

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ESPOROTRICOSE E *Sporothrix brasiliensis*: OCORRÊNCIA NO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO DO DISSELENETO DE DIFENILA EM
MODELO MURINO**

Lívia Silveira Munhoz

Rio Grande, 2022



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ESPOROTRICOSE E *Sporothrix brasiliensis*: OCORRÊNCIA NO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO DO DISSELENETO DE DIFENILA EM
MODELO MURINO**

Lívia Silveira Munhoz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Melissa Orzechowski Xavier

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Vanice Rodrigues Poester

Rio Grande, 2022

Ficha Catalográfica

M966e Munhoz, Lívia Silveira.

Esporotricose e *Sporothrix brasiliensis*: ocorrência no estado do Rio Grande do Sul e avaliação do disseleneto de difenila em modelo murino / Lívia Silveira Munhoz. – 2022.

92 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio Grande/RS, 2022.

Orientadora: Dra. Melissa Orzechowski Xavier.

Coorientadora: Dra. Vanice Rodrigues Poester.

1. Antifúngico 2. Selênio 3. *Sporothrix* spp. 4. Modelo *in vivo*
5. Zoonoses 6. Doença transmitida por gato I. Xavier, Melissa Orzechowski II. Poester, Vanice Rodrigues III. Título.

CDU 616.993(816.5)

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Lívia Silveira Munhoz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

ESPOROTRICOSE E *Sporothrix brasiliensis*: OCORRÊNCIA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E AVALIAÇÃO DO DISSELENETO DE DIFENILA EM MODELO MURINO

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Daniela Fernandes Ramos Soares – FURG

Prof. Dr. Sydney Hartz Alves – UFSM

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes- INI/Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Rossana Patricia Basso (Suplente) – FURG

Prof^a. Dr^a. Melissa Orzechowski Xavier (Orientadora) – FURG

Prof^a Dr^a. Vanice Rodrigues Poester (Coorientadora) - FURG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização dessa etapa de crescimento profissional e pessoal tão importante.

Agradeço ao corpo técnico dos setores de Laboratório de Micologia – FAMED/FURG, Coordenação do Biotério Central/PROINFRA e ao Biotério Setorial da FAMED pelo apoio, empenho e suporte durante todo o percurso.

Agradeço as amizades sinceras e aos vínculos que o Laboratório de Micologia me proporcionou neste período.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e a FURG pela oportunidade e qualidade de ensino.

Agradeço ao Laboratório de Síntese, Reatividade, Avaliação Toxicológica e Farmacológica de Organocalcogênios da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pela forte parceria e cedência do disseleneto de difenila, “peça-chave” em meu trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM pelo apoio integral e engajamento.

Agradeço a FAPERGS pelo apoio financeiro a esse trabalho, sem o qual não teríamos conseguido concretizá-lo.

Agradeço de forma especial a minha família pela essência, pelos exemplos, pelo incentivo e pela força.

Meu eterno agradecimento a minha Orientadora e Coorientadora pelos exemplos de profissionalismo, dedicação, resiliência, ética e perseverança. O ato de “orientar” na sua essência é uma habilidade que pertence a poucos e que tive a sorte de estar fortemente amparada.

De fato, só tenho a agradecer a vida, pelos caminhos, pelos ensinamentos, pelos momentos e pelos frutos.

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto..”

Mercedes Sosa



FAPERGS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

O presente trabalho foi desenvolvido com apoio da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)** – PqG 2019 – edital 05/2019 – Termo de outorga: 19/2551-0001922-0.

RESUMO

A esporotricose felina e zoonótica causada por *Sporothrix brasiliensis* apresenta um caráter hiperendêmico e emergente no Brasil. No Rio Grande do Sul (RS), um dos estados com maior número de casos documentados, relatos são oriundos apenas da região sul. A ausência na literatura científica da descrição da esporotricose por *S. brasiliensis* no restante do estado é um fator preocupante e limitante para o controle da situação epidemiológica. Em adição, a dificuldade de tratamento da esporotricose felina, contribui com disseminação do fungo intra e inter-espécies. Assim, diante da pouca disponibilidade de fármacos antifúngicos e das falhas terapêuticas já reportadas, a busca por novos compostos para auxílio no tratamento da esporotricose é urgente. O disseleneto de difenila [(PhSe)₂] é um composto simples, estável e com promissora ação *in vitro* anti-*S. brasiliensis*. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo atualizar a situação epidemiológica da esporotricose no estado do RS (artigo/manuscrito 1) e avaliar o potencial terapêutico do (PhSe)₂, de forma isolada e em associação com o fármaco de eleição, na esporotricose experimental por *S. brasiliensis* (artigo/manuscrito 2). Para elaboração do artigo/manuscrito 1 foi avaliada a ocorrência de casos da micose no estado a partir de questionários, bem como foi realizado um levantamento dos casos (animal e humano) da doença na região sul (2017-2021) e região metropolitana (Porto Alegre, 2016-2021). De tal modo pode-se demonstrar a ocorrência da esporotricose felina em todas as macrorregiões de saúde do RS, e salientar o agravamento da situação epidemiológica na região sul e na região metropolitana, comprovando que a mesma não encontra-se restrita, e sim amplamente distribuída por todo RS. Para o artigo/manuscrito 2, foi realizado experimento *in vivo* a partir da infecção por *S. brasiliensis* no coxim plantar de camundongos BALB/cJ, e posterior tratamento com três concentrações (1, 5 e 10 mg/kg) do (PhSe)₂ e associação entre (PhSe)₂ 1mg/kg e itraconazol 50 mg/kg (ITZ), utilizando grupos controle (placebo e tratamento com ITZ), no período de 30 dias consecutivos, por via oral. A efetividade dos tratamentos foi determinada por dados clínicos, ensaio de sobrevivência, e avaliações micológica (quantificação da carga fúngica) e histológica (padrão de lesão tecidual). Foi possível demonstrar que o (PhSe)₂ 1 mg/kg reduziu a carga fúngica de forma semelhante ao ITZ, indicando promissora ação antifúngica do composto na forma isolada. Além disso, o grupo da associação [(PhSe)₂+ ITZ] diferenciou-se positivamente do grupo ITZ, apresentando maior redução de carga fúngica bem como melhora dos parâmetros clínicos. Já as doses de 5 e 10 mg/kg de (PhSe)₂ indicaram possível toxicidade, culminando na perda de peso, maior mortalidade e agravamento de sinais clínicos. Dosagens menores do (PhSe)₂ devem ser consideradas, de forma isolada ou em associação com o ITZ, a fim de evidenciar seu pleno potencial terapêutico. Os dados apresentados na tese embasam e fundamentam o enfrentamento da esporotricose no grave contexto de saúde pública à nível nacional, estadual e municipal, demonstrando a importância e a necessidade da notificação compulsória de casos e de ações robustas em saúde pública a fim de conter a dispersão dessa enfermidade. Destaca-se ainda o pioneirismo na utilização do (PhSe)₂, de forma isolada ou em interação ao fármaco de eleição, contra o *S. brasiliensis* em modelo murino, identificando potenciais dosagens com ação terapêutica e estimulando a busca por novas opções antifúngicas.

Palavras-chave: Antifúngico; Selênio; *Sporothrix* spp.; Modelo *in vivo*; Zoonoses; doença transmitida por gato. **ODS contemplado(s):** Saúde e Bem-estar; Educação de Qualidade.

ABSTRACT

Feline and zoonotic sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* has a hyperendemic and emerging character in Brazil. In Rio Grande do Sul (RS), one of the states with the highest number of documented cases, reports come only from the southern region. The absence in the scientific literature of the description of sporotrichosis by *S. brasiliensis* in the rest of the state is a worrying and limiting factor for the control of the epidemiological situation. In addition, the difficulty in treating feline sporotrichosis contributes to intra and inter-species dissemination of the fungus. Thus, given the limited availability of antifungal drugs and the therapeutic failures already reported, the search for new compounds to help in the treatment of sporotrichosis is urgent. Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] is a simple, stable compound with promising *in vitro* anti-*S. brasiliensis*. Therefore, the present study aimed to update the epidemiological situation of sporotrichosis in the state of RS (article/manuscript 1) and to evaluate the therapeutic potential of (PhSe)₂, alone and its association with the first-choice drug, in experimental sporotrichosis by *S. brasiliensis* (article/manuscript 2). To prepare the article/manuscript 1, the occurrence of mycosis cases in the state was evaluated through questionnaires, as well as a survey of cases (animal and human) of the disease in the Southern region (2017-2021) and Metropolitan region (Porto Alegre, 2016-2021). In this way, it was demonstrated the occurrence of feline sporotrichosis in all health districts of RS and highlights the worsening of the epidemiological scenery in the Southern region and in the Metropolitan region, proving that it is not restricted, but widely distributed for all RS. For article/manuscript 2, an *in vivo* experiment was executed from the infection by *S. brasiliensis* in the footpad of BALB/cJ mice, and subsequent treatment with three concentrations (1, 5 and 10 mg/kg) of (PhSe)₂ and association between (PhSe)₂ 1mg/kg and itraconazole 50 mg/kg (ITZ), using control groups (placebo and treatment with ITZ), for 30 consecutive days, orally. The effectiveness of treatments was determined by clinical data, survival assay, and mycological (quantitation of fungal burden) and histological (pattern of tissue injury) assessments. It was possible to demonstrate that (PhSe)₂ 1 mg/kg reduced the fungal burden in a similar way to ITZ, indicating a promising antifungal action of the compound in isolated form. In addition, the [(PhSe)₂+ ITZ] association group was positively different from the ITZ group, showing greater reduction in fungal load as well as improvement in clinical parameters. On the other hand, doses of 5 and 10 mg/kg of (PhSe)₂ indicated possible toxicity, culminating in weight loss, higher mortality, and worsening clinical signs. Lower dosages of (PhSe)₂ should be considered, alone or in association with ITZ, to demonstrate its full therapeutic potential. The data presented in the thesis support the fight against sporotrichosis in the serious context of public health at the national, state, and municipal levels, demonstrating the importance and need for compulsory notification of cases and robust public health actions in order to contain the dispersion of this disease. Also noteworthy is the pioneering use of (PhSe)₂, alone or in interaction with the first-choice drug, against *S. brasiliensis* in a murine model, identifying potential dosages with therapeutic action and stimulating the search for new antifungal options

Key word: Antifungal; Selenium; *Sporothrix* spp.; *In vivo* model; Zoonoses; Cat-transmitted Disease.

Sustainable Development Goals contemplated: Good Health and Well-Being; Quality education.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Macromorfologia de *S. brasiliensis*. A. Na fase filamentosa em ágar Sabouraud a 25°C. B. Na fase leveduriforme em ágar BHI a 37°C..... 21
- Figura 2.** Microscopia de *Sporothrix* spp (aumento x40). A: Visualização com azul de lactofenol na forma filamentosa a 25°C. B: Visualização na forma leveduriforme a 37°C a partir da coloração de Grocott-gomori..... 21
- Figura 3.** Manifestação clínica em humanos da esporotricose causada por *S. brasiliensis*. A: Lesão cutânea nodular com pequena fístula; B: Lesão cutânea ulcerada; C: Lesões crostosas linfocutâneas; D: Lesão linfocutânea ascendente..... 28
- Figura 4.** Manifestação clínica da esporotricose em gatos desencadeada pela espécie *S. brasiliensis*. A: Discreta lesão cutânea na face; B: Lesão interdigital ulcerada; C: Lesões extensas e invasivas na região cefálica. 30
- Figura 5.** Estrutura química do disseleneto de difenila..... 38

Artigo/Manuscrito 1

- Figure 1.** Health districts of Rio Grande do Sul state (RS), Southern Brazil. Orange circles refer to the number of participants and cities included in the study. Cat icons and human icons correspond to regions with feline and human sporotrichosis cases, respectively, mentioned in response to the questionnaires.....46
- Figure 2.** Sporotrichosis cases (human and animal) reported in the two most hyperendemic cities (Pelotas and Rio Grande, from the South region) of Rio Grande do Sul state, between January 2017 and September 2021.....48
- Figure 3.** Increase in the number of human sporotrichosis cases in an institution from the capital city (Metropolitan region) of Rio Grande do Sul state, between January 2016 and September 2021.....49

Artigo/Manuscrito 2

- Figure 1.** Chemical structure of diphenyl diselenide.....59

Figure 2. Schematic experimental design to evaluate diphenyl diselenide in the treatment of sporotrichosis. The strategy used to develop the murine subcutaneous infection and antifungal treatment was represented as a timeline. Yeasts of *S. brasiliensis* (5.4×10^7 cells) were inoculated by subcutaneous injection in the left hind paw. Daily treatment started in the 7th-day post-inoculation, once ulcerate lesions were already present in all mice. All treatments were performed by gavage for 30 days and weekly all the animals were clinical evaluated and weight. tD: treatment day; iD: inoculation day.....61

Figure 3. Mice infected with *S. brasiliensis* M1078 into the left hind paw. The images shown here correspond to days 1 to 28 of treatment started after 7 days of infection.....64

Figure 4. Survival rate of BALB/cJ mice infected with *Sporothrix brasiliensis* (M1078) yeasts and subjected to one of the following groups. Kaplan-Meier survival plots followed by long-rank test.....65

Figure 5. Fungal burden (colony-forming units - CFU/g – scale log) of internal organs (lungs, liver, kidneys, brain and testicle) in the groups evaluated. Distinct letters denote significative difference between groups. Black asterisks (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$) above the plots represent the degree of significance of the groups in relation to G1 – Placebo. Blue asterisk (*** $p \leq 0.001$) connected with blue line represent the degree of significance of drugs alone in relation to its association (G6) – ITZ x (PhSe)₂ 1mg/kg. Kruskal-Wallis combined with Mann-whitney.....66

Figure 6. Representative images of histopathological pattern of lesions: (1) robust inflammatory response: granulomatous pattern with few yeast cells; (2) presence of caseating granuloma; (3) non-organized inflammatory response: well-delimited area with myriads of infiltrated with a high number of yeasts for a variable number of macrophages without granuloma formation.....67

- Supplementary Material

Figure S1. CFU per organ in BALB/cJ male mice 30 days post-treatment. Data are expressed as log CFU/g of tissue in the liver, kidneys, lungs, brain, and testicle.....68

LISTA DE TABELAS

ARTIGO/MANUSCRITO 1

Table 1. Data obtained through the inquiry about sporotrichosis occurrence in the Rio Grande do Sul state.....47

ARTIGO/MANUSCRITO 2

Table 1. Percentage of weight loss at the end of the experiment expressed as mean and standard deviation according to the treatment group.....65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Breve Histórico e Epidemiologia da Esporotricose	14
2.2	Epidemiologia da Esporotricose no Brasil	18
2.3	Agente Etiológico	20
2.4	Fisiopatogenia da Esporotricose e Fatores de Virulência de <i>Sporothrix</i> spp.	21
2.5	Aspectos Clínicos	26
2.6	Diagnóstico	30
2.7	Tratamento	33
2.8	Estudos de Novos Compostos Anti-<i>S. brasiliensis</i>	35
2.9	Potencial Antifúngico do Disseleneto de Difenila	36
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo Geral	41
3.2	Objetivos Específicos	41
4	ARTIGO/MANUSCRITO 1	42
5	ARTIGO/MANUSCRITO 2	56
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea de distribuição mundial e emergente no Brasil, causada por fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix* (BARROS *et al.*, 2011; GREMIÃO *et al.*, 2017). Essa enfermidade acomete mamíferos, dentre eles humanos, gatos e cães, manifestando-se mais comumente na forma cutânea e linfocutânea. A infecção se desenvolve após a inoculação traumática de solo/vegetal contaminado ou arranhões/mordidas de gatos domésticos infectados, na pele ou mucosa, podendo ocorrer transmissão entre animais (gato/gato ou gato/cão) e transmissão zoonótica (gato/humano) (RODRIGUES *et al.*, 2016).

No Brasil, a incidência da esporotricose felina e zoonótica, nas últimas duas décadas, tem aumentado substancialmente, e atualmente esta micose está dispersa por praticamente todo território brasileiro (SANCHOTENE *et al.*, 2015; GREMIÃO *et al.*, 2017; POESTER *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2022). Essa casuística está intimamente associada a dois principais fatores, a espécie *S. brasiliensis*, principal agente dos casos de esporotricose felina e zoonótica (>90%), e ao gato doméstico, um hospedeiro altamente suscetível a essa espécie fúngica. Juntamente, estes contribuíram para instalação nacional do caráter emergente dessa micose, até pouco tempo restrito geograficamente apenas ao território brasileiro, e em 2020 descrito em país vizinho (Argentina) (RODRIGUES *et al.*, 2013; SANCHOTENE *et al.*, 2015; BRANDOLT *et al.*, 2018; ETCHECOPAZ *et al.*, 2020). Os gatos, diferentes de outros mamíferos, incluindo humanos, são altamente suscetíveis à infecção por *S. brasiliensis*, desenvolvendo de forma disseminada múltiplas lesões cutâneas severas, com alta carga de propágulos fúngicos, e conseqüentemente, associado aos seus hábitos de mobilidade e comportamento de luta, transmitem o fungo para outros animais e humanos e contribuem para a rápida disseminação da doença (GREMIÃO *et al.*, 2014).

O Rio Grande do Sul (RS) é o segundo estado do Brasil com maior incidência de esporotricose com associação zoonótica, porém os casos estão descritos, majoritariamente, apenas na região sul (POESTER *et al.*, 2018). Considerando que não se trata de uma doença de notificação compulsória, e que frequentemente é subdiagnosticada, essa distribuição mais restrita da doença e a crescente e constante casuística associada a região sul, tanto em animais como em humanos, instiga a realização de estudos que evidenciem dados sobre a epidemiologia da esporotricose no restante do estado (SANCHOTENE *et al.*, 2015; BRANDOLT *et al.*, 2018; POESTER *et al.*, 2018). Pelo contexto de suscetibilidade em que os felinos estão envolvidos e devido a seu papel central na epidemiologia dessa zoonose, é de suma importância avaliar a incidência da esporotricose felina no restante do RS, utilizando como ferramenta o

conhecimento de médicos veterinários, a fim de buscar informações epidemiológicas mais consistentes que corroborem quanto a realidade da esporotricose felina e de caráter zoonótico em todo o RS, as quais são de alta relevância para o desenvolvimento de ações de saúde pública em maior nível de abrangência.

Outra linha que predispõe ao contexto epidemiológico atual, se refere ao tratamento da esporotricose, que usualmente requer um longo período de administração de itraconazol (ITZ), iodeto de potássio ou anfotericina B em casos mais graves (GREMIÃO *et al.*, 2021). Para as formas cutâneas, o ITZ é considerado o fármaco de escolha, atingindo em torno de 90 a 100% de sucesso em humanos, porém é um tratamento prolongado com altos custos associados (BARROS *et al.*, 2011b; GREMIÃO *et al.*, 2011; GREMIÃO *et al.*, 2021). Além disso, a taxa de recuperação da esporotricose felina, usando ITZ, é baixa, cerca de 40%, e está frequentemente associada a altas taxas de efeitos adversos (PEREIRA *et al.*, 2010; GREMIÃO *et al.*, 2011). Tendo em vista a limitação de opções terapêuticas para esporotricose, associada a longa duração, alto custo e alta taxa de efeitos colaterais do tratamento de eleição atual, principalmente em gatos, e considerando que o correto tratamento é indispensável para controle da disseminação do fungo, torna-se de extrema importância o estudo de novos compostos com potencial antifúngico para tal enfermidade.

Na busca por novas alternativas terapêuticas, uma variedade de compostos derivados do selênio, elemento essencial para células de mamíferos, vêm sendo considerados por suas atividades biológicas (NOGUEIRA *et al.*, 2004). Atualmente, uma extensa literatura sustenta as propriedades farmacológicas e toxicológicas do disseleneto de difenila [(PhSe)₂], um organosselênio, altamente lipofílico, simples e estável (NOGUEIRA *et al.*, 2004; NOGUEIRA & ROCHA, 2010). O (PhSe)₂ deposita-se em diferentes tecidos, como rins, fígado, cérebro e pulmões, promovendo ações farmacológicas tais como proteção frente a lesões hepáticas e gástricas, além de ação neuroprotetora, antioxidante e anti-inflamatória. Em adição a essas características farmacológicas instigantes, esse composto apresenta em ensaios *in vitro* e *in vivo* atividade antimicrobiana promissora frente a vírus, bactérias e fungos, inclusive *S. brasiliensis* (GHISLENI *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2006; SAVEGNAGO *et al.*, 2007, 2008; PRIGOL *et al.*, 2009; LORETO *et al.*, 2011, 2012; PRIGOL *et al.*, 2012; SARTORI *et al.*, 2016, 2017; POESTER *et al.*, 2018b)

Além disso, Prigol *et al.*, (2012) evidenciam que modelos biológicos tratados com (PhSe)₂ depositam grande quantidade do composto ou alguns de seus metabólitos no tecido adiposo, bem como em fígado e rins. Tal descrição torna a molécula, mais uma vez, promissora no tratamento da esporotricose, cuja manifestação clínica principal é a forma subcutânea, e cujo

tratamento antifúngico tende a ser hepatotóxico. Somado a isto, Doleski *et al.*, (2017) descrevem que o tratamento com (PhSe)₂ em camundongos cronicamente infectados por *Toxoplasma gondii* foi capaz de reverter a inflamação hepática possivelmente devido à modulação de enzimas purinérgicas, que produzem um perfil anti-inflamatório através do sistema purinérgico no fígado. E, conforme descrito por Loreto *et al.*, (2011), o (PhSe)₂ tem atividade pró-oxidante nos fungos reduzindo assim a capacidade de defesa das células fúngicas contra o meio e contra outros antifúngicos. Em adição, já foi reportada a atividade *in vitro* antifúngica do composto (PhSe)₂ e sua ação sinérgica com o ITZ frente a um número alto de isolados de *S. brasiliensis* (n=40) (POESTER *et al.*, 2018b), instigando a realização de estudos *in vivo* utilizando o (PhSe)₂ para o tratamento da esporotricose experimental.

Sendo assim, considerando a atual situação epidemiológica da esporotricose zoonótica no Brasil, somado a necessidade de novas opções terapêuticas para esta doença e frente aos promissores resultados *in vitro* do (PhSe)₂ contra a espécie zoonótica *S. brasiliensis* justifica-se a necessidade de avaliar o potencial terapêutico do (PhSe)₂, de forma isolada ou adjuvante ao tratamento de eleição, em modelo murino, frente a essa enfermidade. Ressalta-se também, que a investigação do real número de casos de esporotricose felina é vital em áreas hiperendêmicas a nível estadual e nacional, assim, considerando a alta incidência de esporotricose zoonótica no sul do RS, é necessária e urgente a investigação da ocorrência de casos no restante do estado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve Histórico e Epidemiologia da Esporotricose

A primeira descrição de um caso clínico relacionado a esporotricose ocorreu em 1898 por Benjamin Robinson Schenck, nos Estados Unidos (EUA), o fungo foi isolado a partir das lesões de um paciente de 36 anos, que apresentava abscesso no dedo indicador e linfangite. Inicialmente, o agente foi identificado como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. O segundo relato ocorreu em 1900, a partir da lesão no dedo de um menino, nesse momento Hektoen & Perkins identificaram o microrganismo como sendo o mesmo descrito por Schenck (1898) e o denominaram *Sporothrix schenckii*, um novo patógeno fúngico (HEKTOEN & PERKINS, 1900). No entanto, o fungo foi classificado no gênero *Sporotrichum*, o qual compreende fungos basidiomicetos que não são dimórficos e nem patogênicos para humanos e outros mamíferos (SHELL, 1999). Em 1962, Carmichael avaliou uma discrepância entre a conidiogênese de espécies do gênero *Sporotrichum* e de isolados oriundos dos casos de esporotricose. Assim, manteve-se o nome do fungo como *Sporothrix schenckii*, mas ele foi reclassificado na divisão Ascomycota, classe Pirenomicetos, ordem Ophistomatales, a qual abrange diversos nichos ecológicos fúngicos (GUARRO *et al.*, 1999).

No decorrer do século XX, casos e surtos esporádicos de esporotricose humana e animal foram relatados nos Estados Unidos, Europa, África, Ásia e América Latina (DE BEURMANN & GOUGEROT, 1909; GHOSH, 1932; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1988; DÍAZ, 1989; WU, 1991). Historicamente, a via clássica de transmissão ocorre através da inoculação traumática do agente etiológico durante o manuseio de plantas e matéria orgânica. Devido a isto, durante anos, a esporotricose foi considerada uma doença ocupacional, conhecida por “doença do jardineiro”, associada a ocorrência da maioria dos casos a homens adultos de profissões que necessitavam de contato frequente com solo e/ou plantas (jardineiros, floristas, agricultores, etc.) (DONADEL *et al.*, 1993; CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

No âmbito mundial, a esporotricose não é de notificação compulsória e por isso sua prevalência exata é desconhecida. Apesar disso, no decorrer dos anos, casos da doença vêm sendo reportados na literatura científica, especialmente em territórios como EUA, América do Sul, Europa, Ásia (China, Índia e Japão), Austrália e África (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). A esporotricose é considerada endêmica em regiões da Ásia e México, associada a infecção ambiental (BONIFAZ *et al.*, 2013a). A Europa apresenta casos esporádicos e pontuais, também relacionados à sapronose. Já no continente africano, surtos de caráter ocupacional esporádicos

via transmissão sapronótica em humanos são reportados, como os casos recorrentes em mineiros na região da África do Sul, além de casos esporádicos de infecção em animais (DALIS *et al.*, 2014; GOVENDER *et al.*, 2015).

Desde os primeiros relatos da esporotricose, mais de um século se passou e apenas a partir de 2007, com o advento da biologia molecular, foi demonstrado que a única espécie associada aos casos clínicos (*S. schenckii*) tratava-se na verdade de um complexo, com aproximadamente 53 espécies, sendo as espécies *S. schenckii* stricto sensu, *S. brasiliensis* e *S. globosa* principais componentes do clado clínico, pois são as mais frequentemente associadas aos casos de esporotricose (MARIMON *et al.*, 2006; 2007; DE BEER *et al.*, 2016; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2021). Em se tratando do clado clínico, enquanto *S. schenckii* e *S. globosa* possuem distribuição mundial, apesar da predominância dessa última espécie em casos na Ásia, *S. brasiliensis* é geograficamente restrita a América do Sul (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2021). *S. brasiliensis* é altamente virulento para o hospedeiro vertebrado de sangue quente, e está relacionado na sua maioria a transmissão zoonótica. *S. schenckii* e *S. globosa* são espécies associadas principalmente a via clássica de transmissão (ambiental) (FERNANDES *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2016; 2022). No clado ambiental, *S. chilensis*, *S. humicola*, *S. mexicana* e *S. pallida* são patógenos ocasionais com potencial levemente patogênico para mamíferos (RODRIGUES *et al.*, 2022).

