

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANAROSA BARBOSA SPRENGER

SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE *Sporothrix brasiliensis* PROTEGIDOS EM BIOFILMES AOS ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS PARA TRATAR A ESPOROTRICOSE HUMANA.

CURITIBA

2025

ANAROSA BARBOSA SPRENGER

SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE *Sporothrix brasiliensis* PROTEGIDOS EM
BIOFILMES AOS ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS PARA TRATAR A
ESPOROTRICOSE HUMANA.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Medicina Interna e Ciências da Saúde, setor de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina Interna e
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Flavio de Queiroz Telles Filho

CURITIBA

2025

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7.
- 8.
- 9.
- 10.
- 11.
- 12.
- 13.
- 14.
- 15.
- 16.
- 17.
- 18.
- 19.
- 20.
- 21.
- 22.
- 23.
- 24.
- 25.
- 26.
- 27.
- 28.
- 29.
- 30.
- 31.
- 32.
- 33.
- 34.

S768 Sprenger, Anarosa Barbosa
Susceptibilidade *in vitro* de *Sporothrix brasiliensis* protegidos em biofilmes aos antifúngicos utilizados para tratar a esporotricose humana [recurso eletrônico] / Anarosa Barbosa Sprenger. – Curitiba, 2025.
111 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, 2025.

Orientador: Prof. Dr. Flavio de Queiroz Telles Filho.

1. Esporotricose. 2. Sporothrix. 3. Biofilmes. 4. Antifúngicos. 5.

NLMC: QV 252

35.

36. Catalogação na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR, Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com os dados fornecidos pela autora.

37. Bibliotecária: Nayara Késsia Veras Lemos CRB-9/2207



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANAROSA BARBOSA SPRENGER**, intitulada: **SUSCEPTIBILIDADE in vitro DE Sporothrix brasiliensis PROTEGIDOS EM BIOFILMES AOS ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS PARA TRATAR A ESPOROTRICOSE HUMANA**, sob orientação do Prof. Dr. FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 11 de Dezembro de 2025.

Assinatura Eletrônica
12/12/2025 22:48:51.0
FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
12/12/2025 17:26:31.0
MARISOL DOMINGUEZ MURO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -
HOSPITAL DE CLÍNICAS)

Assinatura Eletrônica
16/12/2025 18:37:54.0
ROBERTO GOMES TARLÉ
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
12/12/2025 15:03:10.0
REGIELLY CAROLINE RAIMUNDO COGNIALI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
15/12/2025 14:26:26.0
BETINA WERNER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
12/12/2025 16:54:30.0
TEREZINHA INEZ ESTIVALET SVIDZINSKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

*Dedico este trabalho aos meus adorados
filhos, para que os inspire a estudar.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Flávio de Queiroz Telles, orientador deste trabalho, pela dedicação incansável à pesquisa, à micologia e ao ensino, por acreditar mais uma vez que eu seria capaz de realizá-lo, minha eterna gratidão e amizade.

À Professora Vânia Vicente, pelo acolhimento, apoio incondicional, orientação, amizade e carinho, um exemplo de entusiasmo pela ciência.

À Professora Terezinha Svidzinski, pela imensurável paciência, pela dedicação, orientação e respeito será sempre uma inspiração, a professora que eu gostaria de ser muito obrigada.

À Marlon Roger Geraldo, que durante anos compartilhou seu precioso tempo, seu conhecimento e paciência para sentar-se ao meu lado e me apresentar o mundo dos cientistas. Serei eternamente grata por toda a dedicação e amizade.

À Andreia Bueno da Silva, que com carinho e dedicação, durante anos deixou os próprios compromissos para que este trabalho fosse realizado. Minha gratidão infinita.

À Letícia Sant Ana, pelo apoio técnico de tantas horas, muito obrigada.

À Bruna Jacomel, por gentilmente nos ajudar em cálculos e sugestões essenciais para esta pesquisa. Desejo-lhe muito sucesso em sua carreira.

À Germana Davila dos Santos, nossa referência sempre por perto, com cálculos, com a identificação dos espécimes, com orientações sempre acompanhadas de muita gentileza e elegância, minha eterna admiração.

À Bruno Rodrigues Lustosa e Emanuel Razzolini meu profundo agradecimento pelos ensaios iniciais deste trabalho e pelas preciosas orientações.

À Jason Furuie, sempre disponível e gentil para apoio técnico.

À equipe do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pelas imagens produzidas e por toda a atenção e competência.

À equipe do Laboratório de Microscopia Confocal Multifotônica da UFPR pelo apoio, profissionalismo e gentileza.

Ao Setor de Micologia e Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR, em especial, à Regielly Cognialli, pelo auxílio técnico, amizade e disponibilidade em tantos anos do nosso convívio.

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo apoio à pesquisa e suporte material.

RESUMO

Os biofilmes de *Sporothrix brasiliensis* representam um desafio no tratamento da esporotricose devido à sua complexidade estrutural e resistência aos antifúngicos. Este estudo avaliou a eficácia da terbinafina (TERB) e do itraconazol (ITZ), isoladamente e em combinação, contra biofilmes de formas leveduriformes de *S. brasiliensis*. Sete isolados clínicos foram analisados quanto à formação de biofilme e suas alterações estruturais, utilizando espectrofotometria, microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O tratamento de biofilmes em estágio inicial (3 horas) apresentou maior suscetibilidade ao ITZ, enquanto biofilmes maduros (144 horas) responderam melhor à TERB. A análise estatística confirmou diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,016$) e um efeito dependente da dose, embora não tenha sido observada interação sinérgica considerável entre ITZ e TERB. As análises por MCVL e MEV revelaram redução na formação e adesão dos biofilmes, desorganização estrutural e alterações morfológicas celulares após a exposição aos antifúngicos, tanto isoladamente quanto em combinação. A TERB foi significativamente mais eficaz na erradicação de biofilmes maduros do que o ITZ ou a combinação ($p < 0,001$). Esses achados reforçam a necessidade de intervenção precoce no tratamento da esporotricose e sugerem que a TERB pode ser uma alternativa valiosa para infecções associadas a biofilmes.

Palavras-chave: susceptibilidade antifúngica, esporotricose, biofilmes de leveduras, agentes antifúngicos, resistência a medicamentos, drogas antibiofilme, terapia combinada.

ABSTRACT

Sporothrix brasiliensis biofilms represent a challenge in the treatment of sporotrichosis due to their structural complexity and antifungal resistance. This study evaluated the efficacy of terbinafine (TERB) and itraconazole (ITZ), alone and in combination, against biofilms of yeast-like forms of *S. brasiliensis*. Seven clinical strains were analyzed for biofilm formation, and structural alterations using spectrophotometry, confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM). The treatment in early-stage biofilms (3 hours) exhibited greater susceptibility to ITZ, whereas mature biofilms (144 hours) responded better to TERB. Statistical analysis confirmed significant differences among treatments ($p < 0.016$) and a dose-dependent effect, although no considerable synergistic interaction was observed between ITZ and TERB. CLSM and SEM analyses revealed reduced biofilm formation and adhesion, biofilm disorganization, and cellular morphological changes following exposure to antifungals, both individually and in combination. TERB was significantly more effective in eradicating mature biofilms than ITZ or the combination ($p < 0.001$). These findings reinforce the need for early intervention in sporotrichosis treatment and suggest that TERB may be a valuable alternative for biofilm-associated infections.

