (1 para cada antifúngico). Os derivados das tiossemicarbazonas testados foram capazes de inibir o crescimento de *S. brasiliensis*, *S. chilensis* e *S. mexicana* sendo o DT 06 e o DT 40 os que tiveram maior atividade.

Portanto, a esporotricose humana segue como uma micose endêmica e relevante no estado de Pernambuco, sobretudo devido a sua ocorrência como zoonose. Os derivados das tiossemicarbazonas são compostos promissores para incorporar o tratamento dessa doença, sendo necessários estudos futuros para melhor avaliar o seu potencial antifúngico, bem como reversão da resistência das cepas não-selvagens.

REFERÊNCIAS

- A. ESPINEL-INGROFF, D.P.B. ABREU, R. ALMEIDA-PAES, R.S.N. BRILHANTE, A. CHAKRABARTI, A. CHOWDHARY, *et al.* Multicenter, International study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrob Agents Chemother.**, 61 (2017), pp. e01057-e1117
- ALMEIDA-PAES R, de OLIVEIRA MM, Freitas DF, DO VALLE AC, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM, Gutierrez-Galhardo MC. 2014. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS Negl Trop Dis** 8:e3094. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003094>
- BARROS MB, SCHUBACH AO, do Valle AC *et al.* Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin Infect Dis**. 2004; 38: 529–535.
- BARROS MBL, ALMEIDA-PAES R, SCHUBACH AO (2011) *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clin Microbiol Rev** 24: 633-654.
- BARROS MB, SCHUBACH AO, SCHUBACH TM, WANKE B, LAMBERT PASSOS SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiol Infect** 2008; 136: 1192-1196. 45.
- BONIFAZ A, TIRADO SÁNCHEZ A. 2017. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. **J Fungi** 3:6. <https://doi.org/10.3390/jof3010006>
- BONIFAZ A, MORALES-PEÑA N, TIRADO-SÁNCHEZ A, *et al.* Atypical sporotrichosis related to *Sporothrix mexicana*. **Mycopathologia**. 2020 Aug;185(4):733-735. doi: 10.1007/s11046-020-00463-8.
- BORBA-SANTOS LP, RODRIGUES AM, GAGINI TB, *et al.* 2015. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Med Mycol** 53:178-188. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu056>
- BRANDOLT TM, MADRID MS, POESTER VR, SANCHOTENE KO, *et al.* Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012-2017. **Medical Mycology**, 2018, 0, 1-7 doi: 10.1093/mmy/myy082
- CAMACHO, Emma; LEÓN- NAVARRO, Isabel; RODRÍGUEZ-BRITO, Sabrina; MENDOZA, Mireya; NIÑO- VEGA, Gustavo A. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **BMC Infectious Diseases**, Caracas, v. 15, p. 01-10, fev. 2015.

CAROLUS, H.; PIERSON, S.; LAGROU, K.; VAN DIJCK, P. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CLSI. M38-A2. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 2ª Edição. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008, 52p.

DA ROCHA RFDB, SCHUBACH TMP, PEREIRA SA *et al.* 2018. Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide. **J Small Anim Pract** 59:720-721. <https://doi.org/10.1111/jsap.12852>.

Dias NM, Oliveira MM, Santos C, *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporothrix Mexicana*, Portugal. **Emerg Infect Dis**. 2011 Oct;17(10):1975-6. doi: 10.3201/eid1710.110737.

ESPINEL-INGROFF A, ABREU DPB, ALMEIDA-PAES R *et al.* Chowdhary A, *et al.* Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrob Agents Chemother**. 2017 Jul; 61:1-8.

EUDES FILHO, J., SANTOS, I. B. DOS, REIS, (2020). A novel *Sporothrix brasiliensis* genomic variant in Midwestern Brazil: evidence for an older and wider sporotrichosis epidemic. **Emerging Microbes & Infections**, 9(1), 2515-2525. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1847001>

GAGINI T, COLINA-VEGAS L, VILLARREAL W. **New Journal of Chemistry**, (2018), 13641-13650, 42(16).

GOVENDER NP, MAPHANGA TG, ZULU TG, *et al.* An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015 Sep 25;9(9):e0004096. doi: 10.1371/journal.pntd.0004096.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J.A.; MORA-MONTES, H.M. Current Progress in *Sporothrix brasiliensis* Basic Aspects. **J. Fungi** 2023, 9, 533. <https://doi.org/10.3390/jof9050533>

GREMIÃO IDF, MIRANDA LHM, REIS EG, RODRIGUES AM, PEREIRA SA. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: ccat to human transmission. **PLOS Pathogens**. 2017; 13: e1006077.

GREMIÃO IDF, MARTINS DA SILVA da ROCHA E, MONTENEGRO H. 29 September 2020. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Braz J Microbiol** <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00365-3>.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, v.12, n.3, p.454-500, 1999.

ISHIDA K, DE CASTRO RA, BORBA DOS SANTOS LP, QUINTELLA LP, *et al* 2015. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control

of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Med Mycol** 53:34-41.<https://doi.org/10.1093/mmy/myu050>.

CRUZ R, VIEILLE P, OSCHILEWSKI D (2012) Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfo-cutánea. **Rev Chilena Infectol** 29: 401-405

DIAS NM, LIVEIRA ME, SANTOS C *et al.* (2011) Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerg Infect Dis** 17: 1975-1976.

HADDAD VJ, MIOT HA, BARTOLI LD *et al.*, Localized lymphatic sporotrichosis after fish-induced injury (*Tilapia* sp.). **Med Mycol** 2002; 40: 425-427.

HAMILL RJ. 2013. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity *Drugs* 73:919-934.<https://doi.org/10.1007/s40265-013-0069-4>.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNET, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992.

LACAZ, C.S. Guia para identificação: fungos actinomicetos algas de interesse médico. São Paulo: **Sarvier**, 1998.

LIMA-NETO, NETA M, VALERIANO C *et al* Antifungal efficacy of imidazo[1,2-a]pyrazine-based thiosemicarbazones and thiazolidinediones against *Sporothrix* species. **Future Microbiol**, 2023;18:1225-33.