Interessantemente, a casuística na maioria das áreas é relacionada a predominância de uma única espécie fúngica, na Ásia, 99,3% dos casos estão associados a *S. globosa*, e na Austrália e África do Sul, 94% associados a *S. schenckii*. Além disso, alguns países asiáticos descrevem o *S. schenckii* como agente causal da esporotricose felina (SIEW, 2017; DUANGKAEW *et al.*, 2019). A incidência de esporotricose nos países latino-americanos é variável, com áreas endêmicas identificadas no Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, México e Uruguai (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2001; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; CHAKRABARTI *et al.*, 2015; CABEZA *et al.*, 2022). No oeste da América do Sul, na América Central e do Norte, 89% dos casos estão associados a *S. schenckii* enquanto no sul da América do Sul, principalmente no Brasil, mais de 90% estão vinculados a espécie *S. brasiliensis* e predominam áreas de surtos de esporotricose felina (OLIVEIRA *et al.*, 2011; SANCHOTENE *et al.*, 2015; BRANDOLT *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Casos de esporotricose zoonótica já foram reportados, nos EUA, Índia, México, Peru, Maláisa, Panamá e Argentina (BOVE-SEVILLA *et al.*, 2008; REES *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015; RAMÍREZ-SOTO *et al.*, 2018; RIOS *et al.*, 2018; ETCHECOPAZ *et al.*, 2020;

GREMIÃO *et al.*, 2021). Na Malásia, os casos estão associados a espécie *S. schenckii* sensu stricto, onde estudos já identificaram a ocorrência de uma reprodução clonal da espécie, favorecendo a emergência de um genótipo adaptado ao hospedeiro felino, tal como reportado nos casos de *S. brasiliensis* no Brasil (GREMIÃO *et al.*, 2021).

No Brasil, país de proporções continentais, o primeiro caso de esporotricose foi descrito em humanos e em ratos naturalmente infectados, em 1907 por Lutz & Splendore (LUTZ & SPLENDORE, 1907). A primeira descrição clínica de esporotricose ocorreu na região sudeste do país, no estado do Rio de Janeiro em 1912 (DONADEL *et al.*, 1993; GREMIÃO *et al.*, 2017). Desde então, a esporotricose foi diagnosticada em diferentes regiões e estados brasileiros, bem como em diferentes hospedeiros, como equinos, cães, camundongos, muares, suínos, camelos, chimpanzés, tatus e bovinos (LARSSON *et al.*, 1989; MARQUES *et al.*, 1993).

Já, quanto a esporotricose felina, o primeiro relato ocorreu em caso experimental em 1909 (DE BEURMANN & GOUGEROT, 1909). No entanto, a esporotricose felina naturalmente adquirida foi descrita somente no início dos anos 1950 por Singer e Muncie em Nova Iorque (1952) (SINGER & MUNCIE, 1952). No Brasil, em 1955, Almeida *et al.* (apud LARSSON *et al.*, 1989) sugeriram, pela primeira vez a transmissão zoonótica da esporotricose a partir da arranhadura de um gato e no ano seguinte foi descrito o primeiro caso espontâneo da doença em um gato no país (FREITAS *et al.*, 1956). Larsson *et al.* (1989) descreveram o primeiro caso de transmissão zoonótica, sendo um felino responsável pela transmissão do agente para cinco pessoas.

Somados a literatura científica, novos eventos de esporotricose felina e humana no Brasil foram identificados por MARQUES *et al.* (1993), os quais destacavam que a real frequência e, portanto, a importância epidemiológica da esporotricose felina com consequente transmissão humana, já naquele momento poderia estar subestimada no país. Apesar disso, a esporotricose já apresentava característica de causar surtos locais ou familiares, descrita como casos esparsos, por exemplo no Rio de Janeiro (RJ), 13 casos humanos foram reportados no período de 12 anos (1987 a 1998) (BARROS *et al.*, 2001).

A partir de 1998, a esporotricose no estado do RJ tornou-se um fenômeno urbano hiperendêmico, com associação direta a transmissão zoonótica (BARROS *et al.*, 2004). Apesar da enfermidade ser de distribuição cosmopolita e relacionada a regiões tropicais e subtropicais, o seu perfil epidemiológico no Brasil tornou-se diferente do descrito nas demais regiões do mundo, tipicamente caracterizada a casos isolados ou em pequenos e pontuais surtos. A partir desse momento, no Brasil, a doença assumiu um perfil endêmico a epidêmico, de crescimento

exponencial, tendo majoritariamente o *S. brasiliensis* como agente etiológico, estando sua casuística intimamente relacionada ao gato, agindo como a principal vítima da doença, bem como a principal fonte de infecção para os demais mamíferos e desencadeando sérios problemas de saúde pública (BARROS *et al.*, 2011; POESTER *et al.*, 2018a; GREMIÃO *et al.*, 2020, 2021; POESTER *et al.*, 2021).

Recentemente, relatos de *S. brasiliensis* até então restritos ao território brasileiro foram identificados na Argentina e Paraguai, países vizinhos, alarmando para a expansão desta espécie de alta virulência para outras regiões do mundo, rompendo a fronteira entre os países (CÓRDOBA *et al.*, 2018; ETCHECOPAZ *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2021). Corroborando com alto potencial de dispersão geográfica do *S. brasiliensis*, dada a sua peculiar manifestação nos felinos, em 2022, Rachman *et al.* relatam, no Reino Unido, um caso de esporotricose zoonótica em um médico veterinário após tratar de um gato com esporotricose importada do Brasil.

Curiosamente, Córdoba *et al.* (2018), recuperaram e caracterizaram molecularmente amostras ambientais de *S. brasiliensis* de tocas de tatus na província de Chaco – Argentina, coletados em 2003. Nesse sentido, Rabello *et al.*, (2022) mostraram que o *S. brasiliensis* é capaz de se manter no ambiente por anos e que apesar da ocorrência massiva de casos no Brasil, raramente é isolado do meio ambiente. Sendo assim, destaca-se que a ecoepidemiologia da esporotricose ainda não é bem compreendida e que muito ainda há a ser elucidado a respeito dos determinantes ecológicos relacionadas às espécies patogênicas de *Sporothrix*, mais especificamente as de associação zoonótica (POESTER *et al.*, 2018c; RAMÍREZ-SOTO *et al.*, 2018; RABELLO *et al.*, 2022).

Ao longo do tempo, a esporotricose tornou-se uma das principais infecções fúngicas não apenas em animais, mas também em humanos. As possíveis razões que expliquem essa alteração na cadeia epidemiológica incluem mudanças evolutivas na taxonomia das espécies com adaptação a novos hospedeiros, o que infere na modificação da epidemiologia e distribuição, bem como da ocorrência de surtos da esporotricose (SHARMA *et al.*, 2022). Diante desse perfil, a Organização Mundial da Saúde (OMS) a partir do “*A Road map for neglected tropical diseases 2021 – 2030*”, definiu metas globais e marcos para prevenir, controlar, eliminar ou erradicar 20 grupos de doenças, incluindo a esporotricose como uma das principais doenças na categoria de doenças fúngicas tropicais negligenciadas (DTNs) (WHO, 2020).

2.2 Epidemiologia da Esporotricose no Brasil

Historicamente, no início da casuística zoonótica, entre julho de 1998 a julho de 2000 somente no Centro de Pesquisas e Hospital Evandro Chagas (CPqHEC), no estado do Rio de Janeiro, 66 humanos, 117 gatos e 7 cães foram diagnosticados com esporotricose (BARROS *et al.*, 2001). A alta prevalência de casos na região metropolitana do município do Rio de Janeiro criou um cinturão de esporotricose na região. A partir desse período, o crescimento abrupto no diagnóstico dessa micose se perpetuou e a enfermidade passou a ser relacionada a outro perfil epidemiológico, no qual as pessoas acometidas eram principalmente adultos de baixo nível socioeconômico, na sua maioria mulheres, donas de casa ou estudantes, moradores de área urbana, com difícil acesso a serviços de saúde e com >90% da transmissão associada ao contato direto e frequente com gatos domésticos (BARROS *et al.*, 2004, 2011). A esporotricose passou a ser considerada epidêmica no RJ, registrando mais de 5.000 casos humanos até 2015 e mais de 5.113 casos em felinos até 2018, considerando apenas diagnósticos realizados na Fundação Oswaldo Cruz, indicando que as taxas de incidência são provavelmente ainda maiores (GREMIÃO *et al.*, 2020).

Atualmente, há forte expansão geográfica de casos de esporotricose humana e animal para a região nordeste do Brasil, sendo a ocorrência reportada inicialmente no ano de 2014 e sendo crescente desde então (MARQUES-MELO *et al.*, 2014; GREMIÃO *et al.*, 2021). Até o momento, já somam mais de 1.000 casos confirmados em humanos e 800 em gatos, englobados nos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (GREMIÃO *et al.*, 2021). Não apenas restrito a região Nordeste, atualmente no Brasil apenas três estados (Tocantins, Roraima e Amapá) ainda não reportam casos de esporotricose felina ou humana zoonótica, os demais 23 estados já apresentam descrição de série de casos ou surtos (RODRIGUES *et al.*, 2022). Salienta-se que tanto os casos humanos como principalmente os em gatos são provavelmente subestimados, tendo em vista as deficientes condições sociais e de acesso a serviços de saúde em que a população brasileira está inserida (GREMIÃO *et al.*, 2021).

Outros estados da região Sul e Sudeste, como o Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e São Paulo (SP), reportam concomitantemente ao RJ o crescimento do número de casos nos últimos 21 anos (SANCHOTENE *et al.*, 2015; POESTER, *et al.*, 2018a; GREMIÃO *et al.*, 2020; MUNHOZ *et al.*, 2022). No RS, o primeiro caso de esporotricose felina e zoonótica ocorreu no ano de 1997 no sul do estado, sendo diagnosticados no município de Rio Grande quatro felinos, que viviam com cerca de outros 100 gatos, todos com livre acesso à rua, cuja tutora também foi diagnosticada com a doença (NOBRE *et al.*, 2001). De acordo com Poester,

et al., (2018a) a média de número de casos diagnosticados por ano de esporotricose apenas pelo Laboratório de Micologia – FAMED/FURG, abrangendo os municípios de Pelotas e de Rio Grande, era de 18.33 no período de 2010 a 2012 e passou para 116.33 no período de 2014 a 2016, indicando o potencial epidêmico da enfermidade na região. Somado a isso, foi observado aumento substancial, de mais de 200%, no número de casos suspeitos e diagnosticados após atividades de capacitação de profissionais da saúde única, como médicos, enfermeiros e médicos veterinários, enfatizando que são peças fundamentais para o rastreio e sucesso no diagnóstico da esporotricose humana e animal (POESTER *et al.*, 2021).

De fato, a região sul do RS é tradicionalmente conhecida pela casuística da esporotricose zoonótica, diagnóstico e desenvolvimento de ações para mitigar a problemática desencadeada pela enfermidade (NOBRE *et al.*, 2001; MADRID *et al.*, 2012; SANCHOTENE *et al.*, 2015; BRANDOLT *et al.*, 2018; POESTER *et al.*, 2018a; POESTER *et al.*, 2021). Até 2020, não havia informações concretas com relação a casuística da doença nas demais regiões de saúde do estado. No entanto, em 2021, Spanemberg e colaboradores relataram 21 casos de esporotricose felina em Porto Alegre, ocorridos no período de 2015 a 2019, e, somado a isso, a Prefeitura Municipal de Sapucaia do Sul emitiu um comunicado informando que de agosto de 2020 a junho de 2021 foram registrados 44 casos de esporotricose em felinos e 11 em pessoas na região. Desde então esse município vem realizando campanhas de conscientização junto a Vigilância em Saúde. Concomitantemente, a Prefeitura Municipal de Gravataí alertou a população sobre o aumento de 130% no número de casos de esporotricose humana no período de 2021 com relação a 2020. Mais recentemente, Munhoz *et al.* (2022) relataram um aumento brusco nos casos de esporotricose humana transmitida por gatos na região metropolitana do RS.

Mesmo diante dessa grave situação epidemiológica a nível de saúde pública nacional, o Brasil ainda não incluiu a esporotricose na lista de enfermidades de notificação compulsória. Tal fato, reforça a necessidade de ações de divulgação a respeito da enfermidade a fim de ampliar o conhecimento e permitir o desenvolvimento de ações que possam conter as proporções hiperendêmicas da doença. Apesar das condicionantes ambientais intrínsecas ao *S. brasiliensis* ainda pouco conhecidas, fatores determinantes como, diagnóstico tardio, dificuldade no tratamento e manifestação clínica exacerbada nos gatos, somados às questões socioeconômicas como abandono de animais, eliminação inadequada da carcaça de animais infectados após o óbito e ausência de políticas públicas para a contenção da doença contribuem expressivamente para a dimensão epidêmica e de expansão geográfica dessa enfermidade (POESTER *et al.*, 2018a; ROSSOW *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2021; POESTER *et al.*, 2021). Desta forma, ações de saúde única devem ser estimuladas e constantemente

desenvolvidas para diretamente impactarem no controle e contenção da doença em animais e humanos.

2.3 Agente Etiológico

Originalmente a sistemática e classificação geral dos fungos foi baseada em características fenotípicas, como macro e micromorfologia (MUGGIA *et al.*, 2020). A partir disto, por mais de um século a esporotricose esteve associada a apenas um único agente causal, *S. schenckii*. Atualmente, a esporotricose é reconhecida por ser causada por espécies de fungos pertencentes ao Complexo *Sporothrix*, da Família Ophiostomataceae, Ordem Ophiostomales, Classe Oyrenomycetes, Divisão Ascomyceta e Reino Fungi.

Isto ocorreu a partir do advento da biotecnologia com os estudos desenvolvidos por Marimon *et al.* (2006; 2007), que identificou as espécies de *Sporothrix* e as classificou com base em características fenotípicas e bioquímicas, como macroscopia da colônia, microscopia dos conídios, termotolerância, assimilação de sacarose e rafinose, e características moleculares. Assim, essas análises identificaram a existência de espécies crípticas e, por conseguinte, patogênicas com diferenças de virulência, clínica e epidemiologia, agrupadas em “clado clínico”, abrangendo *S. schenckii* sensu stricto (s.str.), *S. brasiliensis*, *S. globosa*, e *S. luriei*, e as espécies agrupadas no “clado ambiental” como patógenos ocasionais, sendo elas *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. chilensis* e *S. humicola* (MARIMON *et al.*, 2006; 2007; ROMEO *et al.*, 2011; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015; BRILHANTE *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2016; MAKRI *et al.*, 2020).

Sporothrix spp. é caracterizado como um fungo dimórfico capaz de sofrer uma transição morfológica de hifas filamentosas (bolor) a temperatura ambiente (25°C) para forma unicelular parasitária (levedura) no tecido do hospedeiro a 37°C. Com isso, podem ser encontrados principalmente em solos com abundância de putrefação, onde vive como saprófito, decompondo húmus e matéria orgânica, sem estabelecer simbiose com nenhum organismo vegetal, sendo caracterizado como um fungo geofílico (BARROS *et al.*, 2011), com ressalva em se tratando do contexto em que a espécie *S. brasiliensis* está inserida.

A forma micelial, na microscopia, apresenta micélios com hifas delgadas, septadas, delicadamente ramificadas, com aglomerados de conídios na extremidade de conidióforos, em forma de margarida ou crisântemo (LARSSON, 2011), conforme demonstrado na figura 1A e 2A. Já, a forma leveduriforme, obtida por cultivo fúngico em meios ricos (ágar-infusão cérebro-coração/BHI) a 37 °C, apresenta aspecto cremoso e de coloração bege na macroscopia (figura

1B), e na microscopia os blastoconídios são ovalados, alongados (“charuto”) ou arredondados conforme demonstrado na figura 2B (BARROS *et al.*, 2011a).

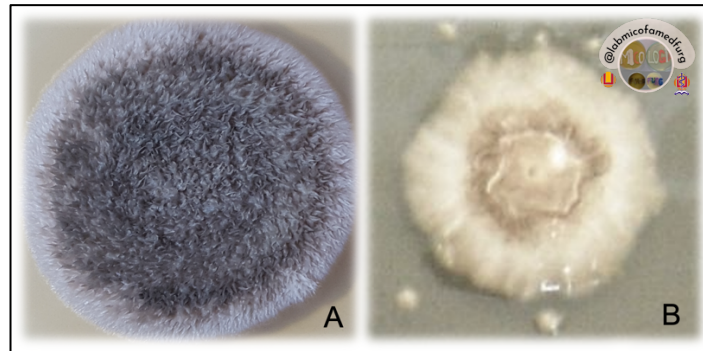


Figura 1. Macromorfologia de *S. brasiliensis*. A. Na fase filamentosa em ágar Sabouraud a 25°C. B. Na fase leveduriforme em ágar BHI a 37°C.

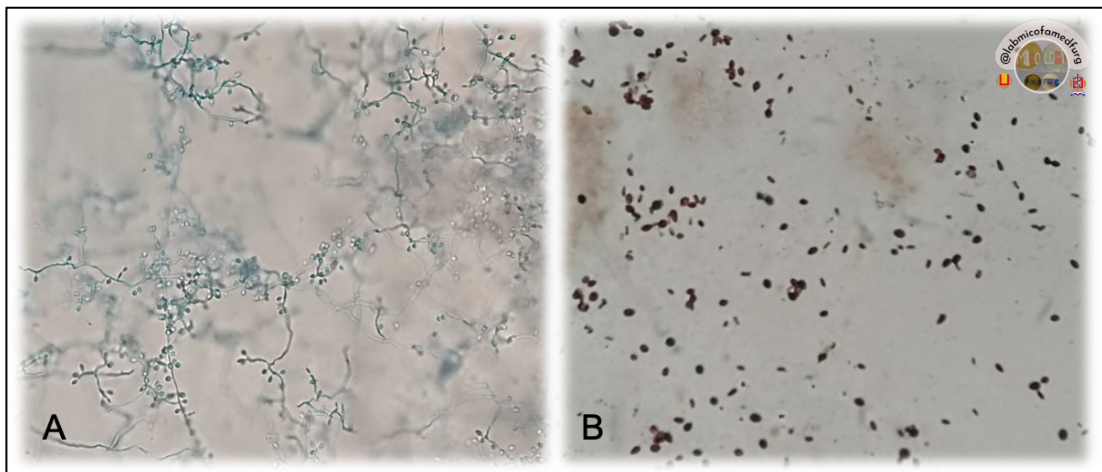


Figura 2. Microscopia de *Sporothrix* spp (aumento x40). Visualização com azul de lactofenol na forma filamentosa a 25°C. B: Visualização na forma leveduriforme a 37°C a partir da coloração de Grocott-gomori.

2.4 Fisiopatogenia da Esporotricose e Fatores de Virulência de *Sporothrix* spp.

A patogenicidade define-se pela capacidade de um microrganismo infectar o hospedeiro e causar doença. A patogenicidade de um fungo depende da sua capacidade de adaptação às condições ambientais e de resistência frente às defesas do hospedeiro. Os determinantes fúngicos da patogenicidade são chamados de fatores de virulência. Sendo assim, a virulência é referida como a capacidade relativa do microrganismo de causar maior ou menor dano ao hospedeiro (CASADEVALL, 2007). Embora a virulência seja uma característica inerente do microrganismo, ela pode ser determinada por múltiplas interações entre o microrganismo e o hospedeiro (CASADEVALL & PIROFSKI, 2003). Os fatores de virulência podem ser produtos

diretos da expressão gênica (proteínas) ou produtos derivados de caminhos biossintéticos complexos, como por exemplo, polissacarídeos e mediadores lipídicos. A importância dos fatores de virulência é determinada a partir da verificação da resposta biológica de fungos na presença e ausência dos mesmos. Os microrganismos patogênicos possuem uma série de fatores e mecanismos de virulência, os quais possibilitam a sobrevivência e o escape frente ao sistema imune do hospedeiro, permitindo a persistência nesse habitat e resultando em danos teciduais e doença. Para fungos de forma geral, os principais fatores de virulência incluem produção de adesinas e proteases, e termotolerância a 37°C, os quais são de extrema importância para a sobrevivência e disseminação no hospedeiro e entre hospedeiros (IYALLA, 2017).

Além disso, o dimorfismo do gênero *Sporothrix* é um dos principais fatores envolvidos na evasão ao sistema imune, sendo influenciado por outros fatores físicos-químicos além da temperatura, tais como: aeração, pH, fontes de carbono e tensão de CO₂ (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006). Além do dimorfismo, alguns fatores de virulência comumente associados à patogênese do gênero *Sporothrix* são: produção de adesinas, enzimas extracelulares e melanina, termotolerância, presença de ácido siálico e composição de parede celular (BARROS *et al.*, 2011a).

Diferenças na composição da parede celular estão associadas a variações na virulência, e as formas filamentosa e leveduriforme possuem diferenças em sua composição, sendo principalmente formadas por glucanas com revestimento externo formado principalmente por glicoconjugado peptídeo-ramnomanana, ocasionando diferenças na interação com as células do hospedeiro, e por conseguinte deflagrando diferentes respostas imunes (BARROS *et al.*, 2011a). Nesse sentido, a adesão de microrganismos patogênicos aos tecidos hospedeiros é considerada como o primeiro e maior passo na colonização e disseminação tendo papel crítico e fundamental durante a infecção (JIMENEZ-LUCHO *et al.*, 1990; VARTIVARIAN, 1992). Uma das adesinas bem caracterizada em *Sporothrix* spp. é a glicoproteína de 70kDa (gp70) (ALBA-FIERRO *et al.*, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Esta glicoproteína está localizada na superfície de isolados de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, sendo capaz de mediar a interação do fungo à fibronectina presente na célula hospedeira (CASTRO *et al.*, 2013). No entanto, análises de expressão da gp70 mostraram que ela é pouco expressa na superfície das leveduras de *S. brasiliensis*, sugerindo que a quantidade de gp70 na superfície celular deste patógeno possa ter relação com diferentes padrões de virulência entre as cepas, justificando assim um desequilíbrio observado em estudos de resposta imune protetora induzida por esse antígeno (TEIXEIRA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2013; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015b). Nessa linha, a diferença de frequência e a diversidade de proteínas imunorreativas na esporotricose estão descritas entre

as espécies de importância clínica, inclusive *S. brasiliensis*, identificando moléculas imunodominantes na fração de 100-kDa e oscilação entre 60 e 70-kDa (gp 60 – 70) (DELLA TERRA *et al.*, 2017).

A termotolerância, outro importante fator de virulência de *Sporothrix* spp., difere entre as espécies, cepas ambientais de *Sporothrix* podem não se adaptar a temperatura do corpo do hospedeiro e, portanto, tendem a não poder produzir infecção (CARLOS *et al.*, 2015). A espécie clínica que apresenta maior termotolerância é *S. brasiliensis*, em comparação com *S. schenckii* e *S. globosa*. Esse fator é acentuado em isolados oriundos de gatos, assim levanta-se a hipótese de que este tenha sido o principal fator associado a adaptação dessa espécie fúngica aos felinos, considerando que estes animais possuem temperatura corporal mais elevada, variando entre 38 e 39,2°C (RODRIGUES *et al.*, 2013).

A produção de melanina também tem sido relacionada à virulência de vários fungos patogênicos. Em *Sporothrix* spp., a melanina protege os conídios de danos oxidativos por radicais livres, radiação UV e confere alta resistência à fagocitose e à danos ocasionados pelos macrófagos e neutrófilos (ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000; CASADEVALL, 2007; CARNERO *et al.*, 2018). As células leveduriformes também produzem pigmentos semelhantes à melanina *in vivo*, sendo sua presença envolvida na virulência e na redução da ação antifúngica à fármacos, como anfotericina B e terbinafina (MORRIS-JONES *et al.*, 2003; MADRID *et al.*, 2011; MARIO *et al.*, 2015; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2016). Com relação a *S. brasiliensis*, há maior expressão de melanina se comparado a *S. schenckii*, associando mais uma vez a sua maior virulência (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015b).

Todos os fatores mencionados anteriormente são necessários para a virulência do *Sporothrix* spp. e também são usados para evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, muitos desses fenótipos podem estar associados as manifestações clínicas da esporotricose (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015). O conhecimento desses fatores possibilita entender as diferenças de virulência que existem entre as espécies de *Sporothrix*. Rossato *et al.*, (2018) avaliaram a virulência de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* em termos de proteínas expressas e verificaram que *S. brasiliensis* expressa diferencialmente à *S. schenckii* 60 proteínas. Dentre essas, 9 são relatadas na literatura como importantes na virulência e escape imunológico de outros fungos de relevância médica tais como *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*.

Validando esses resultados de características de virulência elevadas de *S. brasiliensis*, estudos de esporotricose experimental utilizando modelo murino, demonstraram que *S.*

brasiliensis foi a espécie mais virulenta tanto na manifestação subcutânea como na disseminada, no que tange à mortalidade e ao dano tecidual, seguido por *S. schenckii* e *S. globosa* (ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009; DELLA TERRA *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2013). De fato, Arrillaga-Moncrieff *et al.* (2009) descreveram que 100% de camundongos inoculados com *S. brasiliensis* foram a óbito em até 40 dias após a infecção. Da mesma forma, Mario e colaboradores (2015) e Ishida *et al.* (2015) mostraram que a infecção intravenosa com *S. brasiliensis* (2×10^7 UFC/mL), na ausência de qualquer tratamento, acarretou o óbito dos camundongos entre 14 e 26 dias após a infecção.