Keywords: antifungal susceptibility, sporotrichosis, yeast biofilms, antifungal agents, drug resistance, antibiofilm drugs, combination therapy

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - IMAGEM DO ARTIGO PUBLICADO POR BENJAMIN R. SCHENCK EM 1898	22
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DA ESPOROTRICOSE DE TRANSMISSÃO SAPRONÓTICA E ZONÓTICA	24
FIGURA 3 - PREVALÊNCIA ESPOROTRICOSE NA AMÉRICA DO SUL E DISTRIBUIÇÃO DA ESPOROTRICOSE TRANSMITIDA POR GATOS EM HUMANOS CAUSADA POR <i>Sporothrix brasiliensis</i> EM 2022	25
FIGURA 4 - GRÁFICO REPRESENTANDO NÚMERO DE CASOS DE ESPOROTRICOSE HUMANA NOTIFICADOS NO PARANÁ DE 2019 A 2024.....	26
FIGURA 5 - NÚMERO DE CASOS DE ESPOROTRICOSE HUMANA POR CIDADE NOTIFICADOS NO PARANÁ DE 2019 A 2024	27
FIGURA 6 - ASPECTOS CLÍNICOS DA ESPOROTRICOSE HUMANA.....	30
FIGURA 7 - ASPECTOS CLÍNICO E MICROSCÓPICOS DA ESPOROTRICOSE FELINA	31
FIGURA 8 - ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA ESPOROTRICOSE.....	32
FIGURA 9 - DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DA ESPOROTRICOSE	33
FIGURA 10 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILME DE FORMA FILAMENTOSA DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> ..	39
FIGURA 11 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILME DE FORMA LEVEDURIFORME DE <i>Sporothrix brasiliensis</i>	40
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TERMOCONVERSÃO DE FORMAS LEVEDURIFORMES DE <i>Sporothrix brasiliensis</i>	46
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE PARA OS TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE COM A TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	47
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO DA SOLUÇÃO DE INÓCULOS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> (ETAPA 1)	48
FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DA SOLUÇÃO DE INÓCULOS – ETAPA 2.....	49

FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS PARA TESTE DE DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE <i>in vitro</i> DE TERBINAFINA E ITRACONAZOL .	50
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MICROPLACAS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE <i>in vitro</i> DE TERBINAFINA E ITRACONAZOL.....	50
FIGURA 18 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS PARA ENSAIO DE <i>checkerboard</i>	52
FIGURA 19 - QUADRO DA REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE TERB/ITZ NAS MICROPLACAS USADAS NOS TESTES DE <i>checkerboard</i> PARA BIOFILMES	52
FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA COLORAÇÃO DAS MICROPLACAS DOS ENSAIOS DE <i>checkerboard</i> COM RESAZURINA	53
FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DE MICROPLACAS PARA PRODUÇÃO DE BIOFILMES E ESTUDO DE BIOMASSA	54
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS PARA PRODUÇÃO DE BIOFILME PARA MICROSCOPIA CONFOCAL E MICROSCOPIA ELETRÔNICA	55
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS DE 96 POÇOS PARA TESTE DE INIBIÇÃO DOS BIOFILMES	56
FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO DAS MICROPLACAS COM TERBINAFINA DO TESTE DE INIBIÇÃO DE BIOFILMES	58
FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO DAS MICROPLACAS COM ITRACONAZOL DO TESTE DE INIBIÇÃO DE BIOFILMES	59
FIGURA 26 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO DAS MICROPLACAS COM TERBINAFINA/ITRACONAZOL DO TESTE DE INIBIÇÃO DE BIOFILMES	60

FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS DE 24 POÇOS PARA TESTE DE INIBIÇÃO DOS BIOFILMES	61
FIGURA 28 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS NAS MICROPLACAS “INIBIÇÃO 2” PARA MCVL E MEV	61
FIGURA 29 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS NAS MICROPLACAS “MADURO 2” PARA MCVL E MEV	62
FIGURA 30 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL: COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA.....	64
FIGURA 31 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA DE PREPARO DAS MICROPLACAS COM BIOFILMES PARA MICROSCOPIA CONFOCAL.....	66
FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	67
FIGURA 33 - CULTURA LEVEDURIFORME DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> E LÂMINA CORADA COM LACTOFENOL DE AMANN COM AZUL DE ALGODÃO	69
FIGURA 34 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA COM IMAGEM DE LEITURA VISUAL DE TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE in vitro DE TERBINAFINA CONTRA LINHAGENS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i>	71
FIGURA 35 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA COM IMAGEM DE LEITURA VISUAL DE TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE in vitro DE ITRACONAZOL CONTRA LINHAGENS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> ..	72
FIGURA 36 - FOTOGRAFIA DA PLACA DE MICRODILUIÇÃO EM CHECKERBOARD PARA A LINHAGEM <i>S. brasiliensis</i> CMRP 2525	73
FIGURA 37 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLSM) DE BIOFILME MADURO DA LINHAGEM <i>Sporothrix brasiliensis</i> CMRP 5491 SEM TRATAMENTO ANTIFÚNGICO	74

FIGURA 38 - IMAGEM 3D DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLSM) DE BIOFILME SEM TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO	74
FIGURA 39 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE BIOFILME DE <i>S. brasiliensis</i> NA FORMA LEVEDURIFORME SEM TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO.....	75
FIGURA 40 - GRÁFICOS DEMONSTRANDO A VARIAÇÃO NA DENSIDADE ÓTICA EM RELAÇÃO À CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DOS BIOFILMES DE <i>S. brasiliensis</i> , APÓS A ADIÇÃO DE ANTIFÚNGICOS	77
FIGURA 41 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLSM) ILUSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO ANTIFÚNGICO PRECOCE (3 HORAS DE INCUBAÇÃO) NOS BIOFILMES DE <i>S. brasiliensis</i> NA FORMA LEVEDURIFORME	78
FIGURA 42 - IMAGEM 3D DE BIOFILME DA LINHAGEM <i>S. brasiliensis</i> CMRP5491 APÓS TRATAMENTO PRECOCE (3 HORAS) COM ANTIFÚNGICOS	79
FIGURA 43 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) ILUSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO ANTIFÚNGICO PRECOCE (3 HORAS DE INCUBAÇÃO) SOBRE BIOFILMES DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> NA FORMA LEVEDURIFORME	80
FIGURA 44 - GRÁFICOS DEMONSTRANDO A VARIAÇÃO NA DENSIDADE ÓTICA EM RELAÇÃO À ADIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ANTIFÚNGICOS EM BIOFILMES MADUROS	81
FIGURA 45 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL) DE BIOFILMES MADUROS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> NA FORMA LEVEDURIFORME APÓS TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICOS.....	82
FIGURA 46 - IMAGEM 3D DE BIOFILME MADURO DA LINHAGEM <i>S. brasiliensis</i> CMRP 5491 E CMRP 2525 APÓS TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICOS	83
FIGURA 47 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILMES MADUROS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> CMRP 5491 APÓS TRATAMENTOS COM ANTIFÚNGICOS.....	84

FIGURA 48 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILMES
MADUROS DE *Sporothrix brasiliensis* CMRP 2525 APÓS
TRATAMENTOS COM ANTIFÚNGICOS.....85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS DA ESPOROTRICOSE.....	34
TABELA 2 - LINHAGENS REFERÊNCIAS UTILIZADAS NO ESTUDO	44
TABELA 3 - SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> NAS FORMAS LEVEDURIFORMES PLANCTÔNICAS.....	70
TABELA 4 - RESULTADOS DE MBIC E MBEC PARA DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i> TRATADOS COM TERBINAFINA, ITRACONAZOL E A COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS (TERB/ITZ).....	76