LOPES-BEZERRA LM LM, MORA-MONTES HM, ZHANG Y *et al.* Sporotrichosis between 1898 and 2017: the evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Med Mycol**. 2018; 56: S126-143.

LÓPEZ-ROMERO, E.; REYES-MONTES-Montes, R.M.; REYES-MONTES *et al.* *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiology**, v.6, n.1, p. 85-102, 2011.

LUTZ A, SPLENDORE A. About a mycosis observed in men and rats. **Rev Med Sao Paulo** ~ . 1907; 21: 433-450 [Sobre uma mycose observada em homens e ratos]

MARIMON R, GENE J, CANO J, TRILLES L, DOS SANTOS LAZERA M, GUARRO J. Molecular Phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol**. 44(9),3251-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.00081-06> PMID: 16954256

MARIMON R, CANO J, GENS J, SYTTON DA, KAWASAKI M, GYARRO J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J Clin Microbiol**. 2007; 45: 3198- 3206.

MARIMON R, GENE J, CANO J, GUARRO J (2008) *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Med Mycol** 46: 621-625.

NEYRA E, FONTEYNE PA, SWINNE D *et al.* Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **J Clin Microbiol** 2005; 43: 1348-1352.

OLIVEIRA MME, ALMEIDA-PAES R, MUNIZ MM, BARROS MBL, GUITIERREZ-GALHARDO MC, *et al.* (2010) Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathologia** 169: 359-363.

OLIVEIRA MME, ALMEIDA-PAES R, Muniz MM, GUTIERREZ-GALHARDO, MC, Zancoppe-Oliveira RM (2011) Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia** 172: 257-267.

OLIVEIRA, D. **Design Estrutural, Síntese e Determinação da Atividade Anti-Trypanosoma cruzi para uma Nova Série de Ariloxitiossemicarbazonas**. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 95. 2013.

OROFINO-COSTA R, RODRIGUES AM, DE MACEDO PM, Bernardes-Engemann AR. 2017. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, lab-oratory and clinical therapeutics. **An Bras Dermatol** 92:606-620.<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.2017279>

REIS EG, SCHUBACH TMP, PEREIRA SA, SILVA JN, CARVALHO BW, QUINTANA MSB, GREMIÃO IDF. 2016. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. **Med Mycol** 54:684-690.<https://doi.org/10.1093/mmy/myw027>.

RODRIGUES AM, de HOOG S, CAMARGO ZP (2013) Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Med Mycol** 51: 405-412.

RODRIGUES AM, BAGAGLI E, DE CAMARGO ZP, DE MORAES GIMENES BOSCO. *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in an armadillo's burrow. **Mycopathologia** 2014; 177: 199-206.

RODRIGUES AM, de HOOG S, de CAMARGO ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Med Mycol**. 2013 May;51(4):405-12. doi: 10.3109/13693786.2012.719648.

ROSSATO, L. ***Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência**. 2017. . Tese (Doutorado em Farmácia) - Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

PEREIRA SA, PASSOS SRL, SILVA JN, GREMIÃO IDF, FIGUEIREDO FB, TEIXEIRA JL, MONTEIRO PCF, SCUBACH TMP. 2010. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Vet Rec** 166:290-294.<https://doi.org/10.1136/vr.166.10.290>.

PETROU A, FESATIDOU M, GERONIKAKI A. Thiazole ring—A biologically active scaffold. **Molecules**, 2021; 26:11-3166

PIJPER A, PULLINGER BD. An outbreak of sporotrichosis among South African native miners. **The Lancet** 1927; 210: 914-916. 58.

RODRIGUES AM, DE HOOGH GS, DE CAMARGO ZP. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. **PLOS Pathogens**. 2016; 12: e1005638.

SHARMA, P. C.; SHARMA, D.; SHARMA, A.; SAINI, N.; GOYAL, R.; OLA, M.; CHAWLA, R.; THAKUR, V. K. Hydrazone comprising compounds as promising anti-infective agents: Chemistry and structure-property relationship. **Materials Today Chemistry**, v. 18, p. 100349, 2020.

SCHENCK B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. **John Hopkins Hosp.** 1898; 9: 286-290.

SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. 1º Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 396.

SILVA MB, COSTA MM, TORRES CC *et al.* Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cad Saude Publica**. 2012; 28: 1867-1880 [in Portuguese].

SILVA, M. **Descrição clínico-epidemiológica da esporotricose humana e avaliação de híbridos moleculares de 2-isoxazolina aza-bicíclica com potencial anti-*sporothrix***. Dissertação (mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 82. 2023.

SINGH V, VISHNUNARAYANAN V, PALAKKREZHILLIAM V *et al.* Recent developments on the potential biological applications of transition metal complexes of thiosemicarbazone derivatives, **Polyhedron**, 2023; 245.

VALERIANO, C. **identificação polifásica e perfil de sensibilidade de isolados de *sporothrix* sp. estocados na coleção de cultura urm**. Dissertação (mestrado em biologia de fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, p. 66. 2017.

VALERIANO CAT, LIMA-NETO RGd, INÁCIO CP, RABELLO VBdS, OLIVEIRA EP, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, *et al.* (2020) Is *Sporothrix chilensis* circulating outside Chile? **PLoS Negl Trop Dis** 14(3): e0008151. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008151>

VALERIANO, C.A.T.; FERRAZ, C.E.; OLIVEIRA, M.M.E.; INÁCIO, C.P.; DE OLIVEIRA, E.P.; LACERDA A.M.; LIMA-NETO, R.G. Cat-transmitted disseminated cutaneous sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in a new endemic area: Case series in the northeast of Brazil. **JAAD Case Reports**. v. 6, n. 10, 988-992, 2020.

VISMER HF, HULL PR. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. **Mycopathologia** 1997; 137: 137-143.

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. 52, n. 1, p. 73-80, 2021.

XAVIER, M.O.; POESTER, V.R.; TRÁPAGA, M.R. *Sporothrix brasiliensis*: Epidemiology, Therapy, and Recent Developments. **J. Fungi** 2023, 9, 921.

<https://doi.org/10.3390/jof9090921>.