Com intuito de auxiliar no entendimento da doença e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas Della Terra *et al.* (2017) determinaram um padrão de inoculação subcutânea para o desenvolvimento de esporotricose experimental em modelo murino. No estudo, foram avaliados mais de 10 isolados de *S. brasiliensis* e foi indicado que a virulência de cada isolado pode ser determinada a partir da observação do poder de disseminação aos órgãos internos, do desenvolvimento da doença, associado a perda de peso progressiva dos animais, e da indução a mortalidade. Além disso, é importante considerar que há ocorrência de pelo menos dois genótipos distintos de *S. brasiliensis* na epidemia de esporotricose no Brasil, sendo o genótipo circulante do RS diferente do RJ (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Somado aos fatores intrínsecos do fungo, a resposta imunológica do hospedeiro também é essencial na progressão da esporotricose (MAIA *et al.*, 2006; CARLOS *et al.*, 2009). Os mecanismos imunológicos de defesa contra o *Sporothrix* spp. ainda não estão completamente elucidados, sendo ainda uma grande incógnita o porquê de os felinos frequentemente apresentarem manifestações clínicas severas frente a *S. brasiliensis*, com alta carga fúngica em suas lesões (GREMIÃO *et al.*, 2021). De forma geral o sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, apresentando rápida ativação. Em contraste, a imunidade adquirida, que é mediada pelos linfócitos T e B, requer de 7 a 10 dias para começo de resposta (ALMEIDA *et al.*, 2015). Carlos e colaboradores sugerem que há participação da resposta imune humoral no caso da esporotricose apenas em estágios mais avançados da doença (MAIA *et al.*, 2006; CARLOS *et al.*, 2009).

Na infecção por *Sporothrix* spp., a imunidade inata representa a defesa inicial do hospedeiro, e células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas atuam reconhecendo e fagocitando o fungo. Essas células fagocitam o fungo a partir do reconhecimento à receptores presentes na superfície (galactomanana e raminomanana) das células fúngicas. Os neutrófilos são capazes de destruir o fungo logo após a invasão no tecido do hospedeiro, através da

fagocitose e de liberação de espécies reativas de oxigênio, independente de linfócitos T. (KAJIWARA *et al.*, 2004).

As células dendríticas reconhecem a partir dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), localizados na superfície nessas células imunes, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos na superfície do fungo. Esse reconhecimento desencadeia uma série de reações, como a fagocitose do fungo e ativação secundária da imunidade adquirida (BUZÁS *et al.*, 2006). Somente algumas características dos PAMPs de *Sporothrix* spp. são conhecidas atualmente, sendo os lipídios da parede celular, componentes da patogênese do fungo, que inibem o processo de fagocitose e aumentam o estímulo para liberação de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (CARLOS *et al.*, 2003; CARNERO *et al.*, 2018).

As células apresentadoras de antígeno (APCs) (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) possuem papel fundamental na ativação da resposta imune adquirida. A apresentação do antígeno ocorre através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II localizado nas células imunes que primam linfócitos TCD8+ e TCD4+, respectivamente (WUTHRICH *et al.*, 2012). Após a ativação, células TCD4+ se diferenciam em linfócitos T helper e linfócitos regulatórios com produção de diferentes citocinas, as quais desencadeiam diferentes respostas (WUTHRICH *et al.*, 2012). Uma das funções das citocinas é auxiliar no desenvolvimento do granuloma, que é um componente essencial na defesa do hospedeiro contra o fungo (TACHIBANA *et al.*, 1999; UENOTSUCHI *et al.*, 2006). Para a formação do granuloma, há atuação conjunta de membros tanto da imunidade inata quanto adquirida, sendo primordial a ação de linfócitos TCD4+, macrófagos, e da citocina interferon- γ (IFN- γ) (TACHIBANA *et al.*, 1999).

Outros estudos apontaram a importância de receptores do tipo toll (TLR4) no reconhecimento de antígenos de *Sporothrix*, para indução de resposta danosa a partir da secreção de espécies reativas de oxigênio contra o fungo (CARLOS *et al.*, 2009; SASSÁ *et al.*, 2012). O TLR4 é o principal receptor no reconhecimento de *Sporothrix* spp. na forma cutânea localizada da doença, sendo capaz de induzir uma resposta Th1, com a produção de citocinas pró-inflamatórias (UENOTSUCHI *et al.*, 2006). Os receptores de manose também desempenham papel no reconhecimento do *S. schenckii* promovendo uma resposta Th1 no decorrer da doença (GUZMAN-BELTRAN *et al.*, 2012).

Corroborando com o que vem sendo abordado, diferentes estudos experimentais apontam uma interação entre a imunidade inata e adquirida no combate ao *Sporothrix* spp. No estudo proposto por Negrini *et al.*, (2013) os resultados sugerem que a ausência de receptores toll like

2 (TLR2) leva a uma redução significativa na fagocitose, frente a *S. schenckii*. Já pacientes com deficiência na imunidade adquirida apresentam formas mais graves da doença; e um estudo experimental demonstrou que a transferência de timócitos para camundongos atímicos tornou-os resistentes a esporotricose, inferindo que a ausência de uma resposta imune adaptativa aumenta a mortalidade na esporotricose experimental (PLOUFFE JR. *et al.*, 1979; DICKERSON *et al.*, 1983; KAJIWARA *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2015).

Outra linha de defesa do hospedeiro é a resposta imune humoral a partir da produção de anticorpos, em modelo murino foi evidenciada a produção de tipos específicos de IgG (IgG1 e IgG3) contra a gp70 de *Sporothrix* spp. (NASCIMENTO & ALMEIDA, 2005) sugerindo que anticorpos específicos podem participar do controle da esporotricose. Em humanos, anticorpos IgG, IgM e IgA são produzidos durante a infecção por *Sporothrix* spp., sendo seus níveis associados com a manifestação clínica da doença e decrescendo durante o tratamento antifúngico (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007).

De fato, os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle desta micose não estão totalmente compreendidos (CARNERO *et al.*, 2018) porém ao longo dos últimos anos, progresso significativo vem sendo descrito, demonstrando que as respostas imunes inata e adaptativa são importantes para alcançar um estado de proteção do hospedeiro frente as espécies patogênicas de *Sporothrix*.

2.5 Aspectos Clínicos

2.5.1 Aspectos clínicos em humanos

A transmissão ao homem das espécies patogênicas de *Sporothrix*, com exceção do *S. brasiliensis*, ocorre mais comumente por inoculação traumática de fungos encontrados em matéria orgânica vegetal. Até o momento essa via de transmissão não foi claramente documentada para a espécie *S. brasiliensis* (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). O *S. brasiliensis* está relacionado aos casos de transmissão zoonótica e animal-animal, principalmente gato-gato (RODRIGUES *et al.*, 2013; GREMIÃO *et al.*, 2017). Os gatos desempenham papel fundamental como fonte de infecção, devido à alta carga fúngica presente em suas lesões, grande circulação em áreas peri e intradomiciliares e proximidade com humanos (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018; POESTER *et al.*, 2018a; GREMIÃO *et al.*, 2021).

Os casos de infecção humana associados a *S. brasiliensis* são reportados por inoculação traumática devido a arranhões e/ou mordida principalmente a partir de gatos doentes (MARIMON *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2010; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018). A via de

transmissão não traumática pode incluir o contato direto com lesões secretivas de esporotricose felina, exposição de mucosas à gotículas infectantes, inalação do fungo na forma filamentosa ou, potencialmente, leveduriforme/parasitária, sendo esta forma inalatória rara (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Ao contrário dos outros fungos dimórficos, que somente causam infecção quando transmitidos na forma micelial, o *S. brasiliensis* é o único com habilidade de transmissão também na fase leveduriforme, sendo um fator determinante na transmissão entre mamíferos (MARIMON *et al.*, 2007; ETCHECOPAZ *et al.*, 2020). Nesse contexto zoonótico, pessoas mais vulneráveis à infecção por *S. brasiliensis* são aquelas que apresentam contato próximo e frequentes com gatos infectados, desde tutores à técnicos e médicos veterinários (GREMIÃO *et al.*, 2014).

Diversos fatores estão associados aos diferentes desfechos da esporotricose, tais como quantidade de inóculo inicial, status da resposta imune do hospedeiro, profundidade da inoculação e virulência fúngica inerente aos isolados (CARLOS *et al.*, 2009). Em humanos, predominantemente a micose por *Sporothrix* spp. manifesta-se por lesões cutâneas fixas ou linfocutâneas (figura 3), com padrão de nódulos, pápulas ou úlceras (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014; ROSSOW *et al.*, 2020). As lesões surgem no local do trauma inicial após poucos dias ou várias semanas da inoculação do agente (BARROS *et al.*, 2011a). As lesões cutâneas podem ser fixas (figura 3A e 3B) ou ascender via trajeto linfático (figura 3C), resultando em nódulos e abscessos morfológicamente encordoados, levando ao clássico sinal dermatológico do “rosário esporotricótico” (figura 3D) (RIPPON, *et al.*, 1988). Lesões linfocutâneas representam de 75 a 90% dos casos de esporotricose humana. A ocorrência de formas mais graves, disseminada ou extracutânea, ocorre em menos de 10% dos casos e muitas vezes está associada a indivíduos imunodeprimidos (BONIFAZ & VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, 2010; 2013; POESTER *et al.*, 2020).

Os sítios de lesão mais comuns em adultos são extremidades corporais superior e inferior, e em crianças face e pescoço, associados ao local de inoculação primária. Em regiões hiperendêmicas da esporotricose por *S. brasiliensis*, se observa maior variabilidade de sintomatologia clínica, como a apresentação na forma ocular e/ou acometimento de outras mucosas (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014; YAMAGATA *et al.*, 2017; LEMES *et al.*, 2021) especialmente em crianças (RIBEIRO *et al.*, 2020; LEMES *et al.*, 2021). De fato, atualmente já é documentada em adultos e em crianças a ocorrência da síndrome oculoglandular de Parinaud's desencadeada pela esporotricose zoonótica, condição clínica caracterizada por conjuntivite granulomatosa unilateral, acompanhada de linfadenopatia satélite pré-auricular e submandibular (YAMAGATA *et al.*, 2017; BRANDOLT *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2020;

LEMES *et al.*, 2021). As lesões da esporotricose em humanos, de forma geral são restritas a mucosas e tecido subcutâneo, e se não tratadas, na maioria dos casos evoluem para um curso crônico, ou, em menor frequência, para a involução espontânea (BARROS *et al.*, 2011b).



Figura 3. Manifestação clínica em humanos da esporotricose causada por *S. brasiliensis*. A: Lesão cutânea nodular com pequena fistula; B: Lesão cutânea ulcerada; C: Lesões crostosas linfocutâneas; D: Lesão linfocutânea ascendente.

2.5.2 Aspectos clínicos nos animais

A esporotricose causada por *Sporothrix* spp. pode acometer diversas espécies de animais, porém os gatos domésticos representam a peça-chave dos casos associados a hiperendemia de *S. brasiliensis* no Brasil, atuando como principal fonte de infecção, tendo em vista a predisposição a uma sintomatologia mais severa da doença e lesões com alta carga de propágulos fúngicos, viabilizando a disseminação a partir de arranhões e mordidas a outros animais e humanos (BARROS *et al.*, 2011a; GREMIÃO *et al.*, 2017; POESTER *et al.*, 2018a).

Em outros animais, a esporotricose manifesta-se em sua maioria de forma pontual e muitas vezes auto-limitante (SCHUBACH *et al.*, 2008). Os cães, por exemplo, apesar dos levantamentos epidemiológicos indicarem um número considerável de acometimento desses animais, principalmente em regiões hiperendêmicas, não são associados a casos graves e como fonte de infecção de *S. brasiliensis* para humanos (BARROS *et al.*, 2010; MADRID *et al.*, 2012; GREMIÃO *et al.*, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2018). Apenas um caso de transmissão cão-homem foi reportado no Brasil, sendo provavelmente um caso isolado, porque de fato, nas lesões de cães são escassas as células fúngicas, inferindo provavelmente na baixa taxa de transmissão, que é claramente avaliada em áreas hiperendêmicas, onde apenas o gato doméstico

apresenta importância central como transmissor (SCHUBACH *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2017; GREMIÃO *et al.*, 2021).

Já na esporotricose felina há um amplo espectro de manifestações clínicas, desde formas subclínica e locais até manifestações com múltiplas lesões cutâneas disseminadas e forma sistêmica, com acometimento de órgãos internos, inclusive acarretando o óbito do animal se não tratada a doença (SCHUBACH *et al.*, 2004; GREMIÃO *et al.*, 2014). O período de incubação, a partir da infecção por *Sporothrix* spp. até os primeiros sinais clínicos é variável, a média é de 14 dias, mas pode se estender por meses, similar ao observado em humanos (GREMIÃO *et al.*, 2021). Há maior ocorrência da doença em gatos adultos, machos, sem raça definida e não castrados, relacionando ao caráter de territorialismo disputado entre os felinos domésticos e o livre acesso à rua (SANCHOTENE *et al.*, 2015; LECCA *et al.*, 2020; ANDRADE *et al.*, 2021). Embora seja descrita a presença do fungo nas garras de felinos sadios que coabitam com animais enfermos, a transmissão do agente se dá por gatos doentes (BARROS *et al.*, 2004; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018).

Diferentemente de outros hospedeiros e da doença ocasionada por espécies de *Sporothrix* ambientais, as manifestações clínicas mais frequentes ocasionadas por *S. brasiliensis* em gatos são formas severas, com lesões inicialmente isoladas que disseminam para outros sítios anatômicos, tornando-se múltiplas, e para órgãos internos (sistêmica). Predominam nos membros e região cefálica (figura 4), envolvendo a mucosa, especialmente a do trato respiratório, mas também oral, conjuntival e genital (BARROS *et al.*, 2004; GREMIÃO *et al.*, 2014; BOECHAT *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2018; GREMIÃO *et al.*, 2021). Clinicamente, as lesões no tecido epitelial são caracterizadas por nódulos e úlceras, encontradas em mais de um sítio anatômico não contínuo, com frequente acometimento linfático (BARROS *et al.*, 2004; GREMIÃO *et al.*, 2014; SANCHOTENE *et al.*, 2015; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018; MASCHIO-LIMA *et al.*, 2021).

Sinais extracutâneos, como sinais respiratórios (espirros, dispneia e descarga nasal) podem ser observados com frequência (GREMIÃO *et al.*, 2014). Alguns autores sugerem que a infecção em felinos pode ocorrer por via inalatória, o que explicaria a alta frequência de sinais respiratórios e lesões de mucosa nasal, bem como o isolamento fúngico da cavidade nasal (SCHUBACH *et al.*, 2004), pulmões (SCHUBACH *et al.*, 2003) e lavados broncoalveolares (LEME *et al.*, 2007). A ocorrência de sinais respiratórios pode preceder ao aparecimento de lesões cutâneas ou pode ser observado em gatos sem lesão cutânea (SCHUBACH *et al.*, 2004).

A disseminação de *S. brasiliensis* ocorre por via hematogena, e deve ser considerada quando o gato apresenta histórico de letargia, depressão, anorexia, febre, e/ou esporotricose não

responsiva ao tratamento antifúngico (MIRANDA *et al.*, 2016; GREMIÃO *et al.*, 2021). Nesse sentido, ressalta-se a alta taxa de óbito em animais com acometimento sistêmico. Poester *et al.* (2018a), relataram que de 153 gatos com esporotricose acompanhados, 35% morreram, sendo que em 75% das mortes os animais apresentavam a forma disseminada da doença. De fato, a gravidade da doença independe da condição de saúde do animal no momento da infecção e não está associada à infecções pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou vírus da leucemia felina (FeLV), por exemplo (PEREIRA *et al.*, 2010; GREMIÃO *et al.*, 2015; DE SOUZA *et al.*, 2018). Até o momento, não se sabe com clareza os fatores que tornam os gatos altamente suscetíveis a infecção pelo *S. brasiliensis* (GREMIÃO *et al.*, 2021).

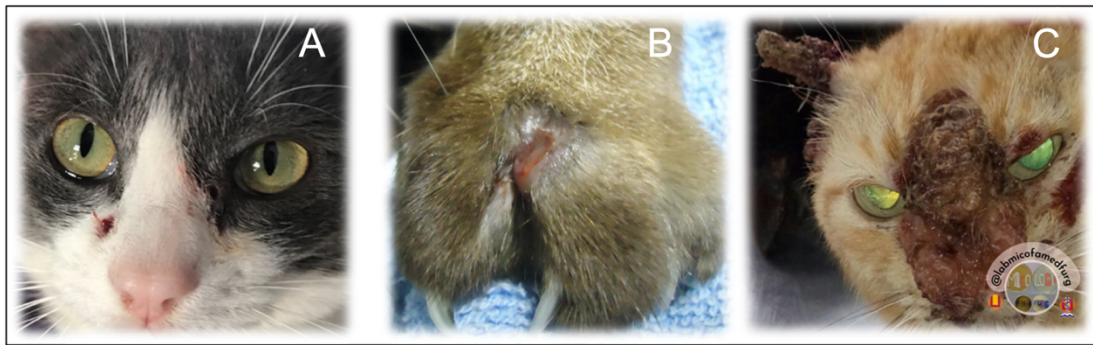


Figura 4. Manifestação clínica da esporotricose em gatos desencadeada pela espécie *S. brasiliensis*. A: Discreta lesão cutânea na face; B: Lesão interdigital ulcerada; C: Lesões extensas e invasivas na região cefálica. Fonte: Disponibilizado por médicos veterinários cadastrados no projeto de diagnóstico de esporotricose do Laboratório de Micologia – FAMED/FURG

2.6 Diagnóstico

Diferentes manifestações clínicas, agentes etiológicos e distribuição mundial permitiram o desenvolvimento de pesquisas visando novas abordagens diagnósticas, sendo assim é proposto que o diagnóstico da esporotricose, de forma geral, pode ser realizado por cultivo micológico, exame direto, imunodiagnóstico, exame histológico, citopatológico, ensaios moleculares, abordagens proteômicas, entre outros (ROSSOW *et al.*, 2020). Algumas dessas abordagens são propostas apenas a nível de pesquisa, não estando incorporadas ainda nas técnicas diagnósticas. Para a escolha ou associação entre métodos de diagnóstico, cada técnica possui seus fatores individuais relacionados a custo, acessibilidade, sensibilidade, especificidade e entre outros tópicos, que devem ser considerados conforme a realidade de cada região (CHAKRABARTI *et al.*, 2015), principalmente no caso do Brasil, país com dimensões continentais.

O diagnóstico presuntivo da esporotricose pode ser realizado a partir da associação dos aspectos clínicos com o histórico do paciente. Para o diagnóstico definitivo, a técnica padrão ouro e de maior sensibilidade e especificidade até o momento é o isolamento fúngico pelo método convencional de cultivo micológico a partir de amostras biológicas do hospedeiro enfermo (BARROS *et al.*, 2011a; BOECHAT *et al.*, 2018).

Associado ao padrão ouro, pode ser realizado o exame micológico direto (EMD), o qual a partir do esfregaço da amostra em lâmina e coloração, busca-se visualizar leveduras pequenas (2 a 6µm) redondas, ovais a alongadas, lembrando a forma de charuto, sugestivas de *Sporothrix* spp. (BARROS *et al.*, 2011a; SANCHOTENE *et al.*, 2015). A utilização do EMD de forma isolada não é indicada uma vez que a taxa de sensibilidade é muito variável, podendo oscilar de 47 % a 80% conforme estudos recentes, ressaltando a importância do cultivo micológico como padrão ouro (QUINTELLA *et al.*, 2011; SANCHOTENE *et al.*, 2015; POESTER *et al.*, 2021b). A aplicação dessas duas técnicas de forma conjunta permite, muitas vezes, agilizar o diagnóstico da doença, tendo em vista que o isolamento fúngico por si só pode demorar de 7 até 30 dias para efetiva conclusão do laudo técnico (BARROS *et al.*, 2011a). Em humanos e não felídeos em que não há grande número de células leveduriformes nas lesões, a sensibilidade da técnica de EMD é ainda mais reduzida. Já no caso da esporotricose felina, a alta carga fúngica nas lesões favorece a visualização das células leveduriformes auxiliando no diagnóstico (BARROS *et al.*, 2011b; PEREIRA *et al.*, 2014; MIRANDA *et al.*, 2016).

Outra metodologia descrita e aplicável é a histopatologia, porém a sensibilidade do teste para humanos é baixa devido à escassez de elementos fúngicos no tecido, assim como o que ocorre para EMD. As colorações utilizadas para visualização do infiltrado inflamatório e para identificação das estruturas fúngicas são hematoxilina-eosina (HE), Ácido periódico-schiff (PAS) ou Grocott-Gomori (Prata) (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). De acordo com a literatura, as estruturas fúngicas estão presentes em 18 a 35,3% dos casos positivos para humanos, dependendo da técnica de coloração utilizada, chegando a 94% para doença em felinos. No entanto, devido a necessidade da biópsia sua utilização torna-se limitada, tendo em vista tratar-se de uma coleta invasiva (QUINTELLA *et al.*, 2011; GREMIÃO *et al.*, 2014; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

Os métodos de imunodiagnóstico apresentam-se ainda em caráter experimental restritos a validação diagnóstica ou a pesquisas científicas (ROSSOW *et al.*, 2020). Para humanos, um teste de aglutinação de látex para detecção de anticorpos anti-*Sporothrix* spp. está disponível comercialmente (IMMY, Norma, OK – EUA). Segundo Rossow *et al.* (2020) o teste é altamente específico para o gênero *Sporothrix* (100%), mas a sensibilidade varia de acordo com

a apresentação clínica: 100% para formas disseminadas, 86% para formas osteoarticulares, 73% para formas pulmonares, e 56% para formas cutâneas. O ensaio imunoenzimático (ELISA) também pode ser uma ferramenta de triagem sensível e específico para detecção de anticorpos anti-*Sporothrix* no soro de gatos e humanos com suspeita de esporotricose, já disponível comercialmente no Brasil. (FERNANDES *et al.*, 2011; BAPTISTA *et al.*, 2020).

Testes moleculares baseados na identificação da sequência de DNA diretamente da amostra clínica (biopsia ou *swab*) são alternativas diagnósticas promissoras. Diversas publicações descrevem diferentes protocolos moleculares, incluindo reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, sequenciamento, análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a PCR (PCR-RFLP), PCR espécie-específica e entre outros (MARIMON *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ-BRITO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2019; POESTER *et al.*, 2021b). No entanto, a aplicação desses métodos na rotina laboratorial requer uma infraestrutura avançada, altos custos de insumos com relação aos métodos clássicos; assim, sua utilidade é limitada pela falta de kits comerciais disponíveis e métodos padronizados, além de um limitado número de estudos de validação (ROSSOW *et al.*, 2020). Tais exames no contexto do Brasil limitam-se ainda ao âmbito de pesquisas.

Recentemente Cognialli *et al.*, (2022) avaliaram o desempenho de um protótipo de ensaio de fluxo lateral (LFA) do IMMY para a detecção rápida de anticorpos anti-*Sporothrix* em soros humanos e demonstraram resultados promissores para o diagnóstico de esporotricose. Tais pesquisadores salientam que algumas das principais vantagens da tecnologia LFA são a simplicidade, rapidez na obtenção de resultados, baixo custo, alta precisão, não requer infraestrutura laboratorial complexa e treinamento pessoal, e os reagentes podem ser transportados e armazenados em temperatura ambiente. Este teste pode vir a melhorar a suspeita clínica da esporotricose, reduzindo o tempo de início da terapia e impactando no controle de surtos e em regiões hiperendêmicas, como o caso do Brasil.

Buscando o diagnóstico específico, sensível e com custo acessível para esporotricose, considerando o contexto brasileiro de enfrentamento a essa micose, no qual é vital a identificação para tratamento de forma célere pessoas e animais, os métodos clássicos micológicos (cultivo e EMD) para a identificação direta do agente etiológico a nível de gênero, apresentam-se como alternativas viáveis e de fácil acesso às diversas comunidades.

2.7 Tratamento

De forma geral, para humanos e animais, o fármaco de eleição para a esporotricose é o ITZ, demonstrando-se efetivo na maioria dos casos de infecção por *Sporothrix* spp. (KAUFFMAN *et al.*, 2007; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014; DA ROCHA *et al.*, 2018; THOMPSON *et al.*, 2021). O tratamento recomendado para casos cutâneos e linfocutâneos (ITZ; 200mg – SID), com indicação de uso de 2 a 4 semanas após a resolução das lesões está associado a uma taxa de cura de 80 a 100% dos casos (THOMPSON *et al.*, 2021). Em casos não responsivos sugere-se o uso de ITZ (200mg – BID), terbinafina (500mg – BID), e solução saturada de iodeto de potássio, ou ainda, para pacientes que não toleram as indicações anteriores, fluconazol (400 a 800mg SID) (KAUFFMAN *et al.*, 2007; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; THOMPSON *et al.*, 2021). Adicionalmente, a criocirurgia e a terapia de aquecimento local são recomendadas em conjunto com a terapia antifúngica para auxiliar na redução do período de tratamento ou também para mulheres gestantes (FICHMAN *et al.*, 2018; SOEIRO SAMPAIO *et al.*, 2020).

Nas manifestações graves da esporotricose (por exemplo casos pulmonares severos, com acometimento de sistema nervoso central ou disseminada), recomenda-se o uso da anfotericina B (formulação lipídica – 3 a 5 mg/kg/dia) ou alternativamente a anfotericina desoxicolato (0,7 a 1 mg/kg/dia). Após a melhora progressiva do paciente, é indicada terapia de manutenção com ITZ (200mg – BID) por pelo menos 12 meses (THOMPSON *et al.*, 2021). A duração do tratamento antifúngico depende da forma clínica, variando de três a seis meses, podendo se estender a mais de 12 meses em casos de pacientes com doença grave ou não responsivo à terapia (KAUFFMAN *et al.*, 2000; KAUFFMAN *et al.*, 2007; ROSSOW *et al.*, 2020).

No tratamento de gatos, utiliza-se o fármaco de eleição, ITZ, nas doses recomendadas de 25 a 100 mg/kg/dia até 30 dias após o desaparecimento dos sinais clínicos (GREMIÃO *et al.*, 2021). Em casos refratários, o ITZ pode ser associado com anfotericina B de forma intracutânea ou intralesional (GREMIÃO *et al.*, 2009; 2011) ou com iodeto de potássio (DA ROCHA *et al.*, 2018). O iodeto de potássio (2,5 a 5mg/kg/dia) combinado com ITZ (100mg/kg/dia) representa uma alternativa eficaz para gatos com esporotricose refratária ao tratamento apenas com ITZ, principalmente nos casos com lesões de mucosa nasal e em animais com sinal respiratório (DA ROCHA *et al.*, 2018; GREMIÃO *et al.*, 2021). Porém, efeitos colaterais frequentes e consequentes do uso do iodeto de potássio em gatos, como o desenvolvimento de iodismo, precisam ser monitorados. Alternativas menos comuns sugeridas em estudos científicos para tratamento da esporotricose felina são terbinafina, cetoconazol, tratamento por aquecimento

local, cirúrgico ou criocirúrgico, com ou sem terapia por via oral concomitante (HONSE *et al.*, 2010; GREMIÃO *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2016).