LISTA DE SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
3D	Tridimensional
BHI	- Brain Heart Infusion
CAL	- Calmodulina
CBPs	- Pontos de Corte Clínicos (Clinical Breakpoints)
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
DO	- Densidade ótica
DMSO	- Dimetilsulfóxido
FIC	- Fractional Inhibitory Concentration
FICI	- Fractional Inhibitory Concentration Index
H&E	- Hematoxilina e Eosina
ITZ	- Itraconazol
ITS	- Internal Transcriber Spacer
KI	- Iodeto de Potássio
MBEC	- Minimal Biofilm Eradication Concentration
MBIC	- Minimal Biofilm Inhibitory Concentration
MCVL	- Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MEC	- Matriz Extracelular
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC	- Minimum Inhibitory Concentration
PAS	- Ácido Periódico de Schiff do inglês Periodic Acid of Schiff
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline Solution</i> (Solução Salina Fosfato Tamponada)
PCR	- Reação de Polimerase em Cadeia
PI	- Brometo de Propídio
rpm	- rotações por minuto
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute 1640
SESA	- Secretaria Estadual da Saúde do Estado do Paraná
SNC	- Sistema Nervoso Central
TERB	- Terbinafina
UFC	- Unidades Formadoras de Colônia

- VCE - Valor de Corte Epidemiológico
- μL - Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1.1 AGENTES INFECCIOSOS E MODOS DE INFECÇÃO	23
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE DE TRANSMISSÃO ZONÓTICA..	24
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	28
1.4 ESPOROTRICOSE FELINA.....	30
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR.....	31
1.6 DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS	34
1.7 TRATAMENTO.....	35
1.8 SUSCEPTIBILIDADE <i>in vitro</i>	36
1.9 O PAPEL DOS BIOFILMES	38
2 JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO.....	41
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 DESENHO DO ESTUDO	43
4.2 LOCAL DO ESTUDO	43
4.3 LINHAGENS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i>	43
4.4 OBTENÇÃO DE FORMAS LEVEDURIFORMES	45

4.4.1	Termoconversão de formas filamentosas para formas leveduriformes de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	45
4.5	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE <i>in vitro</i> (MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO).....	46
4.5.1	Antifúngicos utilizados – preparo das soluções estoque	46
4.5.2	Preparo das soluções de inóculos para os testes de susceptibilidade de terbinafina e itraconazol.....	47
4.5.3	Montagem das microplacas para os testes de susceptibilidade	49
4.5.4	Medidas Avaliada na leitura dos testes de susceptibilidade <i>in vitro</i>	50
4.5.5	Testes de interações dos antifúngicos.....	51
4.6	PRODUÇÃO DE BIOFILMES.....	54
4.7	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS BIOFILMES DE FORMAS LEVEDURIFORMES DE <i>Sporothrix brasiliensis</i>	55
4.7.1	Soluções estoque de antifúngicos para o tratamento em biofilmes	55
4.7.2	Ensaio de inibição da formação de biofilmes	56
4.7.3	Ensaio de erradicação de biofilmes	62
4.7.4	Análise da atividade antibiofilme.....	62
4.7.5	Determinação da biomassa total	63
4.7.6	Determinação da concentração mínima inibitória de biofilmes (MBIC).....	64
4.7.7	Determinação da concentração mínima de erradicação de biofilmes (MBEC)	64
4.7.8	Ensaio de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)	65
4.7.9	Ensaio de microscopia eletrônica de varredura	66
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
5	RESULTADOS	69
5.1	CULTURAS LEVEDURIFORMES OBTIDAS	69

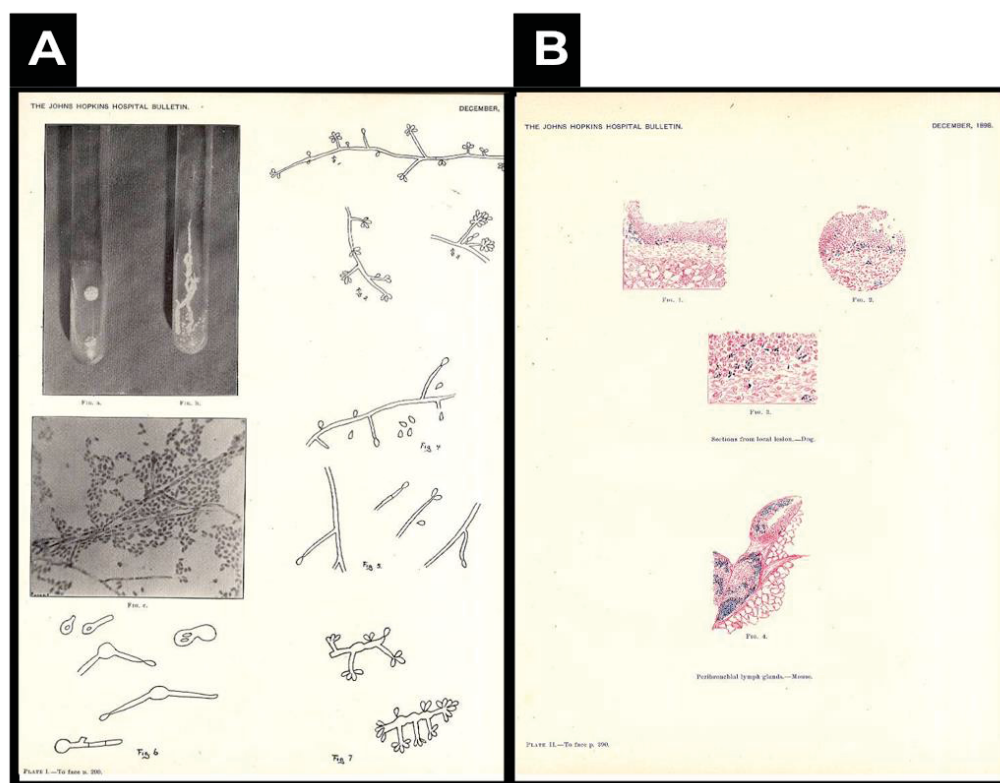
5.2 CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS PARA FORMAS LEVEDURIFORMES PLANCTÔNICAS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i>	69
5.3 INTERAÇÕES ENTRE OS ANTIFÚNGICOS PARA FORMAS LEVEDURIFORMES PLANCTÔNICAS	72
5.4 CAPACIDADE DO <i>Sporothrix brasiliensis</i> EM FORMAR BIOFILMES	73
5.5 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA TERBINAFINA, DO ITRACONAZOL E DA COMBINAÇÃO DOS ANTIFÚNGICOS	75
5.6 COMPORTAMENTO DOS BIOFILMES EM FASE DE ADESÃO APÓS A ADIÇÃO DE ANTIFÚNGICOS.....	76
5.6.1 Determinação da concentração mínima inibitória de biofilmes (MBIC).....	76
5.6.2 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)	77
5.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	79
5.7 COMPORTAMENTO DOS BIOFILMES MADUROS APÓS A ADIÇÃO DE ANTIFÚNGICOS	80
5.7.1 Determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC)	80
5.7.2 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)	81
5.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	83
6 DISCUSSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICE 1 - SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	106

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Micoses de implantação são doenças causadas por fungos que surgem após um trauma através da pele ou mucosas e podem evoluir de forma subaguda ou crônica afetando não somente a pele, mas também estruturas profundas como vasos linfáticos, articulações, meninges e ossos (1). A esporotricose é uma micose de implantação cosmopolita causada por diversas espécies do gênero *Sporothrix*, um fungo termo dimórfico que a temperatura ambiente (25-30° C) assume a forma micelial e a 35-37° assume a forma leveduriforme. Esta transição induzida pela mudança de temperatura é uma estratégia de defesa parasitária que possibilita a infecção e a doença em mamíferos (2).