APÊNDICE A - CARTA DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

April 11th, 2024

Dear Dr. Marcela Hernández
Editor-in-chief, Letters in Applied Microbiology

We are submitting the manuscript entitled “Halogenated and nitro thiosemicarbazones and thiazoles derivatives against *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix chilensis* and first *Sporothrix mexicana* clinical strain from human sporotrichosis in Brazil.”

Scarce studies have evaluated synthetic compounds against *Sporothrix* clinical strains. In the present study, we described ten hybrid compounds with antifungal potential.

I would like to inform you that the manuscript was read and approved by all authors and all of them have contributed substantially to the manuscript and approved the final submission. There are not any conflicts of interest.

We warrant that this manuscript represents an original work that is not being considered for publication, in whole or in part, in another journal, book, conference proceedings or government publication.

We believe that following items justify its publication in Letters in Applied Microbiology:

1. This work showed that thiosemicarbazones derivatives may become, after clinical trials, an option for the treatment of sporotrichosis.
2. The antifungal susceptibility profile of *Sporothrix* should be monitored due to reduction of sensitivity in *S. brasiliensis* clinical isolates against antifungal drugs is being reported, and when clinical laboratory isolates emerging species.
3. This study reports the first description of sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana* in Brazil.

All seems to be in accordance with the aims and scope of this journal. Please let us know if this work is acceptable for publication.

We look forward to your reply.

Sincerely yours,

Reginaldo G Lima-Neto, Ph.D.
Professor of Medical Mycology and Tropical Medicine
Federal University of Pernambuco, Brazil

Ana Cristina Leite, Ph.D.
Professor of Organic Chemistry, Medicinal Chemistry, and Drug Design.
Federal University of Pernambuco, Brazil

APÊNDICE B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

12-Apr-2024

Dear Prof. Reginaldo Lima-Neto:

Your manuscript entitled "Halogenated and nitro thiosemicarbazones and thiazoles derivatives against *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix chilensis* and first *Sporothrix mexicana* clinical strain from human sporotrichosis in Brazil" by Souza, Mariana; Sousa, Bruna; Ferraz, Claudia; Silva, Carolina; Silva, Elineide; Moraes, Ana; Silva, Vanessa; Pereira, Valeria; Leite, Ana; Lima-Neto, Reginaldo, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Letters in Applied Microbiology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is LAMICRO-2024-0167.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/lamicro> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/lamicro>.

OUP has a growing number of Read and Publish agreements with institutions and consortia which provide funding for open-access publishing. This means authors from participating institutions can publish open access, and the institution may pay the charge. Find out if your institution is participating: <https://academic.oup.com/pages/open-research/read-and-publish-agreements/participating-journals-and-institutions>

Thank you for submitting your manuscript to Letters in Applied Microbiology.

Sincerely,
Letters in Applied Microbiology Editorial Office

APÊNDICE C - MANUSCRITO

Halogenated and nitro thiosemicarbazones and thiazoles derivatives against *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix chilensis* and first *Sporothrix mexicana* clinical strain from human sporotrichosis in Brazil

Mariana V. Souza¹, Bruna R. Sousa¹, Claudia E. Ferraz^{1,2}, Carolina M. da Silva³, Elineide T. N. da Silva⁴, Ana Daura T. de O. Moraes⁴, Vanessa G. M. Silva⁴, Valéria R. A. Pereira⁵, Ana Cristina L. Leite⁴, Reginaldo G. Lima-Neto^{1,2*}

1 Laboratory for Research & Diagnosis in Tropical Diseases, Department of Tropical Medicine, Center for Medical Sciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Avenida Prof Moraes Rego s/n, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil

2 Dermatological Service, Hospital das Clínicas, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

3 University of Pernambuco, Campus Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.

4 Medicinal Chemistry Planning and Synthesis Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Center for Health Sciences, UFPE, Brazil

5 Laboratory of Immunopathology and Molecular Biology, Aggeu Magalhães Institute, 12 Oswaldo Cruz Foundation, 50670-42, Recife, Pernambuco, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 81 99147 9644; reginaldo.limant@ufpe.br

Impact Statement:

The study showed molecular hybrids of halogenated and nitro thiosemicarbazones and phenoxyhydrazone-thiazoles have proved to be promising compounds with low toxicity for the treatment of human sporotrichosis, especially derivatives containing the thiosemicarbazone class. Furthermore, this study identified *Sporothrix brasiliensis* using partial sequencing of the calmodulin gene, and the first to report *Sporothrix mexicana* causing human sporotrichosis in Brazil. It is noteworthy that this species that is defined classically as environmental was transmitted to the patient by zoonotic route.

Abstract

In this work, halogenated and nitro thiosemicarbazones and phenoxy-hydrazone-thiazoles derivatives were tested against *Sporothrix* clinical strains. Antifungal activity of ten compounds were assessed by broth microdilution. Cytotoxicity of the compounds was determined. 2-(3-(3-Bromophenoxy)-2-butanilideno)thiosemicarbazone (named DT 06) and 2-(3-(4-Nitrophenoxy)-2-butanilideno)thiosemicarbazone (named DT 24) showed antifungal activity with MICs from 16 to 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against *Sporothrix* strains. All compounds showed low toxicity on splenocytes and macrophages cell lines. Activity of halogenated and nitro

thiosemicarbazones and phenoxy-hydrazone-thiazoles hybrids against *Sporothrix* were related to thiosemicarbazone derivatives. In addition, we reported the first human sporotrichosis in Brazil caused by *Sporothrix mexicana*.

keywords: Antifungal activity, halogenated and nitro thiosemicarbazones, phenoxy-hydrazone-thiazoles, *Sporotrichosis*, *Sporothrix mexicana*, case report.

Introduction

The classic infection of human sporotrichosis is associated with fungi present in the soil, plants or organic matter. However, a progressive number of cases in Brazil have been related to zoonotic transmission, mainly by cats infected with *S. brasiliensis* (Valeriano et al. 2020a). Over the last eight years, a large number of cases of human sporotrichosis have been referred to the Dermatology Service at the Hospital das Clínicas of Pernambuco, northeastern Brazil. An outbreak of sporotrichosis has been affecting humans and cats on a progressive scale, in the municipalities of Metropolitan Region of Recife, capital of state of Pernambuco, with cases recorded since 2015 (Silva et al. 2021).