Formas de esporotricose causada por *S. brasiliensis* não responsivas ao tratamento são comumente reportadas em gatos, embora pouco se saiba sobre os preditores da resposta ao tratamento nesses animais (DE SOUZA *et al.*, 2018). Relata-se que lesões localizadas na região nasal e mucosas podem recorrer após a cura clínica visual ou podem ser refratárias ao tratamento antifúngico (GREMIÃO *et al.*, 2009, 2011; 2014; DA ROCHA *et al.*, 2018; NAKASU *et al.*, 2020). Nesse contexto, conforme já citado anteriormente os sinais respiratórios vêm sendo correlacionados com falha no tratamento e prognóstico desfavorável em gatos com esporotricose (DE SOUZA *et al.*, 2018; GREMIÃO *et al.*, 2021).

O prognóstico depende do número, extensão e local das lesões, da ocorrência de sinais respiratórios e das condições gerais do animal, associado ao diagnóstico precoce da doença. Além disso, os felinos são animais com peculiaridades quanto a sensibilidade e toxicidade à fármacos em geral. Sendo assim, em caso de toxicidade ao tratamento, como reações adversas ou laboratoriais, é indicada a suspensão temporária do uso do medicamento, até que o apetite do animal se reestabeleça e as enzimas hepáticas séricas retornem aos níveis de referência. Dessa forma, o monitoramento clínico e bioquímico desses animais é fortemente recomendado (GREMIÃO *et al.*, 2021).

Além desses fatores intrínsecos a doença e sua manifestação, o alto custo das drogas e o longo período de tratamento, no qual o animal precisa ser mantido confinado para prevenir a propagação da doença, são problemas frequentes associados a falha terapêutica (GREMIÃO *et al.*, 2014, 2021). Fatores sociais, associados a dificuldade de contenção animal e de administração por via oral diária da droga também impactam no sucesso do tratamento (POESTER *et al.*, 2018a; ANDRADE *et al.*, 2021). Dada a essa problemática Papa *et al.* (2018) relataram taxa de abandono maior que 50% dos felinos com esporotricose. Assim, se faz essencial o cumprimento da posse responsável a partir da cooperação e persistência dos tutores para o sucesso no tratamento (GREMIÃO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; GREMIÃO *et al.*, 2021).

A vulnerabilidade dos gatos frente a manifestação clínica exacerbada da doença associada a ocorrência de casos refratários e recorrentes nesses animais destaca a importância de monitorar a suscetibilidade dos fungos aos antifúngicos comerciais e instiga a busca por novas alternativas terapêuticas que propiciem taxa de cura mais elevada, contribuindo diretamente para a saúde individual dos animais acometidos e indiretamente para a saúde coletiva das populações de áreas hiperendêmicas da doença.

2.8 Estudos de Novos Compostos Anti-*S. brasiliensis*

O arsenal terapêutico para tratamento de doenças fúngicas em geral, é limitado, e atualmente as drogas antifúngicas disponíveis apresentam problemas e/ou limitações relacionados a via de administração, alta toxicidade, espectro de ação, interações medicamentosas, desenvolvimento de resistência aos medicamentos e a baixa biodisponibilidade nos tecidos-alvo (BROWN *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2022). Além disso, tratando-se estritamente da esporotricose felina, somado a todos fatores apontados no tópico anterior, fica explícito a importância de dispormos de novas e seguras moléculas com atividades antifúngicas eficientes que contribuam diretamente no contexto da saúde única.

A genotipagem dos *Sporothrix* spp. de isolados obtidos de casos da esporotricose transmitida por gatos associada a perfis de suscetibilidade antifúngica mostrou o surgimento e a possibilidade de disseminação de cepas resistentes aos antifúngicos comercialmente disponíveis (RODRIGUES *et al.*, 2014; BORBA-SANTOS *et al.*, 2015a). Notavelmente, os estudos reportam um número crescente de cepas resistentes à anfotericina B e ITZ ao longo do tempo (RODRIGUES *et al.*, 2014; NAKASU *et al.*, 2020). As identificações e o monitoramento dessas tendências epidemiológicas associadas ao surgimento de resistência aos medicamentos são importantes para ajustar a terapia antifúngica e estimular o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da esporotricose, principalmente causada por *S. brasiliensis* (GREMIÃO *et al.*, 2017).

Frente a isto, diversas potenciais alternativas terapêuticas para esporotricose zoonótica têm sido propostas a partir das avaliações *in vitro* de novas moléculas/compostos químicos, de produtos naturais e de medicamentos reaproveitados (BORBA-SANTOS *et al.*, 2015b; POESTER *et al.*, 2018b; WALLER *et al.*, 2020; BORBA-SANTOS *et al.*, 2021). Apesar dos resultados promissores descritos por muitos autores, os estudos ainda carecem das aplicabilidades em modelos *in vivo* (pré-clínicos) para comprovação de seu benefício na terapêutica da doença.

A maior parte dos estudos pré-clínicos *in vivo* disponíveis avaliaram outros antifúngicos comerciais para a esporotricose associada a *S. brasiliensis*, como o posaconazol, terbinafina, anfotericina B e voriconazol (FERNÁNDEZ-SILVA *et al.*, 2012; ISHIDA *et al.*, 2015; MARIO *et al.*, 2015). Tais antifúngicos são sabidamente inibidores do crescimento de *Sporothrix* spp. *in vitro*. O posaconazol mostrou eficácia em modelo murino infectado por *S. brasiliensis* e *S. schenckii* e inclusive quando utilizado em combinação com anfotericina B, demonstrou sucesso na contenção da esporotricose experimental disseminada causada por *S. brasiliensis*

(FERNÁNDEZ-SILVA *et al.*, 2012; MARIO *et al.*, 2015). Porém o posaconazol é um medicamento ainda de custo elevado, sendo atualmente de difícil acesso em países onde a prevalência da esporotricose vem aumentando drasticamente, como é o caso do Brasil (BORBA-SANTOS *et al.*, 2015b). Já o voriconazol quando avaliado de forma isolada em modelo de esporotricose experimental disseminada demonstrou-se pouco efetivo e em estudos *in vitro* não foi observado efeito sinérgico quando em combinação com a terbinafina, sendo pouco recomendado no tratamento da esporotricose animal (FERNÁNDEZ-SILVA *et al.*, 2014; BORBA-SANTOS *et al.*, 2015a). A anfotericina B desoxicolado, quando utilizada sozinha ou em associação com o ITZ no tratamento da esporotricose disseminada reduziu significativamente a carga fúngica em todos os órgãos dos animais acometidos, sendo que a associação dos fármacos levou a redução mais consistente (ISHIDA *et al.*, 2015).

Nos últimos dez anos, dentre os poucos estudos pré-clínicos *in vivo* visando a aplicação e avaliação terapêutica de potenciais compostos antifúngicos, é citado o estudo desenvolvido por Waller e colaboradores (2021a,b) que demonstrou a eficácia do uso oral de óleo de alecrim e de manjerona no tratamento da esporotricose cutânea experimental em ratos, apresentando resultados promissores. Recentemente Borba-Santos *et al.* (2021) demonstraram que o buparvaquone, um agente antiprotozoário, foi mais efetivo que o ITZ contra a infecção de *S. brasiliensis* em modelo alternativo, utilizando *Galleria mellonella*, indicando outro potencial composto. E, por fim, do total de três estudos encontrados, Bonilla *et al.* (2021) a partir de estudo em modelo murino, sugerem que compostos derivados de acilhidrazonas podem ser explorados para combater a esporotricose causada por *S. brasiliensis* e *S. schenckii*.

De forma geral, muitos anos são necessários para o estudo e descobrimento de novos antifúngicos até o seu uso clínico, tanto na medicina humana como na medicina animal. Sendo assim, o estudo de estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos que contribuam na redução no tempo da terapia convencional e/ou que aumentem a qualidade de vida dos pacientes, devem ser considerados (SCORZONI *et al.*, 2017). No que tange a problemática da esporotricose torna-se essencial o estímulo à busca de alternativas e potenciais farmacológicos, inclusive na investigação *in vivo* dos compostos promissores *in vitro*, visando um tratamento efetivo para contenção da disseminação do *S. brasiliensis* e minimização da gravidade da manifestação clínica nos felinos, animais extremamente vulneráveis.

2.9 Potencial Antifúngico do Disseleneto de Difenila

Dentre os fármacos com atividade *in vitro*, o (PhSe)₂ é um promissor candidato devido a sua atividade anti-*S. brasiliensis* de forma isolada e em combinação com o ITZ (POESTER *et*

al., 2018b). Na constituição desse composto encontra-se duas moléculas de selênio, um micronutriente essencial para as células dos mamíferos, e parte integrante de um conjunto de proteínas, as selenoproteínas/selenoenzimas, como a glutathiona peroxidase e tioredoxina redutase, as quais apresentam ação antioxidante (protegendo as membranas celulares contra danos dos radicais livres), ação na regulação do crescimento e viabilidade celular, e ação nas funções do sistema imune e na reprodução (MUGESH *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2012). Embora o selênio tenha papéis fisiológicos importantes na célula de mamíferos, é ainda discutível se a exposição aos níveis de selênio ligeiramente acima das necessidades nutricionais pode ser benéfica ou maléfica para as células humanas (NOGUEIRA & ROCHA, 2010).

O (PhSe)₂ é um composto de organoselênio, estável e altamente lipofílico, que é amplamente utilizado como um intermediário na síntese orgânica (Figura 5). Estudos extensivos focados nos efeitos farmacológicos e toxicológicos do (PhSe)₂, em diferentes modelos biológicos, ressaltam suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiulcerativa e hepatoprotetora (GHISLENI *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2006; SAVEGNAGO *et al.*, 2007, 2008; PRIGOL *et al.*, 2009; LORETO *et al.*, 2011, 2012; PRIGOL *et al.*, 2012; SARTORI *et al.*, 2016, 2017). A partir da relação da exposição aos níveis de selênio no organismo e da literatura científica bem documentada quanto a oxidação excessiva de grupos tiol por compostos de disseleneto, o (PhSe)₂ é considerado um composto dose-dependente ou dupla-face, uma vez que, quando administrado acima das necessidades fisiológicas pode tornar-se tóxico, e por tanto seu limiar entre potencial terapêutico ou toxicológico em resposta a um determinado evento no organismo humano/animal deve ser ponderado.

Apesar disso, inúmeros estudos com modelos *in vivo* que indicam a atividade antioxidante do (PhSe)₂ argumentam a favor do seu potencial terapêutico (NOGUEIRA & ROCHA, 2010). Somado a esse fato, e com base em estudos de farmacocinética e farmacodinâmica, o composto tem cientificamente respaldada sua dose letal aguda em modelo murino, bem como o grau de toxicidade a partir da espécie de estudo (camundongo > rato), da via de administração empregada (via intraperitoneal > via oral > via subcutânea) e do veículo de administração (Dimetilsulfóxido > óleo de canola) (MEOTTI *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2003; SAVEGNAGO *et al.*, 2007; WILHELM *et al.*, 2009; PRIGOL *et al.*, 2012).

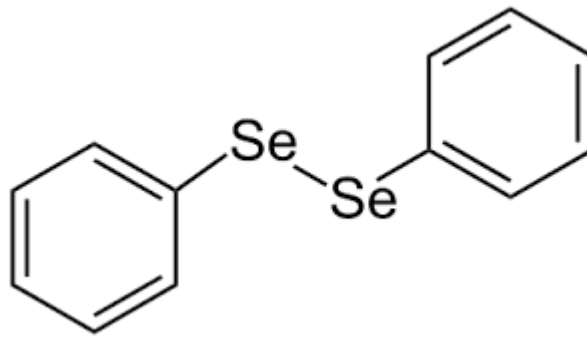


Figura 5. Estrutura química do disseleneto de difenila.

E não apenas, restrito a suas características farmacológicas promissoras, na última década, as atividades fungicida e fungistática *in vitro* do $(\text{PhSe})_2$ foi descrita contra fungos filamentosos, leveduriformes e dimórficos, como *Fusarium* spp., *Candida* spp., *Pythium* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Sporothrix* spp., entre outros de importância na micologia médica (LORETO *et al.*, 2011, 2012; POESTER *et al.*, 2018b; FELLI KUBIÇA *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2020; BENELLI *et al.*, 2021a,b). Benelli *et al.* (2021a) em uma revisão sistemática destacam que o $(\text{PhSe})_2$, inibiu mais de 95% dos fungos testados em concentrações menores ou iguais a 64 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, a interação do $(\text{PhSe})_2$ com fármacos comerciais como a anfotericina B, voriconazol e caspofungina contra *C. glabrata*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., e/ou *Trichosporon asahii* apresentou mais de 60% de efeito sinérgico ou aditivo, e quando associado ao ITZ contra *S. brasiliensis* teve efeito aditivo em mais de 65% dos isolados testados (DENARDI *et al.*, 2013; VENTURINI *et al.*, 2016; POESTER *et al.*, 2018b; FELLI KUBIÇA *et al.*, 2019). A partir disso, Benelli e colaboradores (2021a) sugerem que o composto pode ter potencial para ser empregado como alternativa na terapia antifúngica, sozinho ou em combinação com outros antifúngicos comerciais e, portanto, mais estudos *in vivo* devem ser estimulados para determinação deste potencial antifúngico.

São escassos os estudos em modelos biológicos abordando o potencial terapêutico do $(\text{PhSe})_2$ em doenças infecciosas de relevância na medicina humana e animal (LORETO *et al.*, 2012; SARTORI *et al.*, 2016; DOLESKI *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2020). Sartori e colaboradores (2016) relacionam a ação antiviral do $(\text{PhSe})_2$ contra a infecção por *Herpes simplex-2* (HSV-2) pelas suas propriedades imunomoduladoras, antioxidantes e anti-inflamatórias. Os resultados revelaram que o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ foi eficaz contra o aumento do estresse oxidativo renal e hepático em camundongos infectados e normalizou a atividade da adenosina desaminase (ADA) hepática e renal, o que não ocorreu no grupo tratado com o medicamento de eleição para a enfermidade. Sendo assim, os autores consideraram o composto como potencial candidato para terapias alternativas de tratamento de infecção

causada por HSV-2 e complicações secundárias. Da mesma forma, Doleski e colaboradores (2017) relatam que o $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de reverter a inflamação hepática em camundongos cronicamente infectados com *Toxoplasma gondii*, possivelmente a partir da modulação de enzimas purinérgicas que produzem um perfil anti-inflamatório através do sistema purinérgico do tecido hepático.

Já com relação ao potencial antifúngico, um estudo com o oomiceto *Pythium insidiosum* em coelhos relatou a ausência de toxicidade e a atividade fungistática do $(\text{PhSe})_2$, indicando-o fortemente como opção terapêutica futura para a pitiose (LORETO *et al.*, 2012). Melo e colaboradores (2020) destacam a atividade promissora do $(\text{PhSe})_2$ *in vivo* contra espécies de *Aspergillus*, mas recomendam que mais estudos pré-clínicos são necessários para determinar a aplicabilidade do composto no tratamento da aspergilose. No que tange a temática de potencial terapêutico do $(\text{PhSe})_2$ em enfermidades de interesse na micologia médica, mais pesquisas devem ser desenvolvidas para investigar os efeitos farmacológicos e toxicológicos do composto, sozinho e em combinação com antifúngicos comerciais, em modelos experimentais.

De forma geral para aplicação em doenças infecciosas, diversos experimentos *in vivo* mostram que $(\text{PhSe})_2$ reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas, no entanto, o exato mecanismo com relação a sua ação anti-inflamatória não está totalmente elucidado (LEITE *et al.*, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2021). Estudos demonstram que $(\text{PhSe})_2$ reage com grupos tiol na estrutura terciária da proteína, e essa interação modula a atividade enzimática e afinidade aos substratos, causando alterações em importantes vias metabólicas, e este é possivelmente o mecanismo de ação molecular do composto (NOGUEIRA & ROCHA, 2010).

A característica altamente lipofílica do $(\text{PhSe})_2$ pode estar relacionada ao curto tempo de concentração e à rápida distribuição aos tecidos. No entanto, essa condição pode ser favorável quando considerada a analogia com outros agentes antifúngicos lipofílicos (como ITZ e terbinafina), que se mostraram eficazes devido ao seu acúmulo nos tecidos queratinizados (LEYDEN, 1998; LORETO *et al.*, 2011). Além disso, vários autores demonstraram que o sistema linfático é a rota mais significativa de absorção para produtos químicos altamente lipofílicos e enfatizaram a produção e o transporte de quilomícrons como rota de absorção para compostos químicos lipofílicos administrados por via oral (PALIN *et al.*, 1982; ROTH *et al.*, 1993; NAGAHORI *et al.*, 2010). Com base em sua lipofilicidade, Prigol e colaboradores (2012) sugerem que $(\text{PhSe})_2$ seja absorvido pelo sistema linfático e identificaram o tecido adiposo, fígado e os rins como os locais de maior deposição de selênio ou de seus metabólitos, seguidos pelo cérebro e pulmões.

As características do $(\text{PhSe})_2$ ponderadas são favoráveis a hipótese de sua aplicação frente a esporotricose, tendo em vista que esta é uma micose subcutânea, de ascensão por via linfática, somado ao fato do tratamento de eleição ter potencial para hepatotoxicidade e ser recomendado seu uso por via oral durante um longo período. Em adição, em modelo murino, o fígado é um dos principais órgãos internos acometidos no processo de disseminação do *S. brasiliensis* (DELLA TERRA *et al.*, 2017). Frente ao exposto, estudos em modelos biológicos que estabeleçam potenciais doses terapêuticas do $(\text{PhSe})_2$ contra a esporotricose devem ser desenvolvidos a fim de contribuir substancialmente no contexto da saúde única em que essa enfermidade está diretamente inserida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Atualizar a situação epidemiológica da esporotricose no estado do RS e avaliar o potencial terapêutico do disseleneto de difenila (PhSe)₂, isoladamente e em associação com o itraconazol, frente a esporotricose experimental por *S. brasiliensis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Atualizar a situação epidemiológica da região sul do RS no que tange a ocorrência de casos de esporotricose humana e animal;
- Relatar a emergente ocorrência de esporotricose zoonótica na grande Porto Alegre – RS;
- Indicar a ocorrência de esporotricose felina nas diferentes regiões do RS até então sem casuística relatada na literatura científica;
- Avaliar o (PhSe)₂ em diferentes concentrações, na melhora de parâmetros clínicos frente a esporotricose experimental, bem como na redução da carga fúngica dos órgãos internos;
- Avaliar a interação do (PhSe)₂ com ITZ na melhora dos parâmetros clínicos frente a esporotricose experimental, bem como na redução da carga fúngica dos órgãos internos;
- Comparar a ação do (PhSe)₂, isolado ou em associação com ITZ, com o tratamento de eleição (ITZ) para esporotricose experimental no modelo murino.

4 ARTIGO/MANUSCRITO 1

Update of the Epidemiology of the Sporotrichosis Epidemic in the state of Rio Grande do Sul, Brazil

Munhoz, L. S., Poester, V. R., Severo, C. B., Trápaga, M. R., Madrid, I. M., Benelli, J. L., Stevens, D. A., & Xavier, M. O.

Artigo publicado no periódico: *Mycoses*. 2022; 00: 1- 7. doi: [10.1111/myc.13497](https://doi.org/10.1111/myc.13497)

Fator de impacto: 4.93




Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.13497>

Received: 4 April 2022 | Revised: 6 July 2022 | Accepted: 8 July 2022
DOI: 10.1111/myc.13497

ORIGINAL ARTICLE

 WILEY

Update of the Epidemiology of the Sporotrichosis Epidemic in the state of Rio Grande do Sul, Brazil

Lívia Silveira Munhoz¹  | Vanice Rodrigues Poester²  | Cecília Bittencourt Severo³ |
Mariana Rodrigues Trápaga¹ | Isabel Martins Madrid⁴ | Jéssica Louise Benelli⁵  |
David A. Stevens^{6,7} | Melissa Orzechowski Xavier^{1,5}

INTRODUCTION

Sporotrichosis, a subcutaneous mycosis, caused by *Sporothrix* species can be acquired by traumatic inoculation from the environment or from animals (mostly, infected cats) [1]. *S. globosa*, *S. schenckii* sensu stricto (s. str.) and *S. brasiliensis* are the main pathogenic species, responsible for more than 90% of clinical cases. The first two species are associated with a sporadic disease caused by an environment injury, and the latter an emergent species associated with zoonotic transmission [2]. *S. brasiliensis* is the most virulent species of the pathogenic clade and is presently associated with hyperendemic and/or epidemic areas of sporotrichosis in Brazil [1, 3, 4].

Sporotrichosis became a severe public health problem in the country through the transmission of *S. brasiliensis* by infected cats [1, 3]. Presently, hundreds to thousands of cases are described in several regions of the country. It is likely the disease is still underdiagnosed due to deficient knowledge of this epidemiological scenario of sporotrichosis by health professionals and the population; and also underreported because notification to jurisdictional authorities is not required [3-5]. Domestic cats represent the main source of infection of the Brazilian sporotrichosis outbreaks due to their predisposition to develop severe disease, with high *S. brasiliensis* fungal load in the lesions, allowing dissemination by scratches and/or bites to other cats, dogs, and humans [1, 6].

The epicenter of the disease is Rio de Janeiro (RJ) state, which has an unprecedented epidemic of cat-transmitted sporotrichosis [7, 8]. Hundreds of feline and zoonotic human sporotrichosis cases have also been described since the 1990's in the southern state of Brazil, Rio Grande do Sul (RS) [9 – 14]. However, the RS scenario is well documented only in a few municipalities from the same health district (South region) [14]. Rio Grande and Pelotas are the main cities with hyperendemic cat-transmitted sporotrichosis, with an exponential increase in cases before 2016 [10, 12 – 14]. Both are the major social and economic cities of the Southern region of RS, and Rio Grande is the most important port of the South region and the 5th busiest of Brazil [15-17]. Of interest, the epidemiology of this disease in the other six health districts of RS (Rio Grande do Sul, 2014) is unclear. Recently the first series of 21 feline sporotrichosis cases due to *S. brasiliensis* (2015-2019) was reported from the Metropolitan region [18].

It is well-known that an increase in the incidence of human sporotrichosis tends to occur subsequent to the dissemination of the disease in feline populations [13]. Thus, since sporotrichosis is not included in the obligatory list of disease notifications in RS, Brazil, to illuminate the true scenario of the disease in RS, we performed an epidemiological inquiry to evaluate the occurrence of sporotrichosis. We update the epidemiology of sporotrichosis (in

animals and humans) from the southern region, and we describe the emerging nature of this epidemic, a series of human sporotrichosis cases from the largest city and capital of RS.

METHODS

Study area

Rio Grande do Sul is localized on the coast of the extreme south of Brazil, bordering Argentina and Uruguay. It covers 281,707,149 km², divided in seven health districts (South, Valley, Metropolitan, Sierra, North, Mission, and Midwest). The estimated population is 11,422,973 inhabitants [15, 16, 19], with approximately 1.77 million domestic cats [20].

Epidemiological inquiry

An active search was performed to recruit professionals enrolled in animal care (veterinarians working at clinics and hospitals, or as faculty in universities, or engaged in animal health care from public entities) registered at the Council of Veterinary Medicine of RS (CRMV-RS). The invitation was forwarded by electronic mail to all the 500 professionals registered, explaining the study and including an ethics agreement, followed by a link to a self-administered questionnaire. Six months after the first contact, another email was sent to non-responders to reaffirm the invitation, and the link to participate was also published on social media. The questionnaire remained open to responders from October 2019 to December 2020.

Participants were asked 25 questions, regarding demographic data (including region, professional degree, professional work area, sex of the participant); data comprising the local case load of sporotrichosis (frequency of cases, outpatient visits for the disease, and occurrence of zoonotic transmission); and diagnostic method (clinical and/or laboratory based: cytopathology and/or mycological culture; public or private access to the laboratory examinations).

In order to reduce missing data associated with unfamiliarity of the participants about clinical characteristics of sporotrichosis, two more questions referable to the existence of feline sporotrichosis in their region were obligatory to those who declared no known sporotrichosis cases. One collected data about the occurrence of ulcerative skin lesions unresponsive to anti-bacterial on cats and/or dogs, and the other asked if they had already treated an animal with lesions similar to those shown in images (images of cats with sporotrichosis lesions).

Epidemiological update of sporotrichosis cases in the South region and Metropolitan region

All cases of sporotrichosis in humans and animals (cats and dogs) diagnosed by the Laboratory of Mycology of the *Universidade Federal do Rio Grande (Faculdade de Medicina - FAMED-FURG)* and/or registered at the Centre for Zoonosis Control (CZC) of the *Prefeitura Municipal de Pelotas* between January 2017 and September 2021 were included.

In addition, to illustrate the increase in the occurrence of sporotrichosis in other regions of RS besides the South region, human sporotrichosis cases diagnosed in the Metropolitan region by the Laboratory of Mycology of the *Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital Complex* between January 2016 to September 2021 were included.

Sporotrichosis cases were defined by *Sporothrix* spp. growth in mycological culture and/or the visualization of small elongated oval blastoconidia in direct mycological exam from lesions of patients with compatible clinical signs and lesions.

Data analysis and Ethics

Data were evaluated by frequency analyses. Geographic distribution was specified by health districts of RS. The study was approved by the Health Ethics Committee of FURG (CEP-FURG: 216/2019).

RESULTS

Epidemiological inquiry regarding sporotrichosis occurrence through the regions of RS

A total of 115 participants answered the inquiry. Most were veterinarians (69%; $n=79$), 26 participants (22%) were other health professionals engaged in health care from universities or public entities and 10 (9%) participants were veterinary students. Participants were mostly women (79%; $n=91$), with a mean age of 36 years (ranging from 21 to 61).

Participants were from 40 cities of RS, covering all the seven health districts of the state. Although the South region corresponded to 45.3% ($n=52$) of the participants, 23.5% ($n=27$) were from Metropolitan, 9.6% ($n=11$) from North, 8.7% ($n=10$) from Sierra, and 4.3% for each region from Valley ($n=5$), Mission ($n=5$), and Midwest ($n=5$).