Historicamente, a esporotricose foi primeiramente descrita por Benjamin R. Schenck, ainda como aluno do curso de graduação em Medicina, em 1898, no Johns Hopkins Hospital, em Baltimore, Estados Unidos (FIGURA 1). O fungo foi isolado de lesões nodulares no dedo e antebraço de um paciente de 36 anos (3).

FIGURA 1 - IMAGEM DO ARTIGO PUBLICADO POR BENJAMIN R. SCHENCK EM 1898



LEGENDA: A) Observações ilustradas por Benjamin R. Schenck de cultura em ágar glicosado, esfregaço e ilustrações observadas no estudo microscópico das culturas mostrando hifas e conídios. B) Ilustrações de estudos anatomopatológicos de lesões caninas (abscessos de parede abdominal e linfonodo pulmonar) corados com coloração de Weigert demonstrando a presença de estruturas arredondadas e claviformes intra e extracelulares.

FONTE: Adaptado de Schenck, BR (1898).

No Brasil, Lutz e Splendore reportaram o primeiro caso de esporotricose em 1907, além de descreverem a fase parasitária do patógeno (4). Um ano mais tarde, Splendore descreveu o “corpos asteroides” presentes nos tecidos afetados com esporotricose, elementos importantes no diagnóstico histopatológico (5).

Por décadas, a esporotricose ficou conhecida como “doença dos jardineiros” pelo fato de ser transmitida pela implantação de propágulos infecciosos do agente através de vários tipos de traumas transcutâneos, ocasionados por fragmentos de vegetais. Esta é a forma de transmissão sapronótica, mas a transmissão pode acontecer através de lesões traumáticas relacionadas a vários animais como gatos, cães, esquilos, insetos e peixes e desta forma a transmissão é chamada zoonótica, podendo ainda ser saprozoonótica, quando o fungo é capaz de causar a doença das duas formas (6).

A partir da década de 90, um surto epidêmico de transmissão felina causada por *Sporothrix brasiliensis*, iniciou-se em municípios do estado do Rio de Janeiro, atingindo milhares de casos reportados somente em uma Instituição, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (7). O surto epidêmico atingiu todas as regiões brasileiras, e hoje já sendo documentada em países limítrofes como Argentina, Chile, Paraguai, Uruguai e provavelmente Bolívia, o que em conjunto com casos importados relatados nos Estados Unidos e Reino Unido indica a propagação desta espécie (8,9,10,11,12,13).

1.1 AGENTES INFECCIOSOS E MODOS DE INFECÇÃO

A esporotricose ocorre no homem e em outros animais, silvestres ou domésticos sendo causada por diversas espécies de fungos do gênero *Sporothrix*, dos quais, atualmente existem 70 espécies reconhecidas, como *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei*, e outras. A espécie mais virulenta associada à esporotricose é a *Sporothrix brasiliensis*, provavelmente por sua apresentar maior capacidade de produzir melanina na parede celular, cuja presença já foi descrita como fator de aumento de resistência antifúngica (14). A melanina constitui-se em importante fator de virulência de vários fungos patogênicos, constituindo-se em um eficaz mecanismo de escape das defesas do hospedeiro, sendo também considerado um fator de resistência a alguns antifúngicos, como anfotericina B, itraconazol e terbinafina (15,16).

A secreção de lesões, nasais e orais de felinos contém uma grande quantidade de leveduras que podem infectar humanos, cães, outros felinos e ratos diretamente pela forma leveduriforme, ao contrário da esporotricose de origem vegetal, transmitida pela fase filamentosa (17,18,19).

A maneira de transmissão do *S. brasiliensis* ao homem e a outros vertebrados até recentemente era considerada exclusivamente zoonótica, atribuída principalmente a gatos (*Felis catus*) portadores ou doentes através do contato suas secreções com soluções de continuidade da pele (arranhaduras e mordeduras), pela absorção mucosa. Todavia, Cognialli e colaboradores (2025) demonstraram que, além da transmissão através do contato com secreções felinas, o *S. brasiliensis* pode permanecer viável em superfícies como madeira, poliéster, fragmentos de telha e ácido inoxidável, de 10 a 25 dias após a inoculação com formas leveduriformes desta

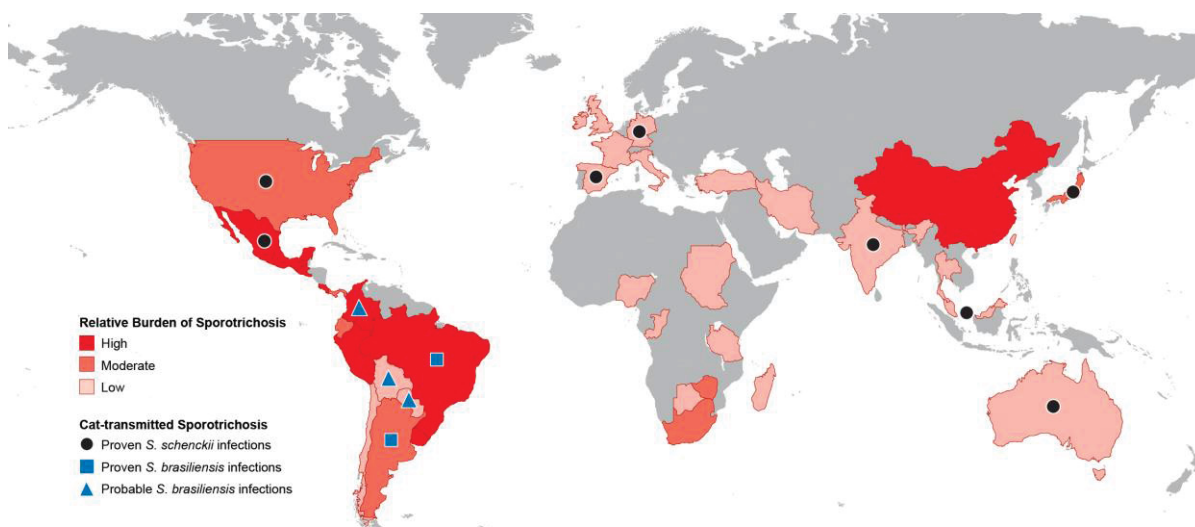
espécie, corroborando estudos anteriores que apontaram a possibilidade de transmissão através de fômites bem como por água e solo contaminados (20).

A esporotricose zoonótica pode ser considerada doença ocupacional em profissionais que manipulam os animais doentes, como médicos veterinários e auxiliares, assim como tutores e acumulares de gatos, funcionários de centros de controle de zoonose, “*pet houses*”, entre outros (21). Por isso a esporotricose de transmissão sapronótica ou zoonótica pode ser considerada como sendo doença ocupacional por afetar trabalhadores rurais, ou operários de indústrias que utilizam matéria prima de origem vegetal, e ainda profissionais que atuam nos cuidados com animais. A transmissão sapronótica é atribuída principalmente às espécies *S. schenckii* e *S. globosa* e a transmissão zoonótica ou saprozoonótica ao *Sporothrix brasiliensis* (22,21).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE DE TRANSMISSÃO ZONÓTICA

A esporotricose ocorre com maior frequência em países de clima tropical e subtropical e é considerada uma micose negligenciada, sendo um grave problema de saúde pública (18). É uma doença cosmopolita e o maior número de casos foram registrados no Brasil, China e México (FIGURA 2).