Itraconazole (ITC) is the first-line antifungal treatment in feline and human sporotrichosis (Bonifaz *et al.*, 2017, Orofino-Costa *et al.* 2017). Nevertheless, reports of resistant strains to ITC are increasing (Borba-Santos *et al.* 2015, Almeida-Paes *et al.* 2017), as well as refractory clinical cases, mainly in cats. In addition to ITC, the available therapeutic options are potassium iodide (KI) and amphotericin B (AmB), the latter indicated mainly for disseminated sporotrichosis (Ishida 2015, Reis *et al.* 2016).

Recently, Bonilla *et al* (2021) found that acylhydrazones (AH) target vesicular transport and progression of the fungal cell cycle, and indirectly impact the synthesis of glycosylceramide (GlcCer), and that they constitute new alternatives to be explored. In their study, they verified the fungicidal activity against *S. schenckii* and *S. brasiliensis*, the main causative agents of sporotrichosis. The molecules in this present study are derivatives of substituted halogenated and nitro thiosemicarbazones (DT series) and halogenated and nitro thiosemicarbazones phenoxyhydrazone-thiazoles (ET series) (Fig. 1), which presents structural similarity with the compounds studied in the aforementioned work by Bonilla *et al* (2021).

Therefore, in the present study, we evaluated the *in vitro* antifungal activity and cytotoxicity of halogenated and nitro thiosemicarbazones (DT series) and halogenated and nitro thiosemicarbazones phenoxyhydrazone-thiazoles (ET series) derivatives against species of *Sporothrix*, including the clinical strain of first case of human sporotrichosis in Brazil caused by *Sporothrix mexicana*.

Materials and methods

Sporothrix isolates

Nine *Sporothrix* isolates were used in this study. Seven *Sporothrix* clinical isolates were obtained in the Laboratory for Research and Diagnostics in Tropical Diseases (@lpddt_ufpe) at the Federal University of Pernambuco (UFPE), and identifications confirmed by molecular methods as described subsequently. In order to obtain fungal clinical isolates, this research was submitted to the Human Research Ethics Committee of the Center for Health Sciences at the Federal University of Pernambuco (UFPE, Brazil), and received approval under protocol 2.199.596. Two isolates had pre-established identification, and were obtained from the URM Culture Collection (www.ufpe.br/micoteca) in the Biosciences Center at the UFPE, which is certified by ISO 9001:2015, and registered in World Federation of Collections Culture (WFCC) under number 604.

Genomic Identification

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Sporothrix isolates were seeded onto Potato Dextrose Agar (PDA-Difco™ Becton, Dickinson and Company, MD, USA), and incubated at 25 °C for 7 days and the Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) was used to perform DNA extraction, according to the manufacturer's instructions. DNA quantification was performed in Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Calmodulin gene was amplified according to Marimon et al (2006) by PCR using the primers CL1 (5-GAGATATCAAGGAGGCCTTCTC-3) and CL2A (5-TTTTTGTCATCATGAGTTGGAC-3) [17,18]. The DNA amplification reaction was performed in a 20 µl

volume containing 20 ng of DNA, 1 nmol each of primers. The PCR was performed in a SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Massachusetts, USA), and the annealing temperature was 60°C. The amplicons were purified using the Illustra™ (Illustra ExoProStar, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), according to the manufacturer's instructions, and sequencing was carried out following inter protocol at the Platform of Sequencing of the Bioscience Center at the UFPE. The consensus sequences were determined and sequence editing performed using MEGA v.7.0 (available on <https://www.megasoftware.net/>), and the data were exported as FASTA files.

Phylogenetic analyzes

The sequences obtained in this study were initially compared with others using a BLASTn search in the NCBI's GenBank database. Alignments were individually performed using the MAFFT v.7 online interfaces (available on <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>) and edited manually in MEGA v.7.0 (available on <https://www.megasoftware.net/>). *Grosmannia sersens* (CBS 141.36) was used as outer group. Maximum likelihood (ML) analysis was conducted using RAxML-HPC2 on XSEDE 8.2.12 in the CIPRES Science Gateway Portal (available on <https://www.phylo.org/portal2/login>) with 1.000 bootstrap replications. Bayesian inference (BI) analysis was performed using MrBayes 3.2.7 at the CIPRES Science Gateway Portal (available on <https://www.phylo.org/portal2/login>) with 1×10^6 generations and a burn-in value of 25 % chains were sampled every 1000 generations. The best nucleotide substitution model was estimated using MrModelTest 2.3. The trees obtained were visualized using FigTree v. 1.4.4. software (available on <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and exported for editing. ML bootstrap (ML-BS) and BI posterior probability (BPP) equal to or above 70 % and 0.95 %, respectively, are shown near nodes. The sequences obtained in this study were deposited in the NCBI GenBank database.

In vitro antifungal susceptibility testing

The culture medium used was RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) sterilized in 0.22mm membranes (Millipore, Darmstadt, Germany), with L-glutamine, without sodium bicarbonate and pH 7.0±0.1 buffered with 3-[N-morpholino] propane sulfonic acid (MOPS; 0.165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich). The antifungals drugs evaluated were amphotericin B and

itraconazole in concentrations ranging from 0.03 to 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The antifungal activity of the six halogenated and nitro thiosemicarbazones (DT series) and four halogenated and nitro thiosemicarbazones phenoxyhydrazone-thiazoles (ET series) followed the same conditions as the susceptibility test, according to M38-A3 (CLSI), where the concentrations evaluated ranged from 2 to 1,024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. In order to have molecular diversity, ten halogenated compounds were included in the study (Figure 1). The plates were incubated at 35 °C for 48h. For reading, the well where no discernible growth (100% inhibition) of the inoculum was observed, it was considered minimum inhibitory concentration (MIC). *Candida parapsilosis* ATCC 22109 were used as reference strains, and tests were performed in duplicate. The determination of the MIC for *Sporothrix* isolates followed Espinel-Ingroff et al. (2017).