Ninety-five participants (83%) described the occurrence of local cases of sporotrichosis in domestic cats, 40-98% of the participants from every region. Of interest, of those who declared no known sporotrichosis cases, all of them ($n=20$) reported attending cats and/or dogs with ulcerative skin lesions unresponsive to anti-bacterials, and/or reported attending cats with suggestive lesions of sporotrichosis by reviewing our photographs. In addition, cat-transmitted human sporotrichosis was also reported by professionals from the South, Metropolitan, Sierra,

and Midwest regions of the state, with a frequency ranging from 62.5% to 92.5% (Table 1 and Figure 1).

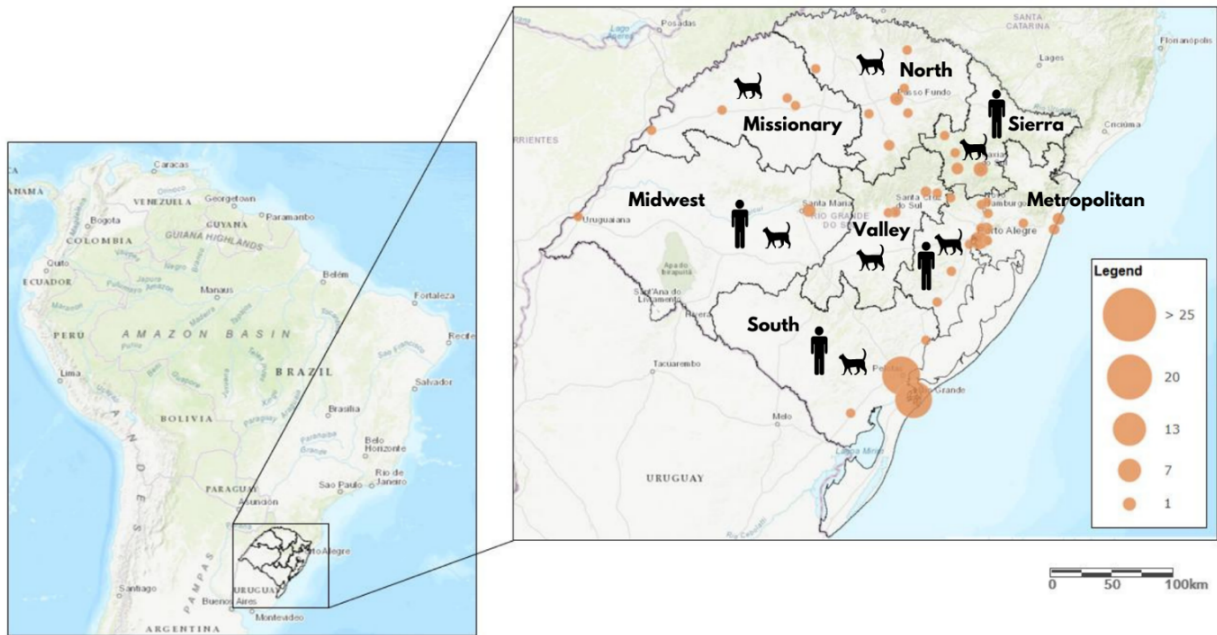


Figure 1. Health districts of Rio Grande do Sul state (RS), Southern Brazil. Orange circles refer to the number of participants and cities included in the study. Cat icons and human icons correspond to regions with feline and human sporotrichosis cases, respectively, mentioned in response to the questionnaires.

Laboratory examinations (culture and/or cytopathology) were indicated by the majority of those interviewed (ranging from 60% to 100% among regions) as the method to define the disease diagnosis. Only in the South region the laboratory service was predominantly public (Table 1).

TABLE 1 Data obtained through the inquiry about sporotrichosis occurrence in the Rio Grande do Sul state

Questions	Answers % (n/total)	Health Regions of RS								TOTAL
		South	Valley	Metropolitan	Sierra	North	Missionary	Midwest		
Occurrence of local cases	Yes	98% (51/52)	40% (2/5)	74% (20/27)	80% (8/10)	64% (7/11)	60% (3/5)	80% (4/5)	83% (95/115)	
	No	2% (1/52)	60% (3/5)	26% (7/27)	20% (2/10)	36% (4/11)	40% (2/5)	20% (1/5)	17% (20/115)	
Only participants who selected NO regarding attendance of sporotrichosis cases										
Attendance of animal with skin ulcerative lesion non-responsive to anti-bacterial OR Selecting photographs of cats with suggestive lesions of sporotrichosis										
Only participants who selected YES regarding attendance of sporotrichosis cases										
Zoonotic transmission to humans	Yes	92.5% (37/40)	0% (0/2)	62.5% (10/16)	75% (6/8)	0% (0/5)	0% (0/2)	66.7% (2/3)	72% (55/76)	
	No	7.5% (3/40)	100% (2/2)	37.5% (6/16)	25% (2/8)	100% (5/5)	100% (2/2)	33.3% (1/3)	28% (21/76)	
Diagnostic method	Clinical and laboratory	95% (38/40)	100% (2/2)	75% (12/16)	100% (8/8)	60% (3/5)	100% (2/2)	100% (3/3)	89% (68/76)	
	Only Clinical	5% (2/40)	0% (0/2)	25% (4/16)	0% (0/8)	40% (2/5)	0% (0/2)	0% (0/3)	11% (8/76)	
Laboratorial service	Public	89% (33/37)	0% (0/0)	8% (1/12)	0% (0/7)	33.3% (1/3)	0% (0/2)	33.3% (1/3)	55% (36/66)	
	Private	11% (4/37)	100% (2/2)	92% (11/12)	100% (7/7)	66.7% (2/3)	100% (2/2)	66.7% (2/3)	45% (30/66)	
	Missing	3% (1/38)	0%	0%	12.5% (1/8)	0%	0%	0%	3% (2/68)	

Note: Participants and their responses were divided according to health districts of RS.

Update of the epidemiological situation in the South region of RS

During the period studied (2017-2021), 643 new cases of sporotrichosis were diagnosed in the two most hyperendemic cities of RS (South region): 504 cases in cats, 98 in humans, and 41 in dogs. Annual means were 129 cases/year (ranging from 71 to 163 cases) (Figure 2). More than 90% of the human sporotrichosis cases indicated contact, bite, or scratch by a domestic cat with skin lesions consistent with sporotrichosis.

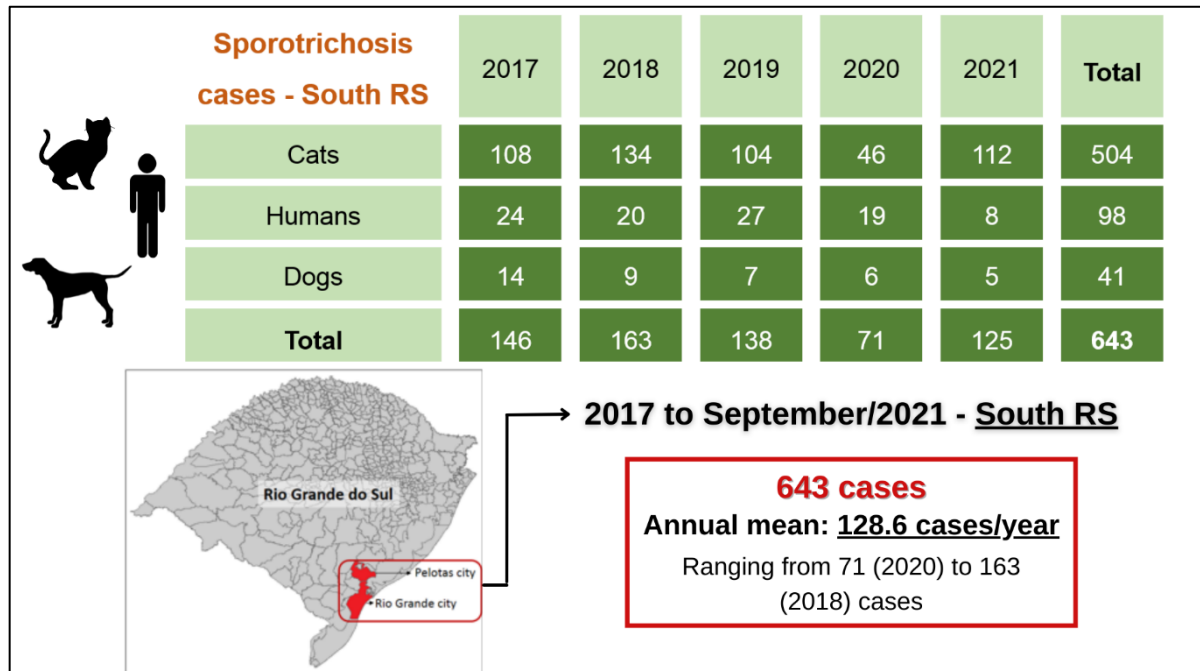


Figure 2. Sporotrichosis cases (human and animal) reported in the two most hyperendemic cities (Pelotas and Rio Grande, from the South region) of Rio Grande do Sul state, between January 2017 and September 2021

Increases in the frequency of human sporotrichosis in the Metropolitan region of RS

In *Porto Alegre* city, capital of RS (Metropolitan region), just at one institution (Laboratory of Mycology of *Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital Complex*), 24 cases of human sporotrichosis were diagnosed from 2016 to September 2021. Notably, 71% (17/24) of them were diagnosed in the last 21 months. An increase of 500% occurred in the number of cases comparing the first three years (2016-2018; $n=4$) with the last three (2019-2021; $n=20$). Most of these patients indicated a cat-transmission (Figure 3).

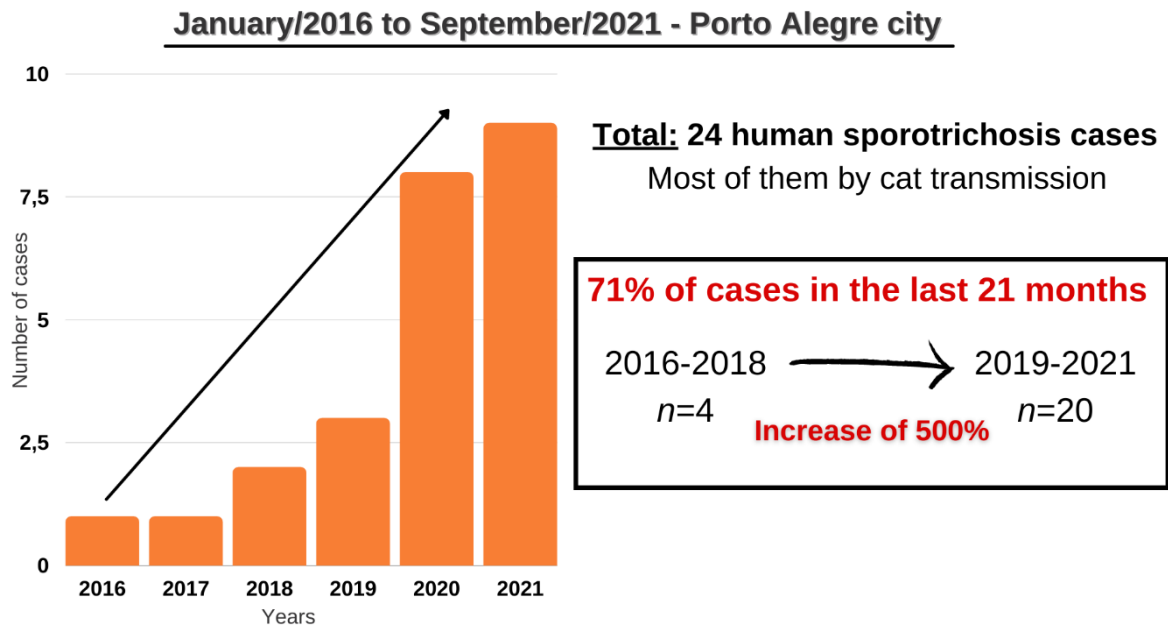


Figure 3. Increase in the number of human sporotrichosis cases in an institution from the capital city (Metropolitan region) of Rio Grande do Sul state, between January 2016 and September 2021.

DISCUSSION

In the southern state of Brazil, RS, earlier data indicated that feline and cat-transmitted human sporotrichosis were almost restricted to the southern region, and principally to two cities where the disease has been reported since the 1990's [3, 9 - 14, 21]. However, our results expand these data and show that feline sporotrichosis is widely distributed in all the RS territory, covering all seven health regions of that state. Our data also suggests the epidemic is continuing to enlarge.

The disease was reported in regions of RS that border another Brazilian state (Santa Catarina) and other countries (Argentina and Uruguay). Some cities have extensive tourism activity, and Rio Grande city is the 5th most important port of Brazil, a public maritime port, internationally known as the Mercosur Port due to its proximity to Argentina, Uruguay and Paraguay [22]. In addition, *S. brasiliensis* isolates from RS are genotypically distinct from those from other Brazilian states [23, 24]. These data show that coordinated epidemiological surveillance and control measures are highly necessary given the importance of the region as a potential source of dissemination of *S. brasiliensis* to other states and other countries. For emphasis, in recent years, the Centers for Diseases Control and Prevention [25] issued an alert to physicians and veterinarians in the United States to be prepared to recognize and treat

infections by *S. brasiliensis*, given the travel and exposure patterns of humans and cats. Disease caused by this fungal species is presently also considered emergent in Argentina [26], and a cat-transmitted sporotrichosis case has been described in Paraguay [27].

Moreover, our questionnaire showed that the diagnosis, based principally on clinical and epidemiological aspects, occurred mainly in the South region of RS. This suggests that in hyperendemic areas of sporotrichosis, clinicians are more familiar with the disease, and more reliably prescribe treatment without laboratory assistance [12, 14]. In this region, many participants reported access to public diagnostic services provided by Federal Universities, highlighting the importance of academic institutions in public health [3, 5].

The support provided by research developed at these institutions has been central in tallying cases of sporotrichosis and the impact in the region since the 1990's [3, 9 - 11, 14, 21]. Local public health policies have been implemented based on data from these studies, increasing the number diagnosed, allowing an earlier start of specific treatment, promoting assistance to patients, and providing educational activities for professionals and the general population [3, 5]. In addition, it allows us to hypothesize that in the other regions of RS lacking reported cases or publications, the disease is underdiagnosed, not nonexistent.

Human sporotrichosis acquired through bites and/or scratches from cats were reported by the participants in the South, Metropolitan, Sierra, and Midwest regions of RS, suggesting that *S. brasiliensis* may be spreading in a typical and dangerous way in these regions. The high spread of sporotrichosis in urban areas is growing, especially as observed in the Metropolitan region, which has a high population density and assuredly a consistent presence of vulnerable cats [15, 16]. Given that situation, education, preventive and control measures are particularly needed to avoid an even worsening epidemiological scenario in the coming years [7].

Our study has some limitations as the number of participants ($n=115$) may not be representative of the entire state, the self-administered characteristic of the questionnaire could introduce some errors, and cases were likely occurring outside our study framework, thus underestimating the problem. Despite this, our study is an important "first step", allowing us to show that the disease is occurring widely in the RS territory, described in all seven health regions in the state, not only in the southern region as has been best described previously in the literature [9 – 14, 18].

In the Metropolitan region of RS, until recent decades, human sporotrichosis was noted only as sporadic cases of plant origin [28, 29]. Recently the first series of sporotrichosis cases in cats from this region was published [18], and, likely related, our study showed an increase of 500% in the last three years of the human cases associated with feline transmission in a

hospital from the same city. Two other cities from the metropolitan region, which are localized 23 and 30 km from *Porto Alegre* city, respectively, also noted a series of 44 and 11 cases of feline and human sporotrichosis in one year in *Sapucaia do Sul* (August 2020 to July 2021) and 30 human cases in 2021 in *Gravataí*, representing an increase of 130% in cases in comparison with 2020 [30, 31]. These data suggest a change in the epidemiological scenario of sporotrichosis in these areas, from a sporadic disease of plant origin to an emergent zoonotic one.

Regarding the update of the epidemiological situation of sporotrichosis in the southern region of RS, an increase of 184% in mean annual cases of sporotrichosis occurred in comparison with our last epidemiological study, relying on the same diagnostic services [14]. The rate of up to 70 new cases/year reported previously ($n=489$ between 2010 and 2016) increased to 129 new cases/year ($n=643$ between 2017 and August 2021). The year with the fewest cases diagnosed in the southern region of RS was 2020 ($n=71$), probably due to distracted efforts, countering the pandemic of Covid-19.

Feline and zoonotic sporotrichosis is an underreported mycosis in RS and is widely distributed in the territory of the RS state. In this region, health professionals must be aware regarding atypical and more severe cases of sporotrichosis generally more associated with the zoonotic incidence and especially associated with immunocompromised persons since the RS has the second-highest prevalence of HIV/AIDS among Brazilian states [32 - 34]. Given the severity of zoonotic sporotrichosis in Brazil, public policy measures to increase education and the surveillance and control of this disease in all RS regions is urgently needed. Furthermore, considering our data with other studies reporting the increase of the disease from other states of Brazil [4, 35 – 38], sporotrichosis needs, urgently, to be included in the national list of diseases requiring compulsory notification to receive the attention that this public health problem deserves.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FAPERGS, CNPq and CAPES. We thank Professor Fábio Raphael Pascoti Bruhn of the Postgraduate Program in Veterinary Medicine of the Federal University of Pelotas (UFPel) for technical instructions during the generation of the questionnaire.

REFERENCES

1. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLOS Pathog.* 2017;13(1):e1006077. doi:10.1371/journal.ppat.1006077
2. Zhang Y, Hagen F, Stielow B, Rodrigues AM, Samerpitak K, Zhou X, Feng P, Yang L, Chen M, Deng S, Li S, Liao W, Li R, Li F, Meis JF, Guarro J, Teixeira M, Al-Zahrani HS, Pires de Camargo Z, Zhang L, de Hoog GS. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia.* 2015; 35:1-20. doi: 10.3767/003158515X687416.
3. Poester VR, Stevens DA, Basso RP, et al. CATastrophe: Response to the challenges of zoonotic sporotrichosis in southern Brazil. *Mycoses.* Published online August 2021. doi:10.1111/myc.13363
4. Gremião IDF, Oliveira MME, Monteiro de Miranda LH, Saraiva Freitas DF, Pereira SA. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(3):621-624. doi:10.3201/eid2603.190803
5. Poester VR, Saraiva LA, Pretto AC, et al. Desconhecimento de profissionais e ações de extensão quanto à esporotricose no extremo Sul do Brasil. *VITTALLE - Rev Ciências da Saúde.* 2019;31(1):8-14. doi:10.14295/vittalle.v31i1.8214
6. Barros MB, Schubach A de O, 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. doi:https://doi.org/10.1086/381200
7. Barros MBL, Schubach TMP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach AO. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Pública.* 2010; 27:455-460. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892010000600007.
8. Almeida P, Giordano C. Vigilância e Cenário Epidemiológico: Esporotricose no estado do RJ. *Bol Epidemiológico Esporotricose 001/2018.* Published online 2018:1-6.
9. Nobre MO, Potter-de-Castro A, Caetano D, Leonardo-de- Souza, L Araujo-Meireles, MC Ferreira L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18:137-140.
10. Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Oliveira Nobre M, Meireles MCA. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia.* 2012;173:265-273. doi:doi: 10.1007/s11046-011-9509-4.
11. Xavier MO, Bittencourt LR, Silva CM, Vieira RS, Pereira HC. Atypical presentation of sporotrichosis: report of three cases. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:116-118. doi:http://dx.doi.org/10.1590/0037-868215282013

12. Sanchotene KO, Madrid IM, Klafke GB, et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*. 2015;58(11):652-658. doi:10.1111/myc.12414
13. Brandolt TM, Madrid IM, Poester VR, et al. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012–2017. *Med Mycol*. Published online 2018:1-7. doi:10.1093/mmy/myy082
14. Poester VR, Mattei AS, Madrid IM, et al. Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? *Zoonoses Public Health*. 2018;(June):1-7. doi:10.1111/zph.12504
15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística I. Área territorial brasileira e Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão do Brasil. Published online 2018.
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística I. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Estimativas da população residente com data de referência. Published online 2019.
17. Herzog M G. Principais portos brasileiros: análise, apresentação e estudo da infraestrutura dos portos. Monografia, Universidade Federal do Paraná. 2018.
18. Spanemberg A, Araujo R, Ravazzolo AP, Driemeier D, Driemeier RMS, Ferreira L. *Sporothrix brasiliensis* on cats with skin ulcers in Southern Brazil. *Med Mycol*. 2021;59(3):301-304. doi:10.1093/mmy/myaa083
19. Rio Grande do Sul R. Mapa das regiões de saúde. Secretaria Estadual de Saúde. Published 2014. <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/201703/28155717-mapa-das-regioes-de-saude.pdf>
20. Brasil IP. Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil. Published 2019. Accessed July 7, 2021. <http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/>
21. Xavier MO, Nobre MO, Sampaio Junior DP, et al. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 2004;34:1961-1963. doi:1963. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000600047>
22. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística I. Rio Grande do Sul, Brazil. Published 2017. <http://www.fee.rs.gov.br/3-decadas/detalhe.php?ref=02&vol=volume1>
23. Rodrigues AM, Teixeira M de M, de Hoog GS, et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6):e2281. doi:10.1371/journal.pntd.0002281
24. Poester VR, Basso RP, Stevens DA, et al. Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*. *J fungi*. 2022;8(1). doi:10.3390/jof8010070
25. Centers for Disease Control and Prevention C, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases N, Division of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases D. *Sporothrix brasiliensis*. Published 2022.

26. Etchecopaz AN, Lanza N, Toscanini MA, et al. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. *J Mycol Med*. Published online 2019:100908. doi:10.1016/j.mycmed.2019.100908
27. García Duarte JM, Wattiez Acosta VR, Fornerón Viera PML, et al. Esporotricosis transmitida por gato doméstico. Reporte de un caso familiar. *Rev del Nac*. 2017;9:67-76.
28. Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(3 Pt 1):451-459. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.046
29. Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrillón MR, et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Med Mycol*. 2013;52(1):56-64. doi:10.3109/13693786.2013.818726
30. Conselho Regional de Medicina Veterinária do RS C. Saúde Pública: CRMV-RS lança campanha de conscientização sobre Esporotricose. Published 2021. <https://caesegatos.com.br/saude-publica-crmv-rs-lanca-campanha-de-conscientizacao-sobre-esporotricose/>
31. Pereira V de A. Prefeitura de Gravataí alerta população para o aumento dos casos de esporotricose. *Jornal Agora RS*. Published 2021. <https://agoranors.com/2021/11/prefeitura-de-gravatai-alerta-populacao-para-o-aumento-dos-casos-de-esporotricose/>
32. Brasil, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico HIV/aids. Brasília. Published 2021. www.aids.gov.br
33. Poester VR, Munhoz LS, Basso RP, et al. Disseminated sporotrichosis with immune reconstitution inflammatory syndrome in an HIV patient: Case report and review of the literature. *Rev Iberoam Micol*. 2020;in press:0-21. doi:10.1016/j.optmat.2011.11.002
34. Falcão EMM, Pires MC de S, Andrade HB, et al. Zoonotic sporotrichosis with greater severity in Rio de Janeiro, Brazil: 118 hospitalizations and 11 deaths in the last 2 decades in a reference institution. *Med Mycol*. Published online March 9, 2019. doi:10.1093/mmy/myz024
35. Cordeiro FN, Bruno CB, Paula CDR de, Motta J de OC da. Ocorrência familiar de esporotricose zoonótica. *An Bras Dermatologia* . 2011;86:121-124
36. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*. 2014;10:269. doi:10.1186/s12917-014-0269-5
37. Lecca LO, Paiva MT, Oliveira CSF de, et al. Associated factors and spatial patterns of the epidemic sporotrichosis in a high density human populated area: A cross-sectional study from 2016 to 2018. *Prev Vet Med*. Published online January 1, 2019:693085. doi:10.1101/693085

38. Teles M da CF, Carneiro A, Sales AG. Boletim Epidemiológico - Situação Epidemiológica da Esporotricose em Salvador - BA. *Secr Munic Saúde Salvador Dir Vigilância da Saúde*. Published online 2019.

5 ARTIGO/MANUSCRITO 2

Diphenyl Diselenide against Experimental Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*

Lívia Silveira Munhoz, Vanice Rodrigues Poester, Jéssica Louise Benelli, Aryse Martins Melo, Mariana Rodrigues Trápaga, Cristina Wayne Nogueira, Gilson Rogério Zeni, Mariana Martins Flores, David A. Stevens, Melissa Orzechowski Xavier.

Manuscrito a ser submetido ao periódico: Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Fator de Impacto: 5.758

Diphenyl Diselenide against Experimental Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*

Lívia Silveira Munhoz ^[1], Vanice Rodrigues Poester ^[2], Jéssica Louise Benelli ^[3], Aryse Martins Melo ^[4]; Mariana Rodrigues Trápaga ^[1], Cristina Wayne Nogueira ^[2], Gilson Rogério Zeni ^[2], Mariana Martins Flores ^[2], David A. Stevens ^[5,6], Melissa Orzechowski Xavier ^[1]

[1] Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS, Brazil; [2] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil; [3] Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr. (HU-FURG), vinculado à Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH); [4] Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal. [5] California Institute for Medical Research, San Jose, CA, USA; [6] Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Stanford University Medical School, Stanford, CA, USA.

Corresponding author: Prof.^a Dr.^a Melissa Orzechowski Xavier. Laboratório de Micologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Saúde. Visconde de Paranaguá 102, Centro, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

Phone: (+55) 53-32374636/ 4634 **e-mail:** melissaxavierfurg@gmail.com

Orcid number:

Lívia Silveira Munhoz: 0000-0002-3538-5006

Vanice Rodrigues Poester: 0000-0001-7121-3861

Aryse Martins Melo: 0000-0002-6655-8715

Mariana Rodrigues Trápaga: 0000-0003-1407-8135

Jéssica Louise Benelli: 0000-0002-9309-5349

Melissa Orzechowski Xavier: 0000-0002-3883-0080

ABSTRACT (250words)

The pharmacological potential of diphenyl diselenide [(PhSe)₂], a stable organoselenium compound, has been suggested for the treatment of some injuries given its antioxidant properties. In addition, *in vitro* antifungal activity against the agent of sporotrichosis, the main emergent implantation mycoses in Brazil, is highlighted. Therefore, we aimed to evaluate the activity of (PhSe)₂, alone and in association with itraconazole, in the treatment of sporotrichosis by *S. brasiliensis* in a murine model. Sixty mice were subcutaneously infected with *S. brasiliensis* in the footpad and treated by gavage for 30

consecutive days. The six treatment groups received placebo, itraconazole – ITZ (50 mg/kg), (PhSe)₂ at 1, 5 and 10mg/kg dosages, or ITZ and (PhSe)₂ 1 mg/kg, once a day, starting seven days post-inoculation. At the end of the experiment a similar significant reduction in fungal burden of internal organs was achieved in the groups treated with ITZ or (PhSe)₂ in comparison with the control groups (placebo). Interestingly, the association of both [ITZ and (PhSe)₂ 1 mg/kg] was even better than their activity alone (p<0.001). These data are the first steps in shown the potential use of (PhSe)₂, alone and mainly in association with the drug of choice in the treatment of sporotrichosis. Further *in vivo* studies are instigated to evaluate even lower dosages of this (PhSe)₂ and/or distinct approaches of administration (acute/ subacute dosages) in the treatment of sporotrichosis.