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DA ESPOROTRICOSE DE TRANSMISSÃO SAPRONÓTICA E ZONÓTICA



FONTE: Adaptado de (Queiroz-Telles et al., 2022).

No Brasil, o estado do Rio de Janeiro, apresenta a maior prevalência de esporotricose transmitida por gatos, onde houve 8.900 casos humanos notificados desde o início do surto e mais de 10.000 em 2020 (23), seguido pelo Rio Grande do Sul com 181 casos relatados em humanos em 2011 e 914 em 2022 (24) e a partir do mesmo ano, a esporotricose transmitida por gatos foi relatada em 25 dos 26 estados brasileiros, bem como nos países vizinhos. (9) (FIGURA 3).

FIGURA 3 - PREVALÊNCIA ESPOROTRICOSE NA AMÉRICA DO SUL E DISTRIBUIÇÃO DA ESPOROTRICOSE TRANSMITIDA POR GATOS EM HUMANOS CAUSADA POR *Sporothrix brasiliensis* EM 2022



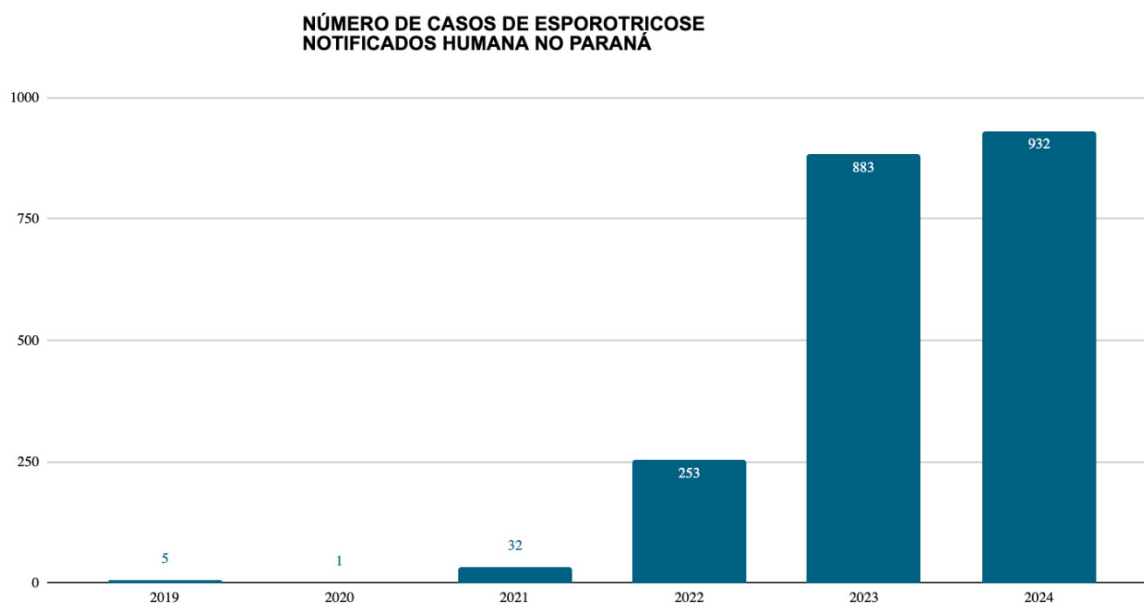
LEGENDA: Os ícones de gato indicam os países onde casos de esporotricose transmitida por gatos causada por *S. brasiliensis* foram notificados; as setas indicam a transmissão de gatos para gatos, humanos e cães.

FONTE: Adaptado de Cognialli et al. (2023).

O número de casos relatados no Brasil tem sido baseado principalmente no relato de casos publicados da literatura (25). Estes dados devem mudar para o próximo ano porque a partir de março de 2025 a esporotricose humana e animal entrou para a Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional (26).

No Paraná, a Secretaria Estadual da Saúde classificou a esporotricose como como doenças de interesse estadual e de notificação compulsória nos serviços de saúde públicos e privados em território estadual desde março de 2022 (27). Desde então, o número de casos notificados de esporotricose humana aumentou de 5 casos em 2019 para 932 em 2024 (28) (FIGURA 4).

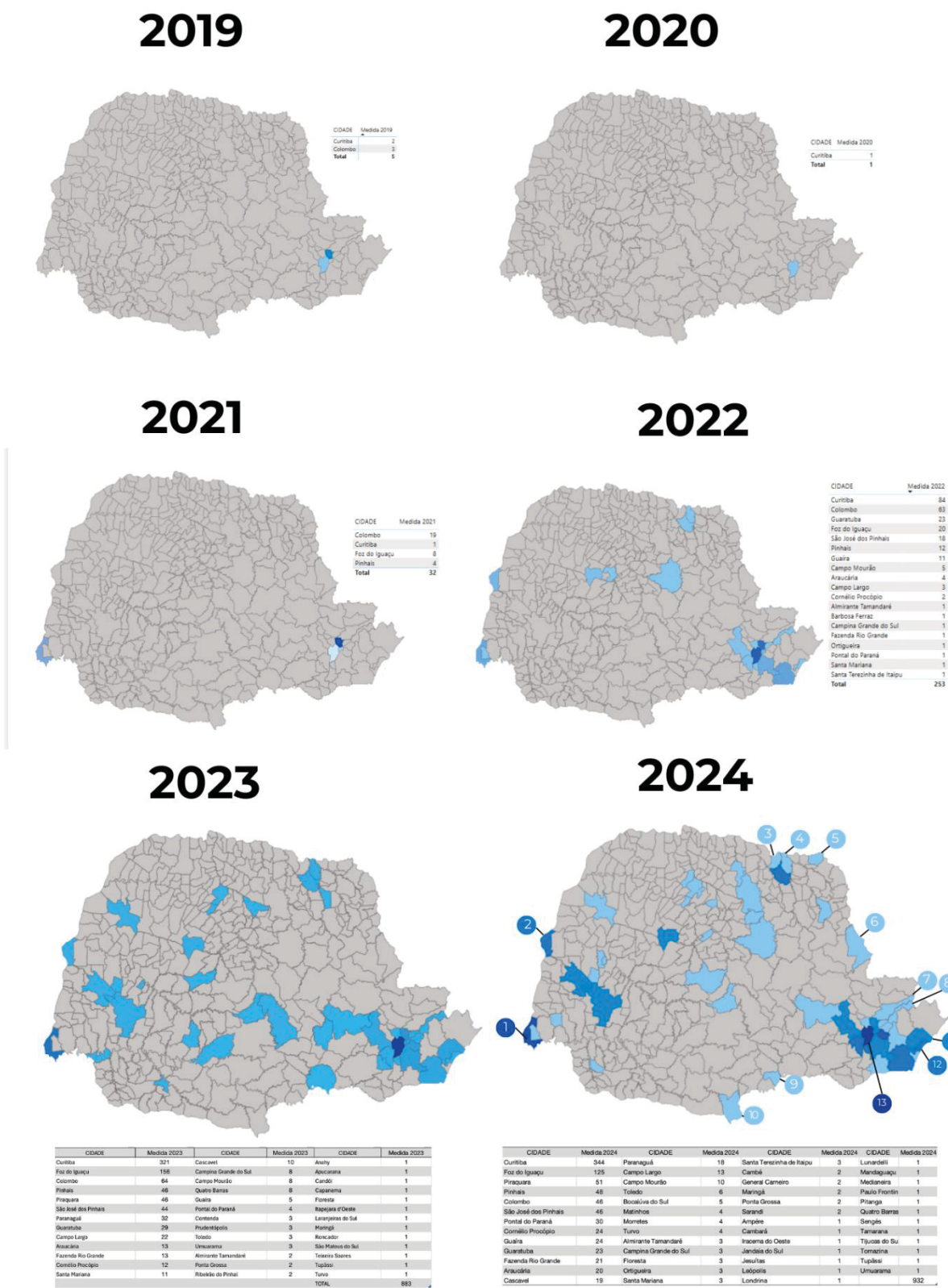
FIGURA 4 - GRÁFICO REPRESENTANDO NÚMERO DE CASOS DE ESPOROTRICOSE HUMANA NOTIFICADOS NO PARANÁ DE 2019 A 2024



FONTE: Adaptado de: Boletins Epidemiológicos de Esporotricose (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, 2025).