Cytotoxicity test of thiosemicarbazones (DT series)

Splenocytes from BALB/c mice were plated in 96-well plates at a cell number of 5×10^6 cells/well in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin. All compounds were dissolved in DMSO and then diluted in RPMI-1640 medium at five different concentrations (1.23, 3.70, 11.11, 33.33 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and added to the respective wells, in triplicate. The plate was incubated for 24h at 37°C and 5% CO_2 , containing 1.0 μCi of ^3H thymidine (Perkin-Elmer, Waltham, MA). The plate was then transferred to a β -radiation counter (Multilabel Reader, Finland) and the percentage of ^3H -thymidine was determined. The highest non-toxic concentration was determined for each compound in μM . Benznidazole and nifurtimox were used as reference medications. The test was carried out in duplicate.

Cytotoxicity test of thiazoles (ET series)

Cytotoxicity was assessed using MTT assays according to Conceição et al (2023). This test is based on the reduction of yellow tetrazolium salts by mitochondrial reductases in metabolically active cells. Since the amount of formazan produced is directly proportional to the number of viable cells, the greater the cell viability, the greater the proportion of MTT reduction and the higher the absorbance. L292 RAW 264.7 macrophages were released from the culture bottles and plated in 96-well, straight-bottom plates and incubated for 24 hours at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere for adherence. After this time, the compounds were added at concentrations of 0.78 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and incubated again for 48 hours. After incubation,

25µL of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) at 5mg/mL in PBS was added, followed by a new incubation for 2h at 37°C and protected from light. The culture medium together with MTT was discarded and 100µL of DMSO was added per well to solubilize the formazan crystals resulting from the reduction of MTT. The absorbance was read at 570 nm using a Thermo Scientific Multiskan FC spectrophotometer. The cytotoxic concentration for 50% of the culture (CC50) was determined by non-linear regression analysis using GraphPad Prism software. The test was carried out in duplicate.

Results and Discussion

The phenotypic characteristics from the pure cultures observed in SDA slants at 30°C show that all isolates were of the genus *Sporothrix*. After ten days of growth, the colonies were glabrous, white-to gray, with dark pigmentation at the edge of the colony. Microscopic analysis at this time showed ovate hyaline and thin-walled conidia in sympodial conidiophores with a floral appearance. Brown conidia along the undifferentiated hyphae was observed also.

The genotypic analyzes from the seven *Sporothrix* isolates obtained in Laboratory for Research and Diagnostics in Tropical Diseases at the UFPE identified six isolates as *Sporothrix brasiliensis*, and one as *Sporothrix mexicana* as summarized in Table 1. It is noteworthy that this is the first *Sporothrix mexicana* clinical strain isolated in a humansporotrichosis case in Brazil.

The human sporotrichosis case caused by *Sporothrix mexicana* identified with code 403/19 was in a 65-year-old woman, university professor with doctor degree, who had fixed cutaneous ulcerated lesion on second left finger. Her research on the educational institution involves managing halophyte plants and evaluating soil salinity, and has extensive contact with land. In addition, the patient refers contact with infected cat. Only 40 days after the injury, the patient sought out the Dermatological Service of the Hospital of Clinics at the UFPE, and mycological examination was required. The patient went to the Laboratory for Research and Diagnostics in Tropical Diseases at the UFPE, and exudate samples were collected, and seeded on mycosel agar in duplicate. Both plates incubated at Brazilian room temperature (25-28 °C). Thus, after seven days of culture *Sporothrix* clinical isolate was observed. In medical appointment, it was prescribed itraconazole 100mg/daily, but after six days, the patient returned to the Outpatient Dermatological Service with complains of diarrhea

and itraconazole was replaced by terbinafine (250 mg/daily). After 15 weeks, the patient returned with the injury fully healed and was discharged.

Since we had a clinical isolation of *Sporothrix mexicana*, we chose to incorporate another strain of the same species into the study for comparison purposes. Furthermore, a strain of *Sporothrix chilensis* previously characterized by our laboratory (Valeriano et al., 2020b) was also incorporated, in order to expanding the number of *Sporothrix* species to be evaluated against new bioactivity compounds. Both strains were obtained from the historical Brazilian fungal service culture collection University Recife Mycology (URM, www.ufpe.br/micoteca) that was established in 1954, and is hosted by the Department of Mycology at the UFPE, Recife, Brazil.

Maximum likelihood and Bayesian inference analyzes were obtained using calmodulin sequences from the nine *Sporothrix* strains. The species sequenced in the study are in bold in Figure 2, and the sequences deposited in GenBank (Table 1). The high MLbootstrap values and BI posterior probability support the genotypic identification of the strains.

For each antifungal susceptibility test, the inoculum control wells without antifungal drugs showed clearly detectable growth after the incubation period, indicating that all isolates were viable and that the conditions used were suitable for fungal growth. Eight *Sporothrix* isolates showed minimum inhibitory concentrations ranging from 0.03 to 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and were classified as wild-type strains to itraconazole. However, one strain of *Sporothrix brasiliensis* (HC 78/23) showed a MIC greater than 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, was classified as non-wild-type (Table 1). Regarding amphotericin B, the isolates exhibited minimum inhibitory concentrations varying between 0.03 and 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and were classified as wild-type (Table 1).

Some reports have evidenced *S. brasiliensis* clinical strains categorized as non-wild-type against itraconazole in the recent years (Waller et al. 2021, Lima-Neto et al. 2023). Thence, studies for alternatives to get around this issue has become relevant. The tested halogenated and nitro molecules showed minimum inhibitory concentrations ranging from 16 to 1,024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Table 2). Based on the epidemiological cutoff values of 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to itraconazole, and 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to amphotericin B (Espinel-Ingroff et al. 2017), and due to lack of classification for new synthetic derivatives, the following classification was adopted: halogenated and nitro compounds with MIC ranging from 128 to 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were considered with low activity, and those that showed MIC ranging from 16 to 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, were considered with intermediate activity.