KEYWORDS: *in vivo* model; antifungal; treatment; zoonosis; sporotrichosis; organoselenium compound; subcutaneous mycoses.

1. INTRODUCTION

Zoonotic sporotrichosis became an emergent disease in Brazil in the last decade (Brandolt et al., 2015; Gremião et al., 2020; Poester et al., 2022; Rodrigues et al., 2022). Nowadays, it is a hyperendemic mycosis with an outburst of cases identified in all regions of the country (Poester et al., 2018a; Gremião et al., 2020; Silva et al., 2021; Bento et al., 2021; Andrade et al., 2022). Factors such as behavior habits of domestic cats and their high susceptibility to develop a severe disease by *Sporothrix brasiliensis*, the highest virulent fungal species in the *Sporothrix* complex, and the lack of public health politics to control and prevent this disease, allowed its current situation of a national public health problem (Gremião et al., 2015, Sanchotene et al., 2015, Gremião et al., 2017; Silva et al., 2018; Munhoz et al., 2022).

One of the limiting factors to control sporotrichosis is the difficulty on the treatment of infected cats, which are the main victims of the disease and acts as the central pillar in the fungal transmission to humans and other animals (Barros et al., 2004; Gremião et al., 2017; 2021). The first-line treatment is the oral antifungal itraconazole (ITZ) (Rossow et al., 2020; Gremião et al., 2021; Thompson et al., 2021; Poester et al., 2022). The therapy with this drug of choice is often long-term, and associated with expansive costs, therapeutic failures, and adverse effects (Almeida et al., 2017; Poester et al., 2018a). In addition, the acquired resistance of *Sporothrix* spp. to ITZ is recently described (Nakasu et al., 2020).

Given that, the search for alternative therapies is necessary. Therefore, diphenyl diselenide (PhSe)₂, a lipophilic, simple, and stable organoselenium compound, is a potential drug to be studied, with *in vitro* activity, alone and in combination with ITZ, against the three

main clinical species of *Sporothrix* spp., including *S. brasiliensis* (Poester et al., 2018b). Besides that, (PhSe)₂ deposits in adipose tissue and has hepatoprotective activity, which could be benefic properties to the sporotrichosis treatment (Nogueira et al., 2003; Wilhelm et al., 2009; Doleski et al., 2017).

(PhSe)₂ mimics glutathione peroxidases (GPXs) interacting with the thiols group (Nogueira & Rocha, 2010). Dose-dependent responses are reported in host and fungal cells, acting as an antioxidant molecule to mammalian cells, and as a pro-oxidant compound to fungal cells by the generation and accumulation of reactive oxygen species, inducing apoptosis (Nogueira et al., 2004; Benelli et al., 2021). Although it is considered a janus-faced molecule, being toxicity or therapeutic effects dose-dependent, a long-term *in vivo* study in mammalian model using oral doses of 30 mg/kg (PhSe)₂ (de Bem et al., 2006; 2007), showed low incidence of adverse effects. Therefore, we aimed to evaluate the (PhSe)₂ alone and its association with the first-choice drug (itraconazole) in the treatment of sporotrichosis in a murine model infected by *S. brasiliensis* and compare it to the treatment with itraconazole.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Drugs and Fungal Isolate

ITZ was obtained commercially (Sporanox®, Janssen-Cilag Pharmaceuticals Inc., Beerse, Belgium) and (PhSe)₂ compound (Figure 1) was synthesized by the Chemistry Department of the Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil (Braga et al., 1997).

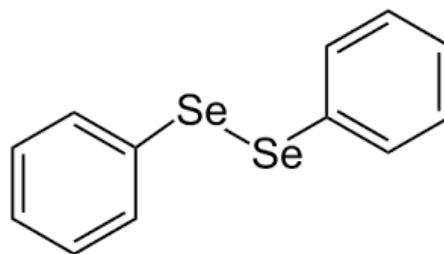


Figure 1. Chemical structure of diphenyl diselenide.

A *Sporothrix brasiliensis* clinical isolate (M1078), from a feline sporotrichosis case from Southern Rio Grande do Sul, Brazil, previously identified by molecular method (Polymerase Chain Reaction - PCR species-specific) (Rodrigues et al., 2014) was used to the experimental infection. The isolate was stored at the fungal collection of the Mycology Lab from the Medicine Faculty of Federal University of Rio Grande (FaMed-FURG), Brazil. Prior to the mice infection, the isolate M1078 was passed through an animal model (BALB/cJ) and then was re-isolated as a monosporic colony to the inoculum standardization.

2.2. *S. brasiliensis* yeast cells inoculum for experimental infection

The monosporic colony was initially grown in brain-heart-infusion agar slants (BHI) (Kasvi®, São José dos Pinhais, PR, Brazil) at 37°C, until complete reversion to the yeast phase. Then, the total growth (eluted and concentrated) was transferred to 150 mL of BHI broth and incubated at 37°C for 10 days in a rotary shaker with constant agitation (150 rpm/min). Yeast cultures were washed three times with phosphate buffered saline (PBS), centrifuged at 800g for 15 min, and finally suspended in sterile PBS. Yeast cells were adjusted using a hemocytometer to a final concentration of 10⁹ colony-forming units (CFU)/mL. Inoculum viability and concentration were verified by plating 10-fold dilutions of the yeast cell suspension on PDA medium immediately after inoculation and determining the number CFUs after 7 days of incubation at 37°C.

2.3. Subcutaneous infection

We used a modified version of the experimental model of subcutaneous murine sporotrichosis described by Della Terra et al., 2017. Briefly, all mice were anesthetized with 0.1mg/kg xylazine and 10mg/kg ketamine and the left hind paw was infected with 10 µL of the inoculum, resulting in final concentration of 10⁷ *S. brasiliensis* yeasts per animal.

2.4. Experimental Design

Sixty male Specific Pathogen Free (SPF) BALB/cJ mice with a mean weight of 20g (5 to 7 weeks-old) were obtained from Center for Experimental Biological Models of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (CEMBE – PUC/RS). Animals were housed in temperature-controlled rooms at 22°C, five per cage, in standard boxes with *ad libitum* access to food and water.

Mice were divided into six treatment groups with 10 animals each, as follows: G1 control group (placebo); G2 treatment with drug of choice - ITZ (50 mg/kg); G3 to G5 treatment groups with 1, 5 and 10 mg/kg of (PhSe)₂, respectively; and G6 receiving ITZ (50mg/kg) and (PhSe)₂ 1 mg/kg (in association). All the treatments started seven days post-inoculation (p.i), after all animals presents sporotrichosis lesion in the footpad. All groups received oral administration, by gavage, once a day, for 30 days (Figure 2).

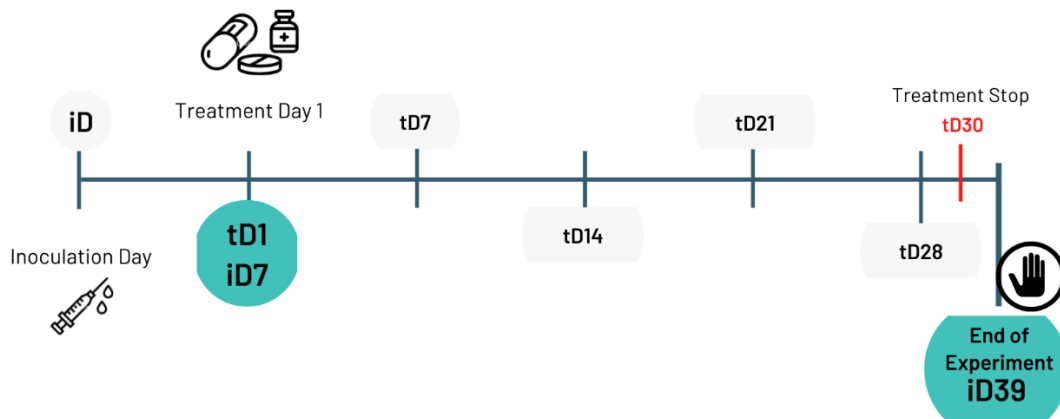


Figure 2. Schematic experimental design to evaluate diphenyl diselenide in the treatment of sporotrichosis. The strategy used to develop the murine subcutaneous infection and antifungal treatment was represented as a timeline. Yeasts of *S. brasiliensis* (5.4×10^7 cells) were inoculated by subcutaneously injection in the left hind paw. Daily treatment started in the 7th-day post-inoculation, once ulcerate lesions were already present in all mice. All treatments were performed by gavage for 30 days and weekly all the animals were clinical evaluated and weight. tD: treatment day; iD: inoculation day.

Mice were monitored daily to evaluate behavior and physical condition, and to check for mortality. Weight was weekly measured, and on the 39th-day p.i. (48 h after the end of the 30 days treatments) animals were euthanized with a lethal dose of xylazine and ketamine for mycological and histopathological evaluation of the organs.

2.5. Analysis

2.5.1. Survival assay and weight loss

All mice were daily observed, and mortality was recorded over the 5 weeks between infection and the end of the experiment. The percentage of weight loss during the disease progression was determined by measuring each animal's weight every week post-inoculation (5 weeks) and comparing it to the animal's weight on the day of inoculation.

2.5.2. Clinical evaluation

Weekly all animals were clinically evaluated, and a photography register was performed. Data regarding their physical condition, the progression of the local lesion in the site of infection (left hind pad), lymphadenomegaly, clinical deterioration (apathy, ruffled hair, cachexia), and distribution of the cutaneous lesions along non-contiguous sites were collected.

2.5.3. Mycological analyses

2.5.3.1. CFU Assay

At the necropsy, samples of lungs, liver, brain, kidneys, testicle, and footpad (infection site) were collected aseptically, weighed, macerated, and homogenized (XFK High speed homogenizer) in saline solution for mycological analysis. Fungal burden in each organ was measured by quantitatively CFU. To estimate fungal load in affected organs, the homogenate

sample of each organ was plated pure (500 µl) and through serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) (50 µl) onto BHI plates with 50 µg/ml chloramphenicol (Sigma Chemical Co., USA) and incubated at 30°C for 7 days. After incubation, colonies were counted to determine the CFU per gram of tissue. Fungal burden was analyzed in internal organs, and in the site of infection (footpad).

2.5.3.2. Histopathological Assay

A sample of liver, lungs, kidneys, brain, and testicle were fixed in 10% buffered formalin for histopathological analyses. Paraffin-embedded tissue sections (3-µm-thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E), alcian blue, and periodic acid Schiff (PAS) for observation by light microscopy using an Olympus BX51 microscope (Tokyo, Japan) equipped with an Olympus SC100 camera. Tissue injury in histopathology analyses were categorized as 1: presence of granuloma without necrosis; 2: presence of granuloma with necrosis; or 3: non-organized inflammatory response (incompletely granuloma) with the presence of high amount of blastoconidia dispersed in the tissue.

2.5.4. Statistics Analysis

For survival assay, data were analyzed by Kaplan-Meier survival plots followed by long-rank test. The weight loss assay was calculated considering the percentage of loss and/or increase between the day of infection and the end of the treatment. The results were compared among groups and analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Tukey.

The CFU/gram of tissue (g) of *S. brasiliensis* and histopathological results in internal organs (lung, liver, brain, kidney, and testicle) were compared among the groups using non-parametric tests, Kruskal-Wallis combined with Mann-Whitney and Cross tab with Chi-square, respectively. It was included in these analyses (CFU/g or histopathological founds vs groups) only the animals alive at the end of the experimental period (euthanized).

The correlation between the outcome (death/life: death for animals that died before the end of treatment; and life for animals that completed the treatment period) and CFU/g internal organs was analyzed by Spearman's Rank correlation coefficient. In addition, the outcome (death/life) was associated to histopathological analysis of internal tissues. These data were analyzed by Pearson's chi-square.

A P value ≤ 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using statistical program SPSS 20.0.

2.6. Ethics Statement

All procedures were conducted according to the National Institutes of Health Animal and Care Guidelines and the project was approved by the Animal Use Ethics Committee of the FURG (process number CEUA-FURG P046/2019).

3. RESULTS

At the beginning of the treatments (7th day p.i.) all animals had the same patterns of ulcerate and exudative lesions in their left hind paw (inoculation site) (Figure 3). During the treatment period, it was possible to observe that lesions in other non-contiguous anatomical sites started to appear within 21 days p.i.. On the 28th day p.i., more than 40% of the animals showed evident signs of dissemination, such as anorexia, bristly hair, lesions on the forelimb (18.3%), opposite hind limb (20.4%) and tail (10.5%). On the 35th day p.i., 68% of the animals had some change in clinical evaluation and/or anorexia and lethargy, independently of the treatment group. Lesions in the tail had an increase of 41% in the last week of clinical evaluation.

Mice from the G6 [ITZ + (PhSe)₂ 1mg/kg] were the only ones that at the 28th day p.i. none lesions in another anatomical site could be detected. At the end of the experiment, 22% of the animals from G6 [ITZ + (PhSe)₂ 1mg/kg] had lesions in other non-contiguous anatomical sites, while this rate was 88% in the group with the treatment of first choice (G2), and 100% in the Placebo group (G1).

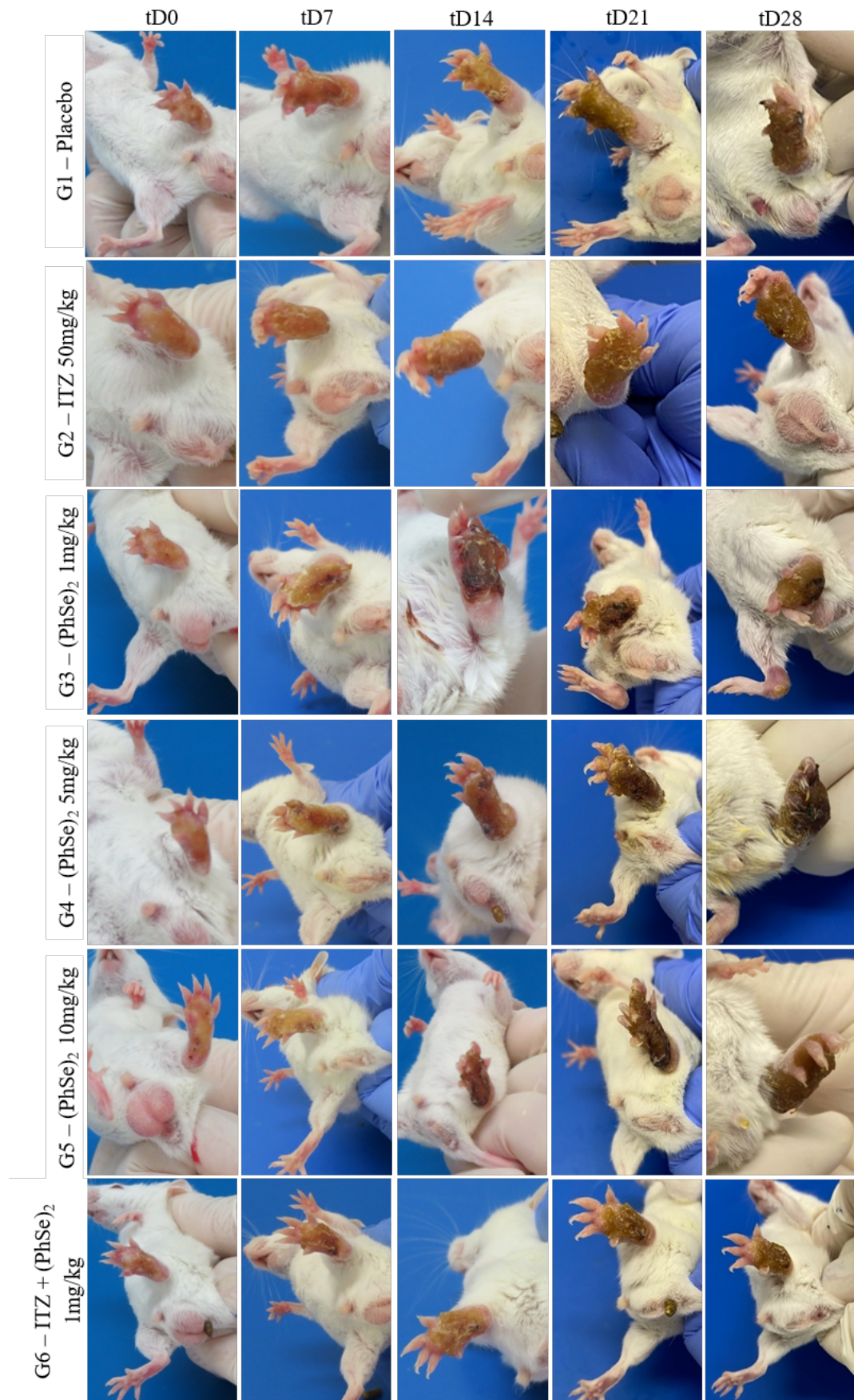


Figure 3. Mice infected with *S. brasiliensis* M1078 into the left hind paw. The images shown here correspond to days 1 to 28 of treatment started after 7 days of infection.

A similar lost weight pattern ($p>0.05$) was observed in all groups between the day of infection and day 0 of treatment (7th day p.i.), however, at the end of the experiment, the two groups with the highest $(\text{PhSe})_2$ dosages (G4 and G5) had a significantly higher weight loss (Table 1).

Table 1. The percentage of weight loss at the end of the experiment expressed as mean and standard deviation according to the treatment group.

Groups	7th day p.i. (% of tD0-iD)	During treatment (% of tD30-tD0)
G1 – Placebo	10.27 ± 5.14 ^a	4.59 ± 6.42 ^{ab}
G2 - ITZ 50mg/kg	7.69 ± 3.34 ^a	-5.69 ± 8.81 ^a
G3 - $(\text{PhSe})_2$ 1mg/kg	8.67 ± 4.25 ^a	2.79 ± 12.86 ^{ab}
G4 - $(\text{PhSe})_2$ 5 mg/kg	6.08 ± 8.52 ^a	23.50 ± 5.29 ^c
G5 - $(\text{PhSe})_2$ 10 mg/kg	5.92 ± 4.76 ^a	16.11 ± 10.19 ^{bc}
G6 – ITZ + $(\text{PhSe})_2$ 1mg/kg	7.69 ± 7.84 ^a	-4.42 ± 13.30 ^a

Distinct letters denote significative difference between groups in the same column ($p<0.05$). p.i.: post-infection; tD: treatment day; iD: inoculation day. ANOVA followed by post-hoc Tukey.

Mortality rate ranged from 10% to 50% of the animals in the groups. Although the G4 [$(\text{PhSe})_2$ 5 mg/kg] had the highest rate, no significantly difference was observed between groups ($p=0.216$) (Figure 4).

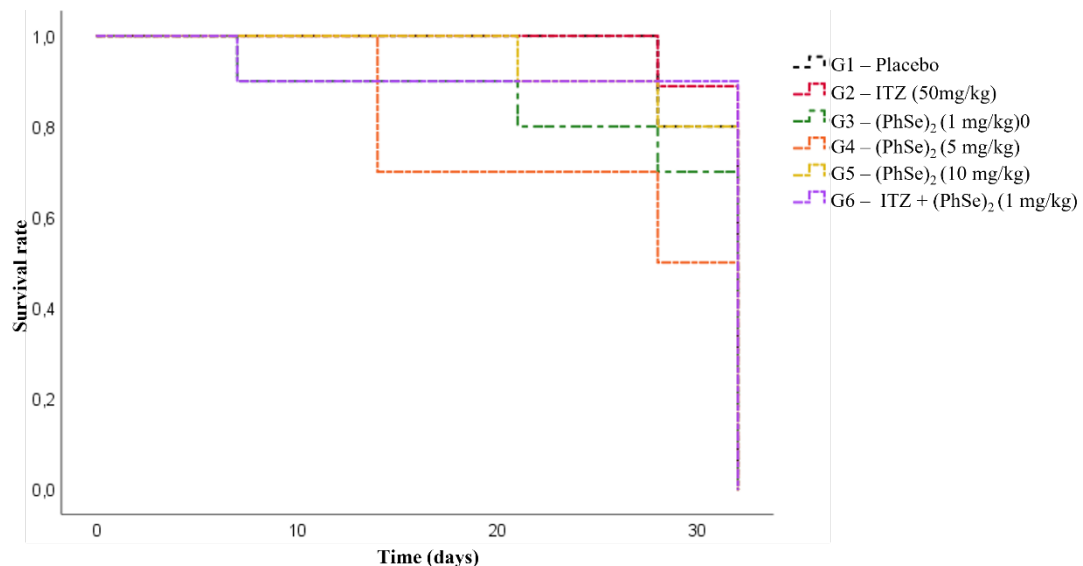


Figure 4. Survival rate of BALB/cJ mice infected with *Sporothrix brasiliensis* (M1078) yeasts and subjected to one of the following groups. Kaplan-Meier survival plots followed by long-rank test.

Histopathology of internal organs showed a higher number of the pattern 3 injury (dispersed yeasts in internal organs with non-organized inflammatory response) from animals that died during the treatment (outcome: death) in comparison with those alive at the end of the experiment ($p<0.001$). In addition, the amount of CFU from internal organs of the animals with

death as outcome was twice bigger than the CFU of the animals alive at the end of the experiment ($p < 0.001$). It was possible to observe a moderate to strong correlation of fungal burden of internal organs and mortality ($r = 0.41$ to 0.73 , $p < 0.05$).

S. brasiliensis colonies were recovered in more than two internal organs from all of the mice at the end of the treatment, including from the brain of 98% of the animals (59/60). Although a high amount of fungal burden at the left hind pads (infection site) of mice from all groups ($> 10^4$ CFU/g) was observed ($p < 0.05$), we could show a significant fungal burden reduction recovered from internal organs (liver, lungs, kidneys, brain, and testicle) in the groups treated with ITZ 50mg/kg and/or treated with $(\text{PhSe})_2$ 1mg/kg. Both groups treated with these drugs alone resulted in a minor number of yeasts in internal organs in comparison with the placebo group (G1) ($p < 0.05$). An even better result in this parameter was obtained in animals treated with ITZ associated with $(\text{PhSe})_2$ 1mg/kg (G6), with a robust and significant difference from all other treatment groups ($p < 0.001$) (Figure 5). On the other hand, animals treated with highest doses of $(\text{PhSe})_2$ (5 and 10 mg/kg – G4 and G5) did not differ statistically from the placebo group. Data on CFU per internal organ can be viewed in the supplementary material (Figure S1).

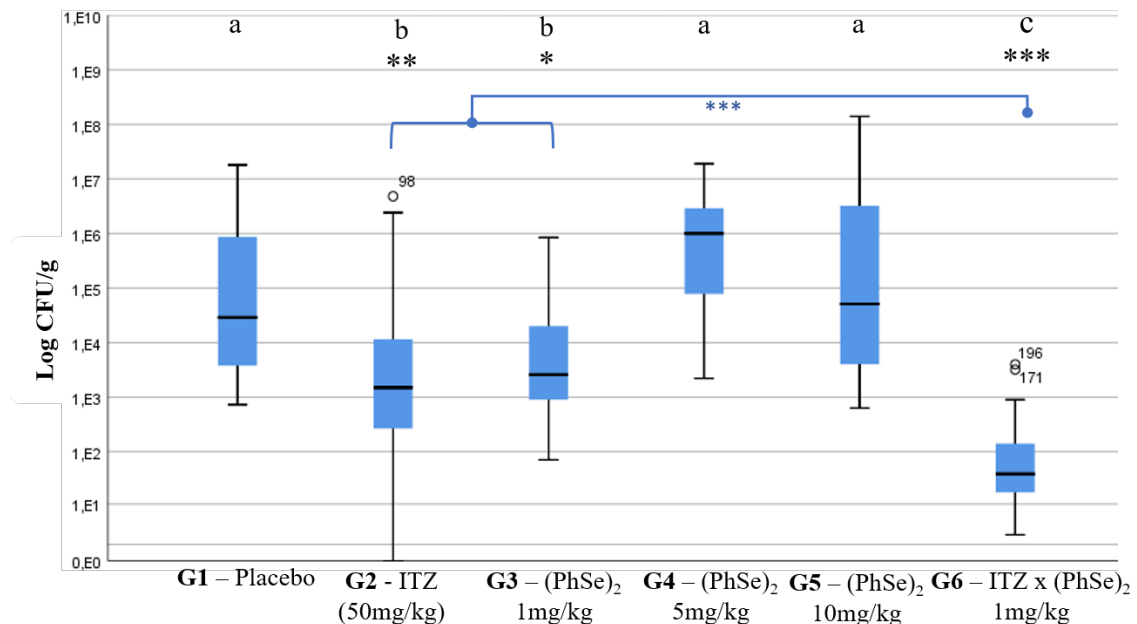


Figure 5. Fungal burden (colony-forming units - CFU/g – scale log) of internal organs (lungs, liver, kidneys, brain and testicle) in the groups evaluated. Distinct letters denote significative difference between groups. Black asterisks ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$ $***p < 0.0001$) above the plots represent the degree of significance of the groups in relation to G1 – Placebo. Blue asterisk ($***p < 0.001$) connected with blue line represent the degree of significance of drugs alone in relation to its association (G6) – ITZ x $(\text{PhSe})_2$ 1mg/kg. Kruskal-Wallis combined with Mann-whitney.