Além do aumento expressivo do número de casos relatados na capital (FIGURA 5.13) nos últimos 6 anos, a disseminação da esporotricose é preocupante devido ao crescente número de casos em cidades localizadas na fronteira do estado (FIGURAS 5.1 a 5.10), nas cidades portuárias (FIGURAS 5.11 e 5.12) e na fronteira internacional, já que no Paraná que se localiza a tríplice fronteira, juntamente com o Paraguai e a Argentina. A disseminação de *S. brasiliensis* para países fronteiriços do Brasil provavelmente ocorreu devido à livre circulação de gatos (domésticos e errantes) através das fronteiras nessas regiões e também pela utilização de felinos no intuito de caçar roedores em navios cargueiros (29).

FIGURA 5 - NÚMERO DE CASOS DE ESPOROTRICOSE HUMANA POR CIDADE NOTIFICADOS NO PARANÁ DE 2019 A 2024



LEGENDA: 1) Foz do Iguaçu, 2) Guaira, 3) Leopólis, 4) Santa Mariana, 5) Cambará, 6) Sengés, 7) Bocaiúva do Sul, 8) Campina Grande do Sul, 9) Paulo Frontin, 10) General Carneiro, 11) Paranaguá, 12) Pontal do Paraná, 13) Curitiba.

FONTE: Adaptado de: Boletins Epidemiológicos de Esporotricose (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, 2025).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da esporotricose em humanos se dividem em dois grandes grupos: manifestações cutâneas e extra cutâneas. Na esporotricose de transmissão zoonótica em humanos as manifestações clínicas mistas e adicionais podem ser encontradas.

1.3.1 Manifestações cutâneas

Na forma cutânea fixa, as lesões variam morfológicamente nas formas de pápulas, nódulos e úlceras que surgem de poucos dias a meses após a contaminação por traumas ou por contato direto com as lesões (FIGURA 6A).

Na forma linfocutânea, as lesões primárias podem se disseminar por via linfática, dando origem à forma linfocutânea ao atingir linfonodos formando nódulos ou abscessos que acompanham o trajeto linfático (FIGURA 6B).

Na forma cutânea disseminada, as lesões se assemelham às formas descritas anteriormente, com predomínio de lesões nodulares, supurativas, úlceras ou lesões verrucosas localizadas em qualquer parte da pele e das mucosas oral, ocular, nasal ou genital. As formas disseminadas tendem a se disseminar para outros órgãos, como ossos e articulações podendo incluir fungemia e comprometimento do sistema nervoso central (SNC). Pacientes imunossuprimidos, como diabéticos, alcoolistas e portadores do vírus HIV têm maior probabilidade de desenvolver formas disseminadas de esporotricose (30) (FIGURA 6E-6F).

1.3.2 Manifestações extra-cutâneas

O comprometimento ocular pode ocorrer por implantação local do fungo através de soluções de continuidade da pele ou mucosa ocular ou ainda via hematogênica, esta última mais comum em pacientes imunossuprimidos, especialmente os HIV positivos. Frequentemente se apresenta como coriorretinite, conjuntivite, dacriociste, granulomatosa (31). (FIGURA 6C-6D)

O comprometimento osteoarticular pode ocorrer nas formas disseminadas ou por implantação próxima da articulação afetada. As áreas mais comumente afetadas são joelhos, mãos, pés, pernas e antebraços. Dor, edema e eritema são os sintomas mais comuns e as imagens radiológicas se assemelham aos achados de osteomielite bacteriana (32).

Na forma pulmonar, pode se manifestar de maneira crônica, com sintomas semelhantes aos da tuberculose sendo mais comum em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica e etilismo, com tosse, expectoração moderada, ou de maneira aguda com queda do estado geral, tosse produtiva, hemoptise, perda de peso, dispneia, sendo mais comum em imunocomprometidos (32,19).

O acometimento primário do SNC é raro, mas têm sido vistos com maior frequência devido à disseminação do *S. brasiliensis* no Brasil. O comprometimento primário é mais comum em pacientes imunocompetentes e a disseminação hematogênica ocorre com maior frequência em imunossuprimidos (19).

A apresentação clínica mais comum é a meningite crônica com sintomas como cefaleia refratária a tratamentos com analgésicos, ataxia, sinais neurológicos focais, convulsões e confusão mental. O diagnóstico pode ser tardio e confundido com outras doenças crônicas porque estas manifestações não eram comuns em pacientes imunocompetentes até a disseminação de esporotricose de origem zoonótica acontecer (33,34).

Manifestações dermatológicas e/ou reumatológicas como erupção cutânea, lesões papulosas, eritema nodoso, eritema multiforme, artrite reativa, resultantes de reações de hipersensibilidade aos antígenos circulantes podem ocorrer em 30% dos pacientes com infecções zoonóticas por *S. brasiliensis* (35) (FIGURAS 6G-6H).

Finalmente, o surto de esporotricose de transmissão felina em curso no Brasil, tem revelado formas graves e disseminadas em pacientes imunodeprimidos por diversas comorbidades, incluindo AIDS, diabetes, alcoolismo crônico, corticoterapia e tratamento com imunobiológicos (30) (FIGURA 5).

FIGURA 6 - ASPECTOS CLÍNICOS DA ESPOROTRICOSE HUMANA



LEGENDA: A) Forma cutânea fixa, B) Forma linfo cutânea, C e D) Forma ocular E) Forma cutânea disseminada em paciente diabético, F) Forma cutânea disseminada com lesões verrucosas em paciente etilista G) Forma imunorreativa (Síndrome de Sweet), H) Forma imunorreativa (artrite)
 FONTE: Adaptado de Queiroz Telles et al. (2022).

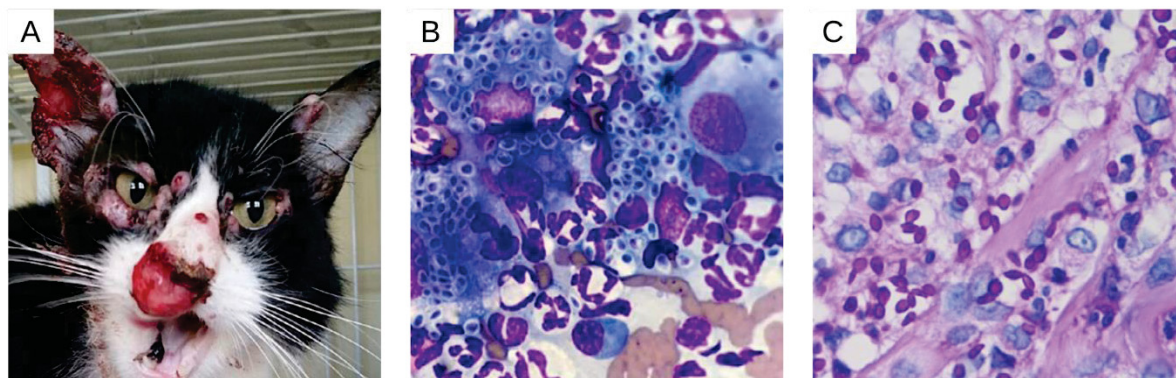
1.4 ESPOROTRICOSE FELINA

A esporotricose felina é mais comum em gatos machos não domesticados e pode se apresentar de maneiras diferentes que podem variar desde formas subclínicas até infecções disseminadas fatais (36). As manifestações cutâneas são as mais comuns, caracterizadas por múltiplas lesões nodulares ou ulceradas disseminadas pelo corpo. Os locais mais frequentes de infecção incluem a cabeça e os membros, com envolvimento frequente da mucosa nasal (11) (FIGURA 7).