The *S. chilensis* isolate presented a MIC of 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against amphotericin B, but a multicentric study that established epidemiological cutoff values does not provide these data for *S. chilensis*. Given the MIC value demonstrated in the present study, amphotericin B may not be the best drug of choice for the treatment of sporotrichosis caused by this species. Strains considered non-wild-type for a certain drug are not necessarily classified this way for others. This fact may be due to the different resistance mechanisms presented for distinct therapeutic classes. Resistance to itraconazole, for example, is mainly related to CYP450 enzymes (Waller et al 2021), while resistance to amphotericin B is related to changes in the composition of the plasma membrane (sterols) and greater tolerability to oxidative stress (Carolus et al. 2020).

The cytotoxicity of the six DT compounds determined in splenocytes from BALB/c mice (Table 3) were between 31.6 and 88.5 μM (Moreira et al. 2014). The cytotoxicity of the four ET compounds evaluated using L929 mouse fibroblast cell lines (Table 4), showed that three of the four compounds inhibited 50% of the cell viability at a concentration above 100 μM . These data demonstrate that the compounds evaluated present low cytotoxicity, and may be more selective to fungal cells than mammalian cells.

The antifungal activity of hydrazones has been significantly analyzed through *in vitro* tests over the past decade (Sharma et al. 2020). Unlike thiazole derivatives, hydrazones have already been reported to be able to inhibit the growth of *S. brasiliensis*, with MIC ranging from 0.25 to 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Bonilla et al. 2021).

The DT 06 and DT 24 thiosemicarbazones derivatives showed an interesting activity against *Sporothrix* isolates of this study, both showing MICs ranging from 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Thiosemicarbazones have demonstrated a variety of possible anticancer, antimicrobial, and antioxidant activities when they bind with metal ions. Metals are selective for their target cells, and affects how ligands attach to proteins and enzymes. Their electronic and structural features, which also provide a diversity of donor atoms and a high level of electronic delocalization, promote a variety of binding modes for biomolecules, and are related to their activity. According to Singh et al. (2023) the presence of a metal ion significantly boosts the activity of the ligand in the vast majority of cases.

Lima-Neto et al. (2023) showed the activity of nine molecular hybrids containing thiosemicarbazones and thiazolidinediones against pathogenic species of *Sporothrix*, in which nine 5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyrazine hybrids were tested against 30 isolates of the *Sporothrix schenckii* complex (Lima-Neto et al 2023). Three thiosemicarbazones derivatives with low toxicity showed antifungal activity and promoted resistance reversal against

itraconazole in 4 *Sporothrix* clinical isolates that were classified as non-wild-type. This corroborates our findings that the molecular hybrids belonging to the thiosemicarbazone class (DT series) showed activity against the *Sporothrix*. The next step will be to carry out interaction tests to evaluate the possibility of reversing resistance in non-wild-type strains.

Regarding the case of sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, it can be seen that this clinical isolate showed low MICs against itraconazole and amphotericin B. *S. mexicana* is considered an environmental species, less virulent than *Sporothrix brasiliensis*, and has been related to few cases of sporotrichosis (Dias et al. 2011, Bonifaz et al. 2020). Unlike our fungus, Dias et al. (2011) isolated a clinical strain of *Sporothrix mexicana* that presented MIC of 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against itraconazole, however the authors did not report the outcome of the case. An interesting report about sporotrichosis outbreak in mine-workers from the South Africa, Govender et al. (2015) isolated four *Sporothrix mexicana* environmental isolates from the soil and wood scrapings inside the mine. All isolates had high MICs against amphotericin B (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and itraconazole (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) by E-test. Considering broth microdilution, three of the four isolates also showed high MIC against amphotericin B (8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and itraconazole (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). These data reinforce the need to perform antifungal susceptibility testing on all emerging species.

Conclusion

The susceptibility profile of the clinical isolates showed sensitivity to itraconazole and amphotericin B, with the occurrence of one non-wild strains. Five of the halogenated and nitro thiosemicarbazones were able to partially inhibit the growth of *S. brasiliensis*, *S. chilensis* and *S. mexicana*, with DT 06 and DT 24 showing moderate activity. Thiosemicarbazones derivatives are promising compounds for incorporating into the treatment of this disease. Future studies are needed to better evaluate their antifungal potential, as well as reversing the resistance of non-wild-type strains.

Human sporotrichosis continues to be an endemic and relevant mycosis in the state of Pernambuco, especially due to its occurrence as a zoonosis. To our knowledge, we identified the first case of human sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana* in Brazil. Laboratory-based epidemiological surveillance needs to be established in routine clinical laboratories to allow monitoring of emerging.

Acknowledgments including Funding information

The authors wish to thank the Dermatological Service at the Hospital of Clinics at the Federal University of Pernambuco, the reference health service in sporotrichosis in the state of Pernambuco, for follow-up of the patients and providing their data. The authors are grateful to the Coordination for Higher Education Staff (CAPES, Ministry of Education) for the scholarship of Mariana Veríssimo de Souza (88887.814310/2023-00). This work was partially funded by the Support Foundation in Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE 17/2021 grant APQ-1061-4.01/21), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Ministry of Science and Technology, Brazil, grant 409734/2021-7). RG de Lima-Neto is a fellow researcher by the CNPq/MCTI/Brazil (grant 310414/2022-9).

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

All relevant data are within the paper. The sequences of strains are available in Genbank Database.

Authors' Contribution Statement

Conception and design of the work: MV Souza, ACL Leite and RG Lima-Neto.

Follow up of patients: CE Ferraz.

Clinical laboratory: MV Souza, BR Souza, CM Silva and RG Lima-Neto.

Chemistry synthesis and cytotoxicity: ETN Silva, ADTO Moraes, VGM Silva, VRA Pereira and ACL Leite.

Analysis and interpretation of data: MV Souza, BR Sousa, CE Ferraz, ACL Leite and RG Lima-Neto.

Drafting the work and revising it critically for intellectual content: MV Souza, BR Sousa, ACL Leite and RG Lima-Neto.

Final approval of the version to be published: All authors

REFERENCES

Almeida-Paes R, de Oliveira M, Freitas F *et al.* Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014;**9**:3094-8.