Histopathological assay of samples from internal organs at the end of the experiment showed that mature granuloma without necrosis (Pattern 1) was the main pattern of tissue injury

detected in G2 (ITZ 50mg/kg), G3 [(PhSe)₂ 1mg/kg], and G6 [ITZ + (PhSe)₂ 1mg/kg] corresponding to 85.7%, 77.8%, and 75% similar to the rate from placebo group (83.3%). On the contrary, groups treated with higher doses of (PhSe)₂ (G4 and G5) showed the pattern 2 (granuloma with necrosis, especially caseous necrosis) and/or pattern 3 (high number of dispersed yeasts in the tissue without granuloma formation) as the main patterns, corresponding to a rate of 60% from both groups. This last pattern (without granuloma) was exclusively detected in G5 [(PhSe)₂ 10 mg/kg], in a total of 27.3% of the animals from this group. A representative image of the histopathological categorization pattern is shown in figure 6.

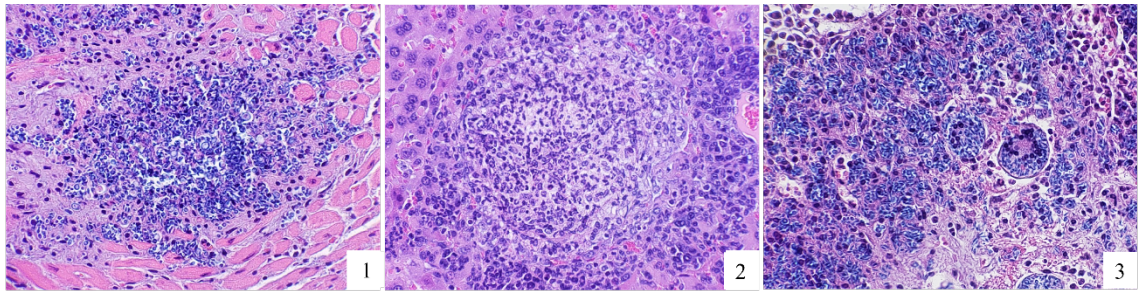


Figure 6. Representative images of histopathological pattern of lesions as: (1) robust inflammatory response: granulomatous pattern with few yeast cells; (2) presence of caseating granuloma; (3) non-organized inflammatory response: well-delimited area with myriads of infiltrated with a high number of yeasts for a variable number of macrophages without granuloma formation.

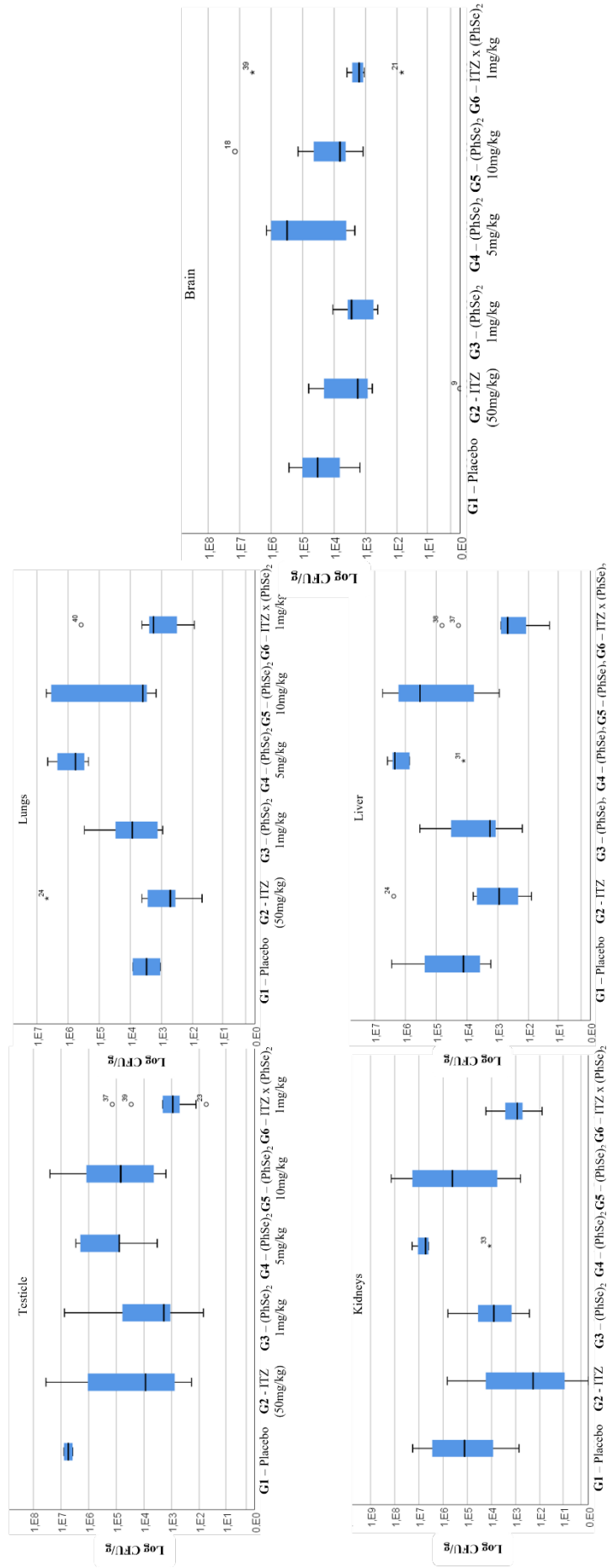


Figure S1. CFU per organ BALB/cJ male mice 30 days post-treatment. Data are expressed as log CFU/g of tissue in the liver, kidneys, lungs, brain, and testicle.

4. DISCUSSION

Preclinical studies evaluating potential new drugs are recent essential goals for the treatment of fungal diseases (Sharma et al., 2022). Specifically, regarding zoonotic sporotrichosis, the search for new drugs is urgent to discover another efficient treatment, or an improvement in the treatment of choice, which could lead to a shorter period of therapy. This approach would reduce the abandonment rate of infected cats, contributing to the control of the disease, impacting areas where the disease is a serious public health problem (Sanchoetene et al., 2015; Poester et al., 2021; Munhoz et al., 2022; Rabello et al., 2022). In this context, our study is pioneer in shown the use of (PhSe)₂, an organoselenium compound, in the sporotrichosis treatment in an inbred murine model, adding data regarding another possible pharmacological application of this compound, alone or mainly, in association with the drug of choice.

Robust scientific data showing an antioxidant activity of (PhSe)₂ in *in vivo* models argues in favor of its therapeutic potential (Nogueira & Rocha, 2010; Nogueira et al., 2021) and *in vitro* results supports its promising activity as anti-*S. brasiliensis* (Poester et al., 2018b). Corroborating with these data, the (PhSe)₂ therapeutic scheme proposed at a dosage of 1 mg/kg/day for 30 days showed potential activity against our model of disseminated experimental sporotrichosis, showing a significative reduction in fungal burden, with the same effect of the treatment of choice for sporotrichosis (ITZ). In addition, we highlight its beneficial interaction with itraconazole, since the group treated with these two drugs in association showed an expressive reduction in fungal load and improvement in clinical parameters compared to the other groups. This finding is in agreement with the *in vitro* results described by Poester et al., (2018) showing additive or synergistic effect in the interaction between these two compounds.

On the other hand, higher dosages (5 and 10mg/kg) of (PhSe)₂ subchronically used in our study, had the opposite effect, increasing the clinical manifestation of sporotrichosis, and mortality rate. Interestingly, these dosages are lower than those already described as safe in the literature (de Bem et al., 2006; 2007). However, it is well known that the administration route of the (PhSe)₂, dose adjustment and animal model used are pivotal factors that could directly interfere with the effectiveness or toxicity of this compound (Savegnago et al., 2007; Rosa et al., 2007; Nogueira & Rocha, 2010; Nogueira et al., 2021). In fact, *in vivo* data shows that the interaction of (PhSe)₂ with thiols can dictate either its toxicological or pharmacological property. Selenium (Se) compounds are considered “Janus compounds”, *i.e.*, double face drug, in view of its dose-dependent effect: in low doses, it is beneficial, whereas in high doses is

toxic. The threshold dose for these opposing properties has not yet been established (Nogueira & Rocha, 2010).

To date, the toxicological implications from acute and chronic exposures to organoselenium compounds on mammalian models have not been extensively reported in the literature (Nogueira et al, 2021). Isogenic mice are strongly indicated for studies of infectious diseases (Sarkar & Heise, 2019) however, most toxicological studies are carried on outbred animals (Festing, 2010). Thus, we highlight that a fine adjustment in the tested dosages of (PhSe)₂ is required to use isogenic mice, taking into account the infectious agent (*S. brasiliensis*), treatment period and the greater sensitivity of inbred lineages. The effectiveness of (PhSe)₂ against other infectious diseases (*Toxoplasma gondii* and Herpes simplex 2) in inbred mice has been described (Sartori et al., 2016; Doleski et al., 2017), however, these studies did not employ a period of subchronic to chronic treatment and a high virulence profile agent.

Similarly to data evidenced by Bhattacharjee et al., (2019), which used 2mg/kg of (PhSe)₂ per 28 days in a mice model, in our study we also observed a significant reduction of body weight jointly a worsening in the other clinical parameters (such as ruffled hair since the first week of treatment – data no shown) in mice treated with the higher doses of the compound (G4 and G5). It is well known that one of the major characteristics of Se toxicity is the growth retardation of animals, being one of the best indicators of its toxic effects (Bhattacharjee et al., 2019). Furthermore, supplementing diets with above-adequate levels of Se can also affect the immune cell function, since when in excess, their prooxidant properties generate superoxide damage cellular components (Huang et al., 2012). This immunosuppression mechanism could be the reason for a higher fungal burden in our groups treated with high dosages of (PhSe)₂.

Although the inoculum standardization used in our study to the subcutaneous infection was based on previous studies (Fernandes et al., 2013; Della Terra et al., 2017; de Almeida et al., 2018), the severe and disseminated presentation of sporotrichosis reproduced in all of the mice is a limitation of our study, since neither the group of animals treated with the drug of choice (itraconazole), neither the potentialized activity with the association of (PhSe)₂ could recovered (cure) from the disease. In fact, virulence in *S. brasiliensis* is strain-dependent, allowing them to disseminate from the subcutaneous site of infection (footpad) to internal organs (Della Terra et al., 2017).

Furthermore, it is known that the variation in pathogenicity may be due to combination of factors such as fungal genotype, different mice lineages, route of infection (subcutaneous, intraperitoneal, or intravenous) and inoculum concentration (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009;

Fernandes et al., 2013; Ishida et al., 2014; Almeida-Paes et al., 2015; Della Terra et al., 2017; Oliveira et al., 2017; de Almeida et al., 2018; Bonilla et al., 2021; Côrrea-Moreira et al., 2021). The *S. brasiliensis* isolate used in our *in vivo* model is highly virulent, even had being able to surpass the blood-brain barrier. It is a feline-derived strain from a hyperendemic area of cat-transmitted sporotrichosis in the state of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil (Sanhotene et al., 2015; Gremião et al., 2017; Poester et al., 2018, Munhoz et al., 2022). Its interestingly to highlight that strains from this region (RS, Brazil) are associated with different genotype and with high virulence in comparison with isolates from other hyperendemic areas (Rodrigues et al., 2013; Della Terra et al., 2017).

In agreement with a restrict number of available preclinical studies on the use of (PhSe)₂ as antifungals (Loreto et al., 2012), our results, showing the *in vivo* efficacy of (PhSe)₂ in the minor dosage tested, especially when associated with the ITZ, highlight the potential of this compound to be used in the treatment of sporotrichosis by *S. brasiliensis*. Since (PhSe)₂ is a janus-faced compound, further studies to evaluate this compound in an animal model with fixed/lymphocutaneous presentation of the disease, and to evaluate even lower dosages of this compound alone or in combination with other antifungals for the treatment of sporotrichosis are necessary to promote more evidence of its therapeutic characteristics and lead to a better understanding of its application as an antifungal drug. In view of our promising results, we suggest that treatment with (PhSe)₂ may be a future alternative therapy to control sporotrichosis.

5. ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge Professor G. Zeni of Post-graduation program in Toxicological Biochemistry (UFSM, RS, Brazil), for the synthesis of diphenyl diselenide. **Financial support:** Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS) – PqG 05/2019.

REFERENCES

- Almeida-Paes, R., De Oliveira, L. C., Oliveira, M. M. E., Gutierrez-Galhardo, M. C., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2015). Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the sporothrix complex. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/212308>
- Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Mariné, M., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2009). Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(7), 651–655. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02824.x>

- Barros, M. B. D. L., Schubach, A. D. O., Do Valle, A. C. F., Galhardo, M. C. G., Conceição-Silva, F., Schubach, T. M. P., Reis, R. S., Wanke, B., Marzochi, K. B. F., & Conceição, M. J. (2004). Cat-Transmitted Sporotrichosis Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a Series of Cases. *Clinical Infectious Diseases*, 38(4), 529–535. <https://doi.org/10.1086/381200>
- Benelli, J. L., Poester, V. R., Munhoz, L. S., Melo, A. M., Trápaga, M. R., Stevens, D. A., & Xavier, M. O. (2021). Ebselen and diphenyl diselenide against fungal pathogens: A systematic review. *Medical Mycology*, 59(5), 409–421. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa115>
- Bhattacharjee, A., Basu, A., & Bhattacharya, S. (2019). Selenium nanoparticles are less toxic than inorganic and organic selenium to mice in vivo. *Nucleus (India)*, 62(3), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s13237-019-00303-1>
- Bonilla, J. J. A., Honorato, L., Haranahalli, K., Gremião, I. D. F., Pereira, S. A., Guimarães, A., De Souza Baptista, A. R., De Melo Tavares, P., Rodrigues, M. L., Miranda, K., Ojima, I., Del Poeta, M., & Nimrichter, L. (2021). Antifungal activity of acylhydrazone derivatives against sporothrix spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.02593-20>
- Braga, A. L., Zeni, G. R., Andrade, L. H., & Silveira, C. da C. (1997). Stereoconservative Formation and Reactivity of alfa-Chalcogen-Functionalized Vinylolithium Compounds from alfa-Bromo-vinylic Chalcogenides. *Synlett*, 5, 595–596.
- Brandolt, T. M., Madrid, I. M., Poester, V. R., Sanchotene, K. O., Basso, R. P., Klafke, G. B., Rodrigues, M. de L., & Xavier, M. O. (2018). Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012-2017. *Medical Mycology*. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy082>
- Corrêa-Moreira, D., Menezes, R. C., Romeo, O., Borba, C. M., & Oliveira, M. M. E. (2021). Clinical and Anatomopathological Evaluation of BALB/c Murine Models Infected with Isolates of Seven Pathogenic Sporothrix Species. *Pathogens*, 10(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121647>
- de Almeida, J. R. F., Santiago, K. L., Kaihama, G. H., Maranhão, A. Q., Brígido, M. de M., & de Almeida, S. R. (2017). The efficacy of humanized antibody against the Sporothrix antigen, gp70, in promoting phagocytosis and reducing disease burden. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00345>
- De Almeida, J. R. F., Jannuzzi, G. P., Kaihama, G. H., Breda, L. C. D., Ferreira, K. S., & De Almeida, S. R. (2018). An immunoproteomic approach revealing peptides from Sporothrix brasiliensis that induce a cellular immune response in subcutaneous sporotrichosis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22709-8>
- de Bem, A. F., de Lima Portella, R., Perottoni, J., Becker, E., Bohrer, D., Paixão, M. W., Nogueira, C. W., Zeni, G., & Rocha, J. B. T. (2006). Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. *Chemico-Biological Interactions*, 162(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.04.005>

- De Bem, A. F., Portella, R. D. L., Farina, M., Perottoni, J., Paixão, M. W., Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. T. (2007). Low toxicity of diphenyl diselenide in rabbits: A long-term study. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *101*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00073.x>
- Della Terra, P. P., Rodrigues, A. M., Fernandes, G. F., Nishikaku, A. S., Burger, E., & de Camargo, Z. P. (2017). Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(8), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005903>
- Doleski, P. H., Ten Caten, M. V., Passos, D. F., Castilhos, L. G., Leal, D. B. R., Machado, V. S., Bottari, N. B., Vogel, F. F., Mendes, R. E., & da Silva, A. S. (2017). Toxoplasmosis treatment with diphenyl diselenide in infected mice modulates the activity of purinergic enzymes and reduces inflammation in spleen. *Experimental Parasitology*, *181*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.07.001>
- Fernandes, G. F., dos Santos, P. O., Rodrigues, A. M., Sasaki, A. A., Burger, E., & de Camargo, Z. P. (2013). Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*, *4*(3), 241–249. <https://doi.org/10.4161/viru.23112>
- Festing, M. F. W. (2010). Invited review: Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicologic Pathology*, *38*(5), 681–690. <https://doi.org/10.1177/0192623310373776>
- Gremião, I. D. F., Miranda, L. H. M., Reis, E. G., Rodrigues, A. M., & Pereira, S. A. (2017). Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathogens*, *13*(1), 2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>
- Gremião, I. D. F., Menezes, R. C., Schubach, T. M. P., Figueiredo, A. B. F., Cavalcanti, M. C. H., & Pereira, S. A. (2014). Feline sporotrichosis: Epidemiological and clinical aspects. *Medical Mycology*, *53*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu061>
- Gremião, I. D. F., Da Rocha, E. M. D. S., Montenegro, H., Carneiro, A. J. B., Xavier, M. O., De Farias, M. R., Monti, F., Mansho, W., Pereira, R. H. de M. A., Pereira, S. A., & Lopes-Bezerra, L. M. (2021). Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Brazilian Journal of Microbiology*, 107–124. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00365-3/Published>
- Gremião, I. D. F., Marques, M., Oliveira, E., de Miranda, L. H. M., Freitas, D. F. S., & Pereira, S. A. (2020). Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *26*(3), 621–624. <https://doi.org/10.3201/eid2603.190803>
- Helena Paz Andrade, E., Valgas Bastos, C., Vieira da Silva, A., Magela Moreira, S., Gonçalves de Araújo Costa, T., Alves Salvato, L., Angelini Colombo, S., Stefanie Fonseca de Oliveira, C., Ferreira de Magalhães Soares, D., Moura Keller, K., & Isabel de Azevedo, M. (n.d.). Case Report doi Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Household outbreak of sporotrichosis: towards the One Health approach.

Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2022.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0021-2022>

- Huang, Z., Rose, A. H., & Hoffmann, P. R. (2012). The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, *16*(7), 705–743. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4145>
- Ishida, K., De Castro, R. A., Dos Santos, L. P. B., Quintella, L. P., Lopes-Bezerra, L. M., & Rozental, S. (2014). Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. *Medical Mycology*, *53*(1), 34–41. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu050>
- Lio De Oliveira Bento Id, A., Soares De Sena Costa, A., Lopes Lima, S., Do, M., Alvesid, M., Salles De Azevedo Melo, A., Messias Rodriguesid, A., Plinio Da Silva-Rochaid, W., Milan, E. P., & Chavesid, G. M. (2021). *The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to Sporothrix brasiliensis in Brazil towards the Northeast region*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009693>
- Loreto, É. S., Alves, S. H., Santurio, J. M., Nogueira, C. W., & Zeni, G. (2012). Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Veterinary Microbiology*, *156*(1–2), 222–226. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.008>
- Munhoz, L. S., Poester, V. R., Bittencourt, C., Trápaga, M. R., Madrid, I. M., Louise, J., Stevens, D. A., & Xavier, M. O. (2022). Update of the Epidemiology of the Sporotrichosis Epidemic in the state of Rio Grande do Sul , Brazil. *Mycoses*, *00*(April), 1–7. <https://doi.org/10.1111/myc.13497>
- Nakasu, C. C. T., Waller, S. B., Ripoll, M. K., Ferreira, M. R. A., Conceição, F. R., Gomes, A. dos R., Osório, L. da G., De Faria, R. O., & Cleff, M. B. (2020). Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(1), 163–171. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00290-5>
- Nogueira, C. W., Barbosa, N. V, & Rocha, J. B. T. (2021). *Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update*. *95*, 1179–1226. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03003-5>
- Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. T. (2011). Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Archives of Toxicology*, *85*(11), 1313–1359. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0720-3>
- Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. T. (2010). Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *21*(11), 2055–2071. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010001100006>
- Nogueira, C. W., Zeni, G., & Rocha, J. B. T. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews*, *104*(12), 6255–6285. <https://doi.org/10.1021/cr0406559>

- Nogueira, C. W., Quinhones, E. B., Jung, E. A., Zeni, G., & Rocha, J. B. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 52(2), 56–63. <https://doi.org/10.1007/s000110300001>
- Oliveira, A. H., de Oliveira, G. G., Carnevale Neto, F., Portuondo, D. F., Batista-Duarte, A., & Carlos, I. Z. (2017). Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 195(November 2016), 266. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.030>
- Poester, V. R., Basso, R. P., Stevens, D. A., Munhoz, L. S., Rabello, V. B. de S., Almeida-Paes, R., Zancopé-Oliveira, R. M., Zanchi, M., Benelli, J. L., & Xavier, M. O. (2022). Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Journal of Fungi*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/jof8010070>
- Poester, V. R., Mattei, A. S., Madrid, I. M., Pereira, J. T. B., Klafke, G. B., Sanchotene, K. O., Brandolt, T. M., & Xavier, M. O. (2018). Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? *Zoonoses and Public Health*, 65(7), 815–821. <https://doi.org/10.1111/zph.12504>
- Poester, V. R., Stevens, D. A., Basso, R. P., Munhoz, L. S., Zanchi, M., Benelli, J. L., Klafke, G. B., Cardone, S., & Xavier, M. O. (2021). CATastrophe: Response to the challenges of zoonotic sporotrichosis in southern Brazil. *Mycoses*, June, 1–5. <https://doi.org/10.1111/myc.13363>
- Poester, V. R., Mattei, A. S., Mendes, J. F., Klafke, G. B., Ramis, I. B., Sanchotene, K. O., & Xavier, M. O. (2018). Antifungal activity of diphenyl diselenide alone and in combination with itraconazole against *Sporothrix brasiliensis*. *Medical Mycology*, 57(3), 328–331. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy044>
- Rabello, V. B. S., Almeida-Silva, F., Scramignon-Costa, B. de S., Motta, B. da S., de Macedo, P. M., Teixeira, M. de M., Almeida-Paes, R., Irinyi, L., Meyer, W., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2022). Environmental Isolation of *Sporothrix brasiliensis* in an Area with Recurrent Feline Sporotrichosis Cases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.894297>
- Rodrigues, A. M., de Hoog, G. S., de Cássia Pires, D., Brihante, R. S. N., da Costa Sidrim, J. J., Gadelha, M. F., Colombo, A. L., & De Camargo, Z. P. (2014). Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-219>
- Rodrigues, A. M., Gonçalves, S. S., de Carvalho, J., Borba-Santos, L. P., Rozental, S., & de Camargo, Z. (2022). Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends Anderson. *Journal of Fungi*, 8, 776. <https://doi.org/10.3390/jof8080776>
- Rosa, R. M., Roesler, R., Braga, A. L., Saffi, J., & Henriques, J. A. P. (2007). Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Brazilian Journal of*

Medical and Biological Research, 40(10), 1287–1304. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000171>

- Rossow, J. A., Queiroz-Telles, F., Caceres, D. H., Beer, K. D., Jackson, B. R., Pereira, J. G., Gremião, I. D. F., & Pereira, S. A. (2020). A one health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in south america. *Journal of Fungi*, 6(4), 1–27. <https://doi.org/10.3390/jof6040247>
- Sanchotene, K. O., Madrid, I. M., Klafke, G. B., Bergamashi, M., Terra, P. P. Della, Rodrigues, A. M., de Camargo, Z. P., & Xavier, M. O. (2015). *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*, 58(11), 652–658. <https://doi.org/10.1111/myc.12414>
- Sarkar, S., & Heise, M. T. (2019). Mouse Models as Resources for Studying Infectious Diseases. *Clinical Therapeutics*, 41(10), 1912–1922. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.08.010>
- Sartori, G., Jardim, N. S., Marcondes Sari, M. H., Dobrachinski, F., Pesarico, A. P., Rodrigues, L. C., Cargnelutti, J., Flores, E. F., Prigol, M., & Nogueira, C. W. (2016). Antiviral Action of Diphenyl Diselenide on Herpes Simplex Virus 2 Infection in Female BALB/c Mice. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(7), 1638–1648. <https://doi.org/10.1002/jcb.25457>
- Savegnago, L., Pinto, L. G., Jesse, C. R., Alves, D., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., & Zeni, G. (2007). Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidence for the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*, 555(2–3), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.10.003>
- Sharma, B., Anil, , Sharma, K., & Sharma, U. (n.d.). Sporotrichosis: a Comprehensive Review on Recent Drug-Based Therapeutics and Management. *Current Dermatology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s13671-022-00358-5>
- Silva, C. E., Valeriano, C. A., Ferraz, C. E., Neves, R. P., Oliveira, M. M., Silva, J. C., Magalhães, V., & Lima-Neto, R. G. (2021). Epidemiological features and geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. *Future Microbiology*, 16, 1371–1379. <https://doi.org/10.2217/fmb-2021-0142>
- Silva, G. M., Howes, J. C. F., Leal, C. A. S., Mesquita, E. P., Pedrosa, C. M., Oliveira, A. A. F., Silva, L. B. G., & Mota, R. A. (2018). Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(9), 1767–1771. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5027>
- Thompson, G. R., Le, T., Chindamporn, A., Kauffman, C. A., Alastruey-Izquierdo, A., Ampel, N. M., Andes, D. R., Armstrong-James, D., Ayanlowo, O., Baddley, J. W., Barker, B. M., Lopes Bezerra, L., Buitrago, M. J., Chamani-Tabriz, L., Chan, J. F. W., Chayakulkeeree, M., Cornely, O. A., Cunwei, C., Gangneux, J.-P., ... Pasqualotto, A. C. (2021). Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(21), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(21\)00191-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00191-2)

Wilhelm, E. A., Jesse, C. R., Nogueira, C. W., & Savegnago, L. (2009). Introduction of trifluoromethyl group into diphenyl diselenide molecule alters its toxicity and protective effect against damage induced by 2-nitropropane in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *61*(3), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.08.003>

6 CONCLUSÕES

A esporotricose segue em forte expansão na região sul do RS, permanecendo crescente e expressivo o número de casos/ano diagnosticados, indicando que apesar da rede de acesso ao diagnóstico estar bem estabelecida subsidiando dados robustos sobre a casuística local da esporotricose nos dois principais municípios da região Sul para tomada de decisões em políticas públicas, ações efetivas por parte do poder público dos municípios devem ser fortemente desenvolvidas para impactarem no controle da doença.