O acometimento do sistema respiratório pode ocorrer e comumente se manifesta com como tosse e espirros. O comprometimento de mucosa nasal é comum e normalmente é sinal de mal prognóstico.

A epidemiologia da esporotricose felina é diferente da humana, a forma de disseminação é de mais difícil controle, uma vez que a doença é transmitida sobretudo por animais não domesticados selvagens, que podem não manifestar a doença e transmiti-la ou ainda, mesmo que apresente sintomas, dependem da identificação da doença e tratamento por parte de tutores ou profissionais (37,13).

FIGURA 7 - ASPECTOS CLÍNICO E MICROSCÓPICOS DA ESPOROTRICOSE FELINA



LEGENDA: A) Úlceras, nódulos em face, olhos, orelhas e região nasal em felino infectado com esporotricose. B) Exame citológico de esfregaço colhido de lesões mucosas mostrando grande número de estruturas leveduriformes coradas em azul. Coloração Giemsa, aumento 400X. C) Exame anatomopatológico de pele mostrando grande número de leveduras intra e intercelulares coradas na cor púrpura. Coloração Ácido Periódico de Schiff, Aumento 400X

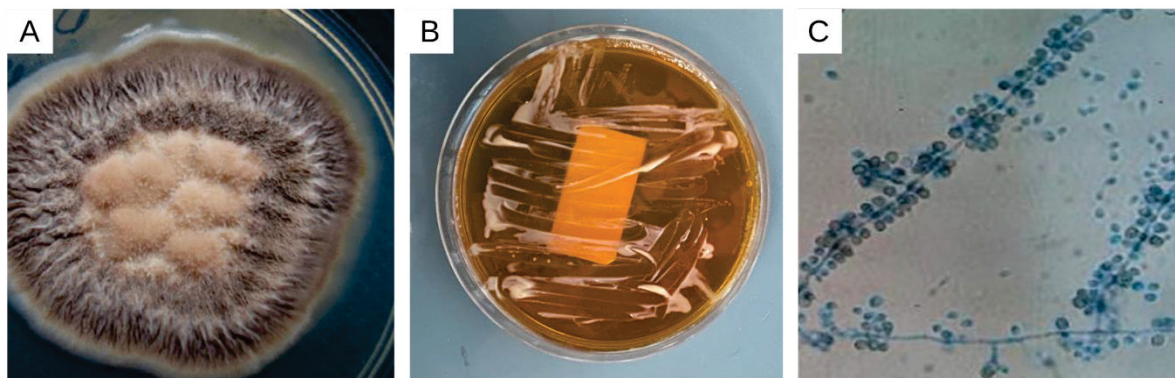
FONTE: Adaptado de Queiroz Telles et al. (2022).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR

O método de referência para confirmação do diagnóstico laboratorial é o isolamento em cultivo do agente, obtido de diversos materiais clínicos dos sítios orgânicos acometidos pela doença (38). As amostras podem ser semeadas em Ágar Sabouraud com antibiótico, a 25-30°C e desta forma em 5 a 8 dias surgem colônias membranosas, radiadas, esbranquiçadas ou bege. Em seguida, as colônias produzem micélio aéreo do tipo *coremium*, mantêm uma aparência mucoide na periferia e adquirem coloração marrom-escuro devido à melanização. Para obtenção de culturas leveduriformes o meio de cultura mais utilizado o Brain Heart Infusion (BHI). Após a semeadura as amostras devem ser mantidas a 35 a 37° C, e após 5 a 7 dias culturas cremosas esbranquiçadas e homogêneas são obtidas (12) (FIGURA 8).

Ao contrário de outras micoses humanas, a demonstração do agente etiológico nos espécimes clínicos por exames micológico direto e/ou histopatológico, tem valor secundário, por ter uma sensibilidade de 10 a 20%, dependendo da imunidade e forma clínica do paciente e expertise do examinador. Em pacientes imunossuprimidos e em gatos doentes a sensibilidade é maior (39,40,41).

FIGURA 8 - ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA ESPOROTRICOSE

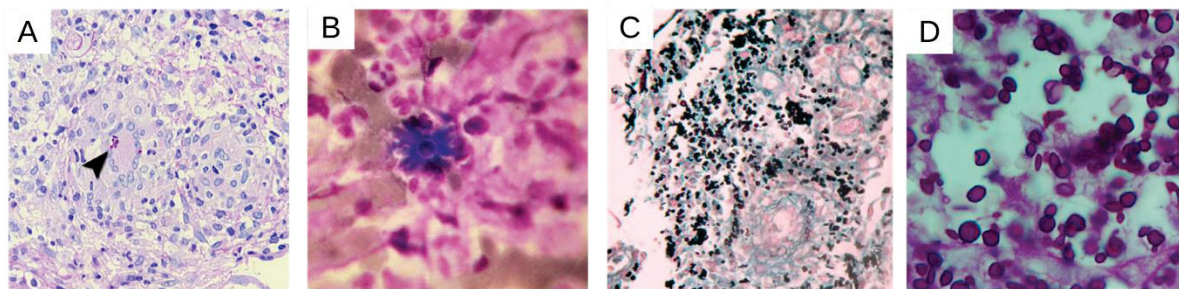


LEGENDA: A) Placa de Petri de cultura de fase filamentosa de *S. brasiliensis*, B). Placa de Petri de cultura de fase leveduriforme de *S. brasiliensis* C) Hifas hialinas e conidióforos unidos em forma de *bouquet*. Alguns conidióforos apresentam coloração acastanhada pela melanização.
 FONTE: A e C: Adaptado de Queiroz-Telles (2022) e B: A autora (2024).

O padrão histopatológico geralmente é granulomatoso, na maioria das vezes supurativo, mas também podem ser observados granulomas epitelióides, tuberculóides, em paliçada, de corpo estranho e sarcóides (22). Na maioria dos casos, linfócitos e plasmócitos complementam o infiltrado inflamatório. Técnicas especiais de coloração histológica para fungos, como Ácido Periódico de Schiff (PAS) e metenamina de prata de Gomori-Grocott, são utilizadas quando há suspeita clínica e um quadro histopatológico compatível. A presença de células fúngicas é rara e varia morfológicamente desde formas arredondadas medindo 1 a 2 μm a formas naviculares, em clava ou em “forma de charuto” que podem medir de 2 a 10 μm . Um número maior de células fúngicas é observado em tecidos de pacientes imunossuprimidos (1).

Os corpos asteroides são estruturas extracelulares, encontradas dentro de abscessos em aproximadamente 5% dos casos, e correspondem ao depósito de imunoglobulinas ao redor de uma célula fúngica com morfologia de levedura. Representam uma das manifestações do fenômeno de Splendore-Höeppli, sendo observados como material hialino, fibrilar ou em forma de clava, com disposição radial, eosinófilo na coloração por hematoxilina-eosina (H&E) e positivo na coloração por PAS (42,43) (FIGURA 9).