Artunduaga B, Honorato L, Haranahalli K *et al.* Antifungal activity of Acylhydrazones derivatives against *Sporothrix* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021;**11**:16-65.

Bonifaz A, Tirado Sánchez A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. *J Fungi*, 2017;**13**:3-6.

Bonifaz A, Morales-Peña N, Tirado-Sánchez A, Jiménez-Mendoza DR, Treviño-Rangel RJ, González GM. Atypical sporotrichosis related to *Sporothrix mexicana*. *Mycopathologia*, 2020;**185**(4):733-5.

Borba-Santos P, Rodrigues M, Gagini B *et al.* Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med Mycol*, 2015;**53**:178-88.

Carolus H, Pierson S, Lagrou K *et al.* Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *Journal of Fungi*, 2020; **321**.

Conceição J, Santos A, Brayner F *et al.* Structural design synthesis, and anti-Trypanosomatide profile of new Pyridyl-thiazolidinone. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023; **254**:115310.

Dias NM, Oliveira MM, Santos C, Zancoppe-Oliveira RM, Lima N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 2011;**17**(10):1975-6.
Espinell-Ingroff A, Abreu D, Almeida-Paes R *et al.* Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017;**61**:1-8.

Govender NP, Maphanga TG, Zulu TG, Patel J, Walaza S, Jacobs C, Ebonwu JI, Ntuli S, Naicker SD, Thomas J. An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015;**25**;9(9):e0004096

Ishida K, de Castro R, Borba P *et al.* Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol*, 2015;**53**:34-41.

Lima-Neto R, Neta M, Valeriano C *et al* Antifungal efficacy of imidazo[1,2-a]pyrazine-based thiosemicarbazones and thiazolidinediones against *Sporothrix* species. *Future Microbiol*, 2023;**18**:1225-33.

Marimon R, Gené J, Cano J, *et al.* Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*, 2006;**44**:3251-6.

Moreira DRM, Oliveira ADT, Gomes PATM, *et al.* Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. *Eur J Med Chem*, 2014;**74**: 467-478.

Orofino-Costa R, Rodrigues M, de Macedo M *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*, 2017;**92**:606-20.

Petrou A, Fesatidou M, Geronikaki A. Thiazole ring - A biologically active scaffold. *Molecules*, 2021; **26**:11-3166.

Reis E, Schubach P, Pereira A *et al.* Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. *Med Mycol*, 2016; **54**:684-90.

Rex JH, Barbara MD, Alexander BD *et al.* Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008.

Sharma P, Sharma C, HARMA D.; Saini N *et al.* Hydrazone comprising compounds as promising anti-infective agents: Chemistry and structure-property relationship. *Materials Today Chemistry*, 2020;**18**:100349

Silva CE, Valeriano CA, Ferraz CE *et al.* Epidemiological features and geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. *Future Microbiol*, 2020; **16**, 1371-1379.

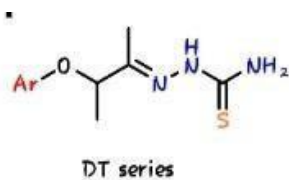
Singh V, Vishnunarayanan V, Palakkeezhillam V *et al.* Recent developments on the potential biological applications of transition metal complexes of thiosemicarbazone derivatives, *Polyhedron*, 2023; **245**.

Valeriano CAT, Ferraz CE, Oliveira MME *et al.* Cat-transmitted disseminated cutaneous sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in a new endemic area: case series in the northeast of Brazil. *JAAD Case Reports*, 2020;**6**(10), 988-992a.

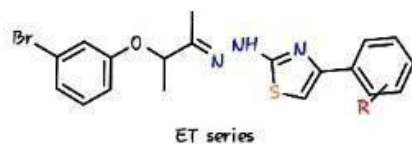
Valeriano CAT, Lima-Neto RGd, Inácio CP, Rabello VBdS, Oliveira EP, Zancopé-Oliveira RM, *et al.* Is *Sporothrix chilensis* circulating outside Chile? *PLoS Negl Trop Dis*, 2020;**14**(3): e0008151.

Waller S, Dalla L, Quattrin P *et al.* Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021;**5**

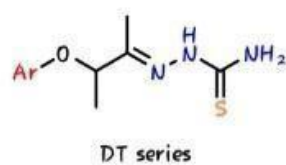
APÊNDICE D - FIGURAS DO MANUSCRITO



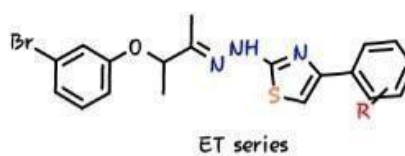
Code	Ar
DT. 06	3-Br-Ph
DT. 20	3-Cl-Ph
DT. 24	4-NO ₂ -Ph
DT. 34	2-Cl-Ph
DT. 38	2,4-diCl-Ph
DT. 40	3-Cl, 4-F-Ph