Casos de esporotricose zoonótica foram descritos pela primeira vez na região da Grande Porto Alegre, capital do RS. Um crescimento abrupto de casos diagnosticados nos últimos anos do período de estudo comprova o caráter emergente da doença na região metropolitana do estado do RS.

A partir dos dados levantados nas 7 macrorregiões da saúde do estado pode-se concluir que há ocorrência de esporotricose em todas as regiões do RS, deixando claro que a inexistência de meios de notificação e ausência de ações governamentais fazem com que a doença cresça silenciosamente em todo estado.

Com relação ao estudo *in vivo*, a dosagem de 1mg/kg/dia de (PhSe)₂ demonstrou ação similar ao fármaco de eleição (ITZ) para o tratamento da esporotricose, tanto nos parâmetros clínicos quanto na redução da carga fúngica dos órgãos internos. Já as maiores dosagens de (PhSe)₂ (5 e 10mg/kg/dia) empregadas agravaram o quadro clínico e elevaram a carga fúngica dos órgãos internos sugerindo toxicidade.

O (PhSe)₂ 1mg/kg/dia quando utilizado em interação com o ITZ demonstrou significativa melhora nos parâmetros clínicos bem como substancial redução da carga fúngica dos órgãos internos, com efeito significativamente melhor não somente ao grupo placebo como também ao grupo do tratamento de eleição (ITZ).

Dada a característica dose-dependente associada ao (PhSe)₂, novos estudos com dosagens menores do composto devem ser considerados a fim de estabelecer seu pleno potencial terapêutico tanto para ser empregado de forma isolada ou em associação com antifúngicos comercialmente disponíveis para o enfrentamento da esporotricose.

REFERÊNCIAS

- ALBA-FIERRO, C. A. et al. Immune Response Induced by an Immunodominant 60 kDa Glycoprotein of the Cell Wall of *Sporothrix schenckii* in Two Mice Strains with Experimental Sporotrichosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.
- ALMEIDA, S. R. Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 409, 2012.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 14, n. 9, p. 1149–1157, set. 2007.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed research international**, v. 2015, p. 212308, 2015a.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. *Sporothrix schenckii* Complex: Genetic polymorphism In: CARLOS, I. Z., **Sporotrichosis: New developments and future prospects**, Switzerland: Springer International Publishing, 2015.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. **PLoS one**, v. 11, n. 3, p. e0152796, 2016.
- ANDRADE, E. H. P. et al. Characterization of animal sporotrichosis in a highly urbanized area. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 76, n. January, p. 1–6, 2021.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651–655, 2009.
- BAPTISTA, V. S. et al. Promising application of the SsCBF ELISA test to monitor the therapeutic response of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* from Brazilian epidemics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 145–153, 2020.
- BARROS, M. B. D. L. et al. Cat-Transmitted Sporotrichosis Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a Series of Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529–535, 2004.
- BARROS, M. B. D. L. et al. Esporotricose: A evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 27, n. 6, p. 455–460, 2010.
- BARROS, M. B. DE L. et al. Sporotrichosis: an Emergent Zoonosis in Rio de Janeiro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777–779, 2001.
- BARROS, M. B. DE L.; DE ALMEIDA-PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 354–633, 2011.
- BENELLI, J. L. et al. Ebselen and diphenyl diselenide against fungal pathogens: A systematic review. **Medical Mycology**, v. 59, n. 5, p. 409–421, 2021a.

- BENELLI, J. L. et al. In vitro anti-Cryptococcus activity of diphenyl diselenide alone and in combination with amphotericin B and fluconazole. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2021b.
- BOECHAT, J. S. et al. Feline sporotrichosis: Associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 185–196, 2018.
- BONIFAZ, A. et al. Prueba intradérmica con esporotricina en una comunidad de la Sierra Norte de Puebla. **Dermatologia Revista Mexicana**, v. 57, n. 6, p. 428–432, 2013.
- BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. Sporotrichosis: an update. **Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, v. 145, n. 5, p. 659–673, out. 2010.
- BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. Diagnosis and Treatment of Lymphocutaneous Sporotrichosis: What Are the Options? **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 252–259, 2013.
- BONILLA, J. J. A. et al. Antifungal activity of acylhydrazone derivatives against sporothrix spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 5, 2021.
- BORBA-SANTOS, L. P. et al. Susceptibility of Sporothrix brasiliensis isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 178–188, 2015a.
- BORBA-SANTOS, L. P. et al. Miltefosine is active against Sporothrix brasiliensis isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. Pt 4, p. 415–422, abr. 2015b.
- BORBA-SANTOS, L. P. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of buparvaquone against sporothrix brasiliensis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1–10, 2021.
- BORGES, L. P. et al. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 2, p. 99–107, 2006.
- BOVE-SEVILLA, P. M.; MAYORGA-RODRÍGUEZ, J.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O. Sporotrichosis transmitted by a domestic cat. Case report. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 36, n. 1, p. 33–35, 2008.
- BRANDOLT, T. M. et al. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012–2017. **Medical mycology**, set. 2018.
- BROWN, G. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13–165rv13, dez. 2012.
- BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Endemic sporotrichosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 14, n. 2, p. 145–149, abr. 2001.
- BUZÁS, E. I. et al. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 39, n. 8, p. 691–704, dez. 2006.
- CABEZA, E. et al. Clinical and Epidemiological Characteristics of Sporotrichosis in a Reference Center of Uruguay. 2022.
- CARLOS, I. Z. et al. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 168, n. 1, p. 1–10, 2009.

- CARLOS, I.Z; **Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects**, p. 1-179. Switzerland, Springer International, 2015; Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/177748>>.
- CARMICHAEL, J. W. CHRYSOSPORIUM AND SOME OTHER ALEURIOSPORIC HYPHOMYCETES. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, n. 8, p. 1137–1173, ago. 1962.
- CARNERO, L. C. G. et al. Immunity and treatment of sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, 2018.
- CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 130–132, 2007.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17–24, 2003.
- CASTRO, R. A. et al. Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 75656, 2013.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Multistate outbreak of sporotrichosis in seedling handlers, 1988. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 37, n. 42, p. 652–653, out. 1988.
- CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.
- COGNIALLI, R. et al. A Lateral Flow Assay for the Immunodiagnosis of Human Cat-Transmitted Sporotrichosis. **Mycoses**, ago. 2022. doi: 10.1111/myc.13516
- CÓRDOBA, S. et al. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 441–448, 2018.
- DA ROCHA, R. F. D. B. et al. Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide. **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, n. 11, p. 720–721, 2018.
- DALIS, J. S. et al. Severe generalized skin lesions due to mixed infection with *Sporothrix schenckii* and *Dermatophilus congolensis* in a bull from Jos, Nigeria. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 3–4, p. 475–478, ago. 2014.
- DE ALMEIDA, J. R. F. et al. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 42–50, jan. 2015.
- DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: Solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, n. 1907, p. 165–191, 2016.
- DE BEURMANN L, GOUGEROT H, V. V. Sporotichoses cutanées du chat. **C R Soc Biol**, v. 66, p. 370–372, 1909.
- DE LIMA BARROS, M. B. et al. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole - Study of 645 patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 12, 2011.

- DE SOUZA, C. P. et al. Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 18, n. 2, p. 137–143, fev. 2016.
- DE SOUZA, E. W. et al. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- DELLA TERRA, P. P. et al. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1–23, 2017.
- DENARDI, L. B. et al. Antifungal activities of diphenyl diselenide alone and in combination with fluconazole or amphotericin B against *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 165–169, ago. 2013.
- DÍAZ, I. A. C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v. 108, n. 2, p. 113–116, 1989.
- DICKERSON, C. L.; TAYLOR, R. L.; DRUTZ, D. J. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. **Infection and immunity**, v. 40, n. 1, p. 417–420, abr. 1983.
- DOLESKI, P. H. et al. Diphenyl diselenide modulates nucleotidases, reducing inflammatory responses in the liver of *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Purinergic Signalling**, v. 13, n. 4, p. 489–496, 2017.
- DONADEL, K. W. et al. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 68, n. 1, p. 45–52, 1993.
- DUANGKAEW, L. et al. Cutaneous sporotrichosis in a stray cat from Thailand. **Medical Mycology Case Reports**, v. 23, n. December 2018, p. 46–49, 2019.
- ETCHECOPAZ, A. et al. *Sporothrix brasiliensis*: A review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 1–33, 2021.
- ETCHECOPAZ, A. N. et al. Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, p. 100908, 2020.
- FELLI KUBIÇA, T. et al. In vitro activity of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Trichosporon asahii*. **Mycoses**, v. 62, n. 5, p. 428–433, maio 2019.
- FERNANDES, G. F. et al. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary microbiology**, v. 147, n. 3–4, p. 445–449, jan. 2011.
- FERNANDES, G. F. et al. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241–249, 2013.
- FERNÁNDEZ-SILVA, F. et al. Modest efficacy of voriconazole against murine infections by *Sporothrix schenckii* and lack of efficacy against *Sporothrix brasiliensis*. **Mycoses**, v. 57, n. 2, p. 121–124, 2014.
- FICHMAN, V. et al. Cryosurgery for the treatment of cutaneous sporotrichosis in four pregnant women. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–6, 2018.

FREITAS, D. F. S. et al. **Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis.** *Virulence*, 2015.

FREITAS, D.; MIGLIANO, M.; NETO, L. Z. Esporotricose - observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo*, v. 5, p. 601–604, 1956.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain research*, v. 986, n. 1–2, p. 196–199, out. 2003.

GOVENDER, N. P. et al. An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. 1–15, 2015.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. *Journal of feline medicine and surgery*, v. 11, n. 8, p. 720–723, ago. 2009.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Australian veterinary journal*, v. 89, n. 9, p. 346–351, set. 2011.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Feline sporotrichosis: Epidemiological and clinical aspects. *Medical Mycology*, v. 53, n. 1, p. 15–21, 2014.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 1, p. 2–8, 2017.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 26, n. 3, p. 621–624, 2020.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 107–124, 2021.

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

GUZMAN-BELTRAN, S. et al. Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes. *Microbes and Infection*, v. 14, n. 12, p. 1093–1101, 2012.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. REFRACTORY SUBCUTANEOUS ABSCESSSES CAUSED BY SPOROTHRIX SCHENCKII. A NEW PATHOGENIC FUNGUS. *The Journal of experimental medicine*, v. 5, n. 1, p. 77–89, out. 1900.

HONSE, C. O. et al. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. *The Veterinary record*, v. 166, n. 7, p. 208–209, fev. 2010.

HUANG, Z.; ROSE, A. H.; HOFFMANN, P. R. The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 16, n. 7, p. 705–743, 2012.

ISHIDA, K. et al. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. *Medical Mycology*, v. 53, n. 1, p. 34–41, 2015.

- IYALLA, C. A review of the virulence factors of pathogenic fungi. **AFRICAN JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MICROBIOLOGY JANUARY**, v. 18, n. 1, p. 53–58, 2017.
- JIMENEZ-LUCHO, V.; GINSBURG, V.; KRIVAN, H. C. Cryptococcus neoformans, Candida albicans, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal beta 1-4Glc beta 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. **Infection and immunity**, v. 58, n. 7, p. 2085–2090, jul. 1990.
- KAJIWARA, H. et al. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5073–5079, set. 2004.
- KAUFFMAN, C. A. et al. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 10, p. 1255–1265, 2007.
- LARSSON, C. E. ; et al. Esporotricose Felina : a S P E C T O S Clínicos E Zoonóticos (1). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 5, p. 351–358, 1989.
- LARSSON, C. E. Esporotricose. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 48, n. 3, p. 250–259, 2011.
- LECCA, L. O. et al. Associated factors and spatial patterns of the epidemic sporotrichosis in a high density human populated area: A cross-sectional study from 2016 to 2018. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 176, n. February, p. 104939, 2020.
- LEITE, M. R. et al. Swimming exercise and diphenyl diselenide-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats. **Cytokine**, v. 71, n. 1, p. 119–123, 2015.
- LEME, L. R. P. et al. Mycological evaluation of bronchoalveolar lavage in cats with respiratory signs from Rio de Janeiro, Brazil. **Mycoses**, v. 50, n. 3, p. 210–214, maio 2007.
- LEMES, L. R. et al. Ocular involvement in sporotrichosis: report of two cases in children. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 3, p. 349–351, 2021.
- LEYDEN, J. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5 Pt 3, p. S42-7, maio 1998.
- L.M., G. An unusual case of sporotrichosis. **Indian Med Gaz**, v. 67, p. 570, 1932.
- LOPES-BEZERRA, L. M. et al. *Sporothrix schenckii* cell wall peptidorhamnomannans. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 243, p. 1–4, 2011.
- LOPES-BEZERRA, L. M. et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, v. 56, p. S126–S143, 2018a.
- LOPES-BEZERRA, L. M. et al. Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminar structures and sloughing of extensive and intact layers. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1–25, 2018b.
- LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 293–308, jun. 2006.
- LORETO, E. S. et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e572-6, set. 2011.

- LORETO, É. S. et al. Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 1–2, p. 222–226, 2012.
- LUTZ, D. A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, v. 21, p. 433–450, 1907.
- MACÊDO-SALES, P. A. et al. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: A comparison between infected and non-infected populations. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2018.
- MADRID, I. M. et al. Ultrastructural study of the mycelial phase of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from feline, canine and human cases of sporotrichosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1147–1150, 2011.
- MADRID, I. M. et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 265–273, abr. 2012.
- MAIA, D. C. G. et al. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 11–19, jan. 2006.
- MAKRI, N. et al. **First case report of cutaneous sporotrichosis (*Sporothrix* species) in a cat in the UK. JFMS open reports**, 2020.
- MARIMON, R. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, 2006.
- MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.
- MARIO, D. N. et al. In vitro and in vivo efficacy of amphotericin B combined with posaconazole against experimental disseminated sporotrichosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 5018–5021, 2015.
- MARQUES, S. A. et al. **Sporotrichosis of the domestic cat (*Felis catus*): human transmission. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1993.
- MARQUES-MELO, E. H. et al. Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de Alagoas. **Revista Baiana Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 490–498, 2014.
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A.; PÉREZ-GARCÍA, L. A.; MELLADO-MOJICA, E. *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* Are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. May, p. 1–15, 2017.
- MASCARENHAS, M. B. et al. Canine sporotrichosis: Report of 15 advanced cases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 477–481, 2018.
- MASCHIO-LIMA, T. et al. Clinical and epidemiological aspects of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and in vitro antifungal susceptibility. **Veterinary Research Communications**, 2021.
- MELO, A. M. et al. Diphenyl diselenide and its interaction with antifungals against *Aspergillus* spp. **Medical mycology**, ago. 2020.

- MEOTTI, F. C. et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 1, p. 9–16, 2003.
- MIRANDA, L. H. M. et al. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8 low cells and a decrease in CD4 + cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 29–39, 2016.
- MITRA, V.; METCALF, J. Functional anatomy and blood supply of the liver. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 13, n. 2, p. 52–53, 2012.
- MORRIS-JONES, R. et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4026–4033, 2003.
- MUGESH, G.; DU MONT, W. W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chemical reviews**, v. 101, n. 7, p. 2125–2179, jul. 2001.
- MUGGIA, L. et al. An Overview of Genomics, Phylogenomics and Proteomics Approaches in Ascomycota. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 12, dez. 2020.
- MUNHOZ, L. S. et al. Update of the Epidemiology of the Sporotrichosis Epidemic in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycoses**, v. 00, n. April, p. 1–7, 2022.
- NAGAHORI, H. et al. Metabolism of 2,6-dichloro-4-(3,3-dichloroallyloxy)phenyl 3-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy]propyl ether (pyridalyl) in rats after repeated oral administration and a simple physiologically based pharmacokinetic modeling in brown and white adipose tissues. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 38, n. 5, p. 824–832, maio 2010.
- NAKASU, C. C. T. et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 163–171, 2020.
- NAKASU, C. C. T. et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 163–171, 2021.
- NASCIMENTO, R. C.; ALMEIDA, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 43, n. 2, p. 241–247, fev. 2005.
- NEGRINI, T. D. C. et al. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. **Immunological Investigations**, v. 42, n. 1, p. 36–48, 2013.
- NOBRE, M. D. O. et al. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, n. 3, p. 137–140, 2001.
- NOGUEIRA, C. W.; BARBOSA, N. V.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. **Archives of toxicology**, v. 95, n. 4, p. 1179–1226, abr. 2021.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 11, p. 2055–2071, 2010.
- NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255–6285, 2004.
- NOGUEIRA, C. W.; QUINHONES, E. B.; JUNG, E. A. C.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflammation Research**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 56–63, 2003. DOI: 10.1007/s000110300001.

- OLIVEIRA, M. M. E. et al. Phenotypic and Molecular Identification of Sporothrix Isolates from an Epidemic Area of Sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 257–267, 2011.
- OLIVEIRA, M. M. E. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the Sporothrix species complex. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102–110, 2015.
- OROFINO-COSTA, R. et al. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.
- PALIN KJ, et al., The effect of foils on the lymphatic absorption of DDT. **J Pharm Pharmacol** 34:707–710, 1982.
- PAPA, M. G. O. et al. Avaliação do conhecimento dos moradores da Zona Norte do Rio de Janeiro em relação à esporotricose Evaluation of the knowledge of residents of the northern zone of Rio de Janeiro regarding. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, p. 65–70, 2018.
- PEREIRA, S. A. et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **The Veterinary record**, v. 166, n. 10, p. 290–294, mar. 2010.
- PEREIRA, S. A. et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392–393, 2014.
- PLOUFFE JR., J. F. et al. Cell-Mediated Immune Responses III Sporotrichosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 139, n. 2, p. 152–157, fev. 1979.
- POESTER, V. et al. PCR espécie-específico para o diagnóstico de esporotricose causada por Sporothrix brasiliensis. p. 72–81, 2021a.
- POESTER, V. R. et al. Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 7, p. 815–821, 2018a.
- POESTER, V. R. et al. Antifungal activity of diphenyl diselenide alone and in combination with itraconazole against Sporothrix brasiliensis. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 328–331, 2018b.
- POESTER, V. R. et al. Sporothrix spp. evaluation in soil of a hyperendemic area for sporotrichosis in southern Brazil. **Ciencia Animal Brasileira, [S. l.]**, n. 19, p. 1–8, 2018c. DOI: 10.1590/1809-6891v19e-52571.
- POESTER, V. R. et al. Disseminated sporotrichosis with immune reconstitution inflammatory syndrome in an HIV patient: Case report and review of the literature. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 37, n. 3–4, p. 97–99, 2020.
- POESTER, V. R. et al. CATastrophe: Response to the challenges of zoonotic sporotrichosis in southern Brazil. **Mycoses**, n. June, p. 1–5, 2021b.
- PRIGOL, M. et al. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. **Toxicology Letters**, v. 189, n. 1, p. 35–39, 2009.
- PRIGOL, M. et al. Comparative excretion and tissue distribution of selenium in mice and rats following treatment with diphenyl diselenide. **Biological Trace Element Research**, v. 150, n. 1–3, p. 272–277, 2012.

- QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical mycology**, v. 49, p. 225–236, 2011.
- QUINTELLA, L. P. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: A series of 119 consecutive cases. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, n. 1, p. 25–32, 2011.
- RABELLO, V. B. S. et al. Environmental Isolation of *Sporothrix brasiliensis* in an Area With Recurrent Feline Sporotrichosis Cases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. May, p. 1–7, 2022.
- RACHMAN, R. et al. Zoonotic acquisition of cutaneous *Sporothrix brasiliensis* infection in the UK. **BMJ case reports**, v. 15, n. 5, maio 2022.
- RAMÍREZ-SOTO, M. C. et al. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 1–11, 2018.
- RAMOS, A. C. M. O. et al. Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 11, n. 1, p. 79–84, 2017.
- REES, R. K.; SWARTZBERG, J. E. Feline-transmitted Sporotrichosis: A case study from California. **Dermatology Online Journal**, v. 17, n. 6, 2011.
- REIS, É. G. et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 399–404, 2012.
- RIBEIRO, C. R. et al. Ocular Sporotrichosis. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 19, 2020.
- RIOS, M. E. et al. Zoonotic Sporotrichosis Related to Cat Contact: First Case Report from Panama in Central America. **Cureus**, jul. 2018.
- RIPPON JW, Medical Mycology– The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company, 1988.
- RODRIGUES, A. M. et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, 2013.
- RODRIGUES, A. M. et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.
- RODRIGUES, A. M. et al. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal of proteomics**, v. 115, p. 8–22, fev. 2015.
- RODRIGUES, A. M. et al. **The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species.** [s.l: s.n.]. v. 185
- RODRIGUES, A. M. et al. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends Anderson. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 776, 2022.
- RODRIGUES, A. M.; DE HOO, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2015.

- RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Sporothrix Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 1–7, 2016.
- RODRIGUES, A. M.; HAGEN, F.; DE CAMARGO, Z. P. A Spotlight on Sporothrix and Sporotrichosis. **Mycopathologia**, jul. 2022.
- RODRÍGUEZ-BRITO, S. et al. Differential identification of Sporothrix spp. and Leishmania spp. by conventional PCR and qPCR in multiplex format. **Medical Mycology**, v. 53, p. 22–27, 2015.
- ROMEO, O.; SCORDINO, F.; CRISEO, G. New Insight into Molecular Phylogeny and Epidemiology of Sporothrix schenckii Species Complex Based on Calmodulin-Encoding Gene Analysis of Italian Isolates. **Mycopathologia**, v. 172, n. 3, p. 179–186, 2011.
- ROSSATO, L. et al. Proteins Potentially Involved in Immune Evasion Strategies in Sporothrix brasiliensis Elucidated by Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry. **mSphere**, v. 3, n. 3, jun. 2018.
- ROSSOW, J. A. et al. A one health approach to combatting sporothrix brasiliensis: Narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in south america. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–27, 2020.
- ROTH WL et al., A physiologically based model for gastrointestinal absorption and excretion of chem- icals carried by lipids. **Risk Anal** 13(5):531–543, 1993.
- SANCHOTENE, K. O. et al. Sporothrix brasiliensis outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015.
- SARTORI, G. et al. Antiviral Action of Diphenyl Diselenide on Herpes Simplex Virus 2 Infection in Female BALB/c Mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 7, p. 1638–1648, 2016.
- SARTORI, G. et al. Diphenyl Diselenide Reduces Oxidative Stress and Toxicity Caused by HSV-2 Infection in Mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 5, p. 1028–1037, 2017.
- SASSÁ, M. F. et al. Immune response against Sporothrix schenckii in TLR-4-deficient mice. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 21–30, jul. 2012.
- SAVEGNAGO, L. et al. Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. **Brain Research**, v. 1175, n. 1, p. 54–59, 2007.
- SAVEGNAGO, L. et al. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of l-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 4, p. 418–426, 2008.
- SCHUBACH, A.; BARROS, M. B. DE L.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 129–133, abr. 2008.
- SCHUBACH, M. P. et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases. **Medical Mycology**, v. 44, p. 87–92, 2006.

- SCHUBACH, T. M. P. et al. **Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 Cases (1998-2001)**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, maio 2004.
- SCORZONI, L. et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 36, 2017.
- SHARMA, B.; SHARMA, A. K.; SHARMA, U. Sporotrichosis: A Comprehensive Review on Recent Drug-Based Therapeutics and Management. *Current Dermatology Reports*, v. 11, p. 110–119, 2022.
- SHETTY, S.; LALOR, P. F.; ADAMS, D. H. Lymphocyte recruitment to the liver: molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis. *Toxicology*, v. 254, n. 3, p. 136–146, dez. 2008.
- SIEW, H. H. The Current Status of Feline Sporotrichosis in Malaysia. *Medical Mycology Journal*, v. 58, n. 3, p. 107–113, 2017.
- SINGER, J. I.; MUNCIE, J. E. Sporotrichosis; etiologic considerations and report of additional cases from New York. *New York state journal of medicine*, v. 52, n. 17:1, p. 2147–2153, 1952.
- SOEIRO SAMPAIO, F. M. et al. **Electrosurgery as Adjuvant Therapy for Cutaneous Sporotrichosis**. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, jan. 2020.
- SPANAMBERG, A. et al. Sporothrix brasiliensis on cats with skin ulcers in Southern Brazil. *Medical mycology*, v. 59, n. 3, p. 301–304, mar. 2021.
- TACHIBANA, T et al. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with Sporothrix schenckii in mice. *Medical mycology*, v. 37, n. 6, p. 397–404, dez. 1999.
- TEIXEIRA, P. A. C. et al. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in Sporothrix schenckii. *Microbiology*, v. 155, n. 11, p. 3730–3738, 2009.
- THOMPSON, G. R. et al. Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3099, n. 21, p. 1–11, 2021.
- UENOTSUCHI, T. et al. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with Sporothrix schenckii of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *International immunology*, v. 18, n. 12, p. 1637–1646, dez. 2006.
- VARTIVARIAN, S. E. Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 14 Suppl 1, p. 30–36, mar. 1992.
- VENTURINI, T. P. et al. Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against Fusarium spp. *Medical mycology*, v. 54, n. 5, p. 550–555, jul. 2016.
- WALLER, S. B. et al. Jabuticaba [Plinia peruviana (Poir.) Govaerts]: a Brazilian fruit with a promising application against itraconazole-susceptible and -resistant Sporothrix brasiliensis. *Natural product research*, p. 1–5, ago. 2020.

WALLER, S. B. et al. Can the essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) protect rats infected with itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* from fungal spread? **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 4, p. 101199, dez. 2021.

WALLER, Stefanie Bressan et al. In vivo protection of the marjoram (*Origanum majorana* Linn.) essential oil in the cutaneous sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 35, n. 17, p. 2977–2981, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2019.1678617. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1678617>.

WILHELM, E. A. et al. Introduction of trifluoromethyl group into diphenyl diselenide molecule alters its toxicity and protective effect against damage induced by 2-nitropropane in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, n. 3, p. 197–203, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WU, S. X. Sporotrichosis in China. **Chin J Zoonoses**, v. 7, p. 53–54, 1991.

WUTHRICH, M.; JR DEEPE, G.; KLEIN, B. Adaptive Immunity to fungi. **Annu Rev Immunol.**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2012.

YAMAGATA, J. P. M. et al. Ocular sporotrichosis: A frequently misdiagnosed cause of granulomatous conjunctivitis in epidemic areas. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 8, p. 35–38, 2017.

ZHANG, M. et al. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 1–11, 2019.

ZHANG, Y. et al. *Sporothrix*. **Persoonia**, v. 35, p. 1–20, 2015.