Code	R
ET.04	4-F-Ph
ET.05	4-Cl-Ph
ET.07	2,4-Br-Ph
ET.09	4-NO ₂ -Ph

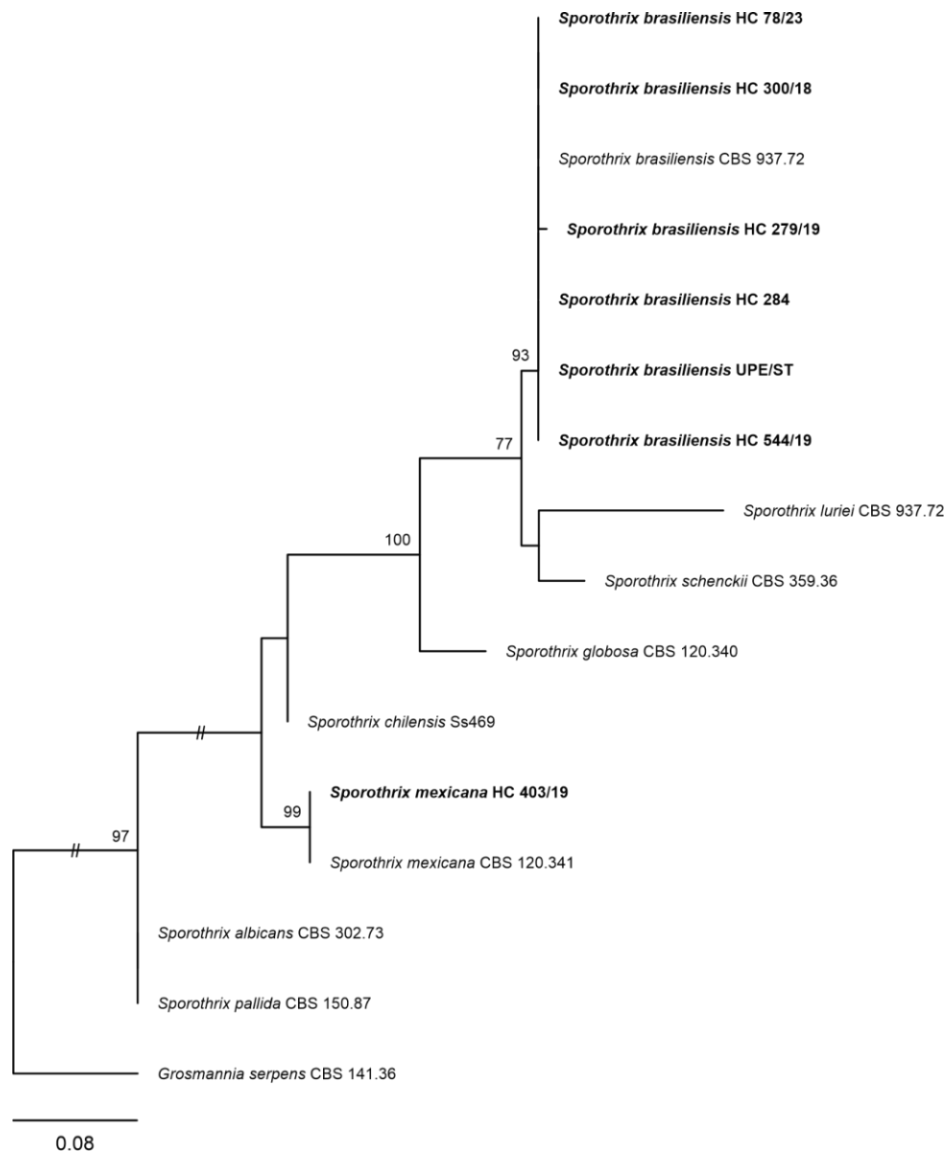


Code	Ar
DT. 06	3-Br-Ph
DT. 20	3-Cl-Ph
DT. 24	4-NO ₂ -Ph
DT. 34	2-Cl-Ph
DT. 38	2,4-diCl-Ph
DT. 40	3-Cl, 4-F-Ph



Code	R
ET.04	4-F-Ph
ET.05	4-Cl-Ph
ET.07	2,4-Br-Ph
ET.09	4-NO ₂ -Ph

Figure 1. Chemical structures and pharmacomodulation of DT (thiosemicarbazones) and ET (thiazoles) series.



APÊNDICE E - TABELAS DO MANUSCRITO

Table 1. Patients codes, Sporothrix identifications by CAL sequencing, GenBank accessions, and antifungal susceptibility profile (in $\mu\text{g.mL}^{-1}$) against amphotericin B and itraconazole.

Patient ID	Strains	GenBank CAL	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
			AMB	ITC
HC 78/23	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505842	0,125	>16
HC 284/21	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505838	0,25	0,125
HC 544/19	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505841	0,25	0,25
HC 403/19	<i>Sporothrix mexicana</i>	PP537789	0,03	0,03
HC 279/19	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505840	0,125	0,125
HC 300/18	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505839	0,06	0,5
UPE/ST 01	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	PP505843	0,125	0,06
URM 301	<i>Sporothrix mexicana</i>		1	0,5
URM 2439	<i>Sporothrix chilensis</i>		4	0,5
¥ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>		0,25	0,125

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

AMB.- amphotericin B

ITC - Itraconazole

¥ ATCC- American Typical Culture Collection

Table 2. Antifungal activity of 10 halogenated phenoxyhydrazone-thiazole derivatives against nine *Sporothrix* strains obtained by broth microdilution (MIC values are in $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Patient ID	Strains	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)									
		ET 04	ET 05	ET 07	ET 09	DT 06	DT 20	DT24	DT34	DT 38	DT40
HC 78/23	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	128	256	32	128	512	512
HC 284/21	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	128	256	32	128	64	128
HC 544/19	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	64	64	128	256	128	256
HC 403/19	<i>S. mexicana</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	16	64	64	64	64	512
HC 279/19	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	128	32	64	64	128	512
HC 300/18	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	64	64	32	256	128	16
UPE/ST 01	<i>S. brasiliensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	128	256	64	64	>1024	64
URM 301	<i>S. mexicana</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	64	128	64	256	64	1024
URM 2439	<i>S. chilensis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	16	128	128	128	32	128
¥ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	16	32	16	32	16	16

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

¥ ATCC- American Typical Culture Collection

Table 3. Cytotoxicity from the six thiosemicarbazones compounds (DT series).

Code	Radical	Toxicity in μM^*
DT 06	3-BrPh	31.6
DT 20	3-ClPh	36.8
DT 24	4-NO ₂ Ph	88.5
DT 34	2-ClPh	36.8
DT 38	2,3-diClPh	34.5
DT 40	3-Cl-4-FPh	34.5
Nfx	-	3.4

*Viability of splenocyte cells from BALB/c mice determined 24h after treatment. The results were expressed as the highest non-toxic concentration. Nfx = Nifurtimox.

Table 4. Cytotoxicity from the thiazoles compounds (ET Series).

Code	Radical ¹	Radical ²	Toxicity (CC ₅₀) in μM^*
ET 04	4-F-Ph	H	177.4
ET 05	4-Cl-Ph	H	83.2
ET 07	2,4-Br-Ph	H	124.4
ET 09	4-NO ₂ -Ph	H	148.3
BZD	-	-	2,228.6

* Concentration that inhibits 50% of viability (CC₅₀) of the L292 macrophages.
Bdz = benznidazole