FIGURA 9 - DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DA ESPOROTRICOSE



LEGENDA: a) Células leveduriformes com formatos arredondado e em charuto (seta) no citoplasma de uma célula gigante multinucleada de Langherans. Coloração PAS, aumento de 400 X B) Corpo asteroide composto por uma coroa espiculada formada por uma célula leveduriforme arredondada, rodeada por depósitos de complexos imunes antígeno-anticorpo. Aumento de 1000 X. C) Várias células leveduriformes de formato arredondado ou em charuto em lesão de pele de um paciente diabético. Coloração de Grocott-Gomori, aumento de 200 X. D) Células leveduriformes de formato arredondado a alongado, com e sem gemulação, provenientes de amostra cutânea de um paciente com AIDS. Coloração PAS, aumento de 1000 X

FONTE: Adaptado de Queiroz-Telles et al., (2022).

Os testes sorológicos permitem detectar imunoglobulina G (IgG) específica para o gênero *Sporothrix*. A detecção de anticorpos circulantes é útil para diferenciar a esporotricose de outras doenças cutâneas semelhantes e para monitorar a resposta terapêutica. Os testes mais sensíveis são os métodos imuno enzimáticos (ELISA), Western blot, e o teste imunocromatográfico de fluxo lateral anti-*Sporothrix*, mas nenhum deles é comercializado (37,22,44,45). Devido às propriedades antigênicas comuns entre *S. schenckii*, *S. brasiliensis* e *S. globosa*, observa-se reação cruzada ao realizar esses testes (46). A disponibilidade destes testes é limitada, não sendo feito de rotina nos atendimentos de esporotricose.

O sequenciamento de DNA é o método de referência para a identificação molecular de espécies de *Sporothrix* de relevância médica, seguido pela análise filogenética. Para realizar a análise filogenética, é necessário incluir sequências de referência, derivadas de linhagens utilizadas na descrição das espécies (linhagens-padrão), disponíveis em bancos de dados públicos, como o GenBank (Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

A análise filogenética de linhagens de *Sporothrix* pode incluir um único marcador ou uma combinação de *loci* codificadores de proteínas, com o objetivo de aumentar a resolução da identificação molecular. A região *ITS* (do inglês, *Internal Transcribed Spacer*) é descrita como um excelente marcador de “código de barras” para identificação do gênero. A região *CAL* (calmodulina) identifica a espécie.

O sequenciamento de DNA permite a investigação da diversidade genética e da estrutura populacional do fungo durante surtos e epidemias, esclarecendo, assim, as rotas de transmissão e expansão de agentes fúngicos emergentes, como o *S. brasiliensis* (25).

1.6 DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS

A esporotricose pode mimetizar várias doenças infecciosas ou não infecciosas. É essencial a coleta correta de dados clínicos, com histórico de doenças prévias, e estabelecer o quadro de doenças que apresentam lesões semelhantes aos desta micose. De acordo com a apresentação clínica da esporotricose podemos fazer o diagnóstico diferencial pensando nas seguintes doenças (TABELA 1):

TABELA 1 – DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS DA ESPOROTRICOSE

Forma clínica	Diferenciais
Forma linfocutânea	Leishmaniose, feo-hifomicose, tuberculose ganglionar, sífilis, piodermites, hanseníase tuberculóide, micobacterioses atípicas (<i>M. marinum</i>) doença da arranhadura do gato, filariose e outras (30).
Forma cutânea fixa	Tuberculose verrucosa, cromoblastomicose, eumicetoma e actinomicetoma, dermatofitoses e candidíases granulomatosas, leishmaniose cutânea, papiloma e verrugas, boubá, botriomicose, impetigo, infecções por micobactérias (<i>M. fortuitum</i> e <i>M. marinum</i>), sarcoidose, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, carcinoma espinocelular, micose fungoide e outras (16).
Forma cutânea disseminada	Disseminação cutânea de micoses sistêmicas (paracoccidioidomicose, coccidioidomicose, histoplasmoses, criptococose, talaromicose, tuberculose e micobactérias não tuberculosas, sífilis e outras (30).
Forma pulmonar	Micoses pulmonares endêmicas, aspergilose crônica, tuberculose e outras micobacterioses, pneumonias bacterianas e virais (1).
Forma ocular	Diversas infecções bacterianas, virais e fúngicas podem imitar a esporotricose ocular e de anexos oculares, incluindo ceratites por <i>Fusarium spp.</i> e <i>Aspergillus, spp.</i> , hordéolo, calázio, entre outras (31).
Forma neurológica	Todas as causas de meningite crônica, incluindo tuberculose do sistema nervoso central (SNC) e micoses do SNC (33,34).

1.7 TRATAMENTO

Quando a esporotricose foi descrita no século XIX, não havia antifúngicos específicos disponíveis, assim o iodeto de potássio (KI), que era utilizado para uma série de doenças infecciosas ou não, foi o tratamento de escolha para o tratamento de esporotricose desde 1903 (22). O KI possui atividade imunomoduladora; diminuindo a produção de intermediários tóxicos do oxigênio pelos leucócitos polimorfonucleares e, assim, exercendo efeito anti-inflamatório. A capacidade do KI de destruir diretamente microrganismos ainda não foi comprovada. A dose para adultos é de 3 a 6 g/ dia e para crianças 1 a 2 g/dia. A dose inicial é de 5 gotas 3 vezes ao dia, aumentando a dose diariamente em 5 gotas até o máximo de 30 a 40 gotas. O KI ainda é amplamente usado no tratamento de esporotricose felina.

Os efeitos colaterais mais comuns são gosto metálico na boca, rinite, bronquite e edema de glândulas salivares (47,48).

Os principais medicamentos antifúngicos utilizados atualmente para o tratamento da maioria das formas clínicas da esporotricose são o itraconazol, a terbinafina e a Anfotericina B (6,25).

O itraconazol é um medicamento fungistático da classe dos azóis que inibe a síntese de ergosterol, o principal esterol da membrana celular fúngica. Dependendo da gravidade da doença e do estado imunológico do hospedeiro, a dose terapêutica pode variar de 100 a 400 mg/dia. (49,50). Embora apresente boa eficácia, o tratamento com itraconazol é longo, em média 6 meses para casos menos graves, podendo chegar a anos, e este medicamento pode causar diversos efeitos colaterais e interagir com outros medicamentos, como antidepressivos, redutores dos níveis de colesterol, anti-hipertensivos e outros, induzindo eventos adversos ou reduzindo sua eficácia (51).

Os principais efeitos adversos relatados são dores de cabeça e distúrbios gastrointestinais. Além disso, é hepatotóxico e teratogênico, não devendo ser utilizado em pacientes com doenças hepáticas ou em gestantes (52).

Pacientes intolerantes ao itraconazol ou refratários ao tratamento recomenda-se utilizar: terbinafina oral na dose de 125 a 250 mg/dia em crianças e de 250, 500 a 1000 mg/dia para adultos. A terbinafina é um fármaco da classe alilamina, que inibe a enzima esqualeno-epoxidase. Esta enzima transforma esqualeno em lanosterol, um dos precursores do ergosterol, mas ao contrário do efeito fungistático dos azóis a

terbinafina é fungicida, porque o esqualeno acumulado leva à morte celular fúngica (53,54,25). Pode haver interação medicamentosa com antidepressivos, lipolíticos, anticoncepcionais e outras drogas e apesar de ser fungicida e geralmente apresentar maior eficácia que os azóis nos testes de sensibilidade *in vitro*, a terbinafina apresenta menores taxas de cura que o itraconazol (55,56,25).

Para formas graves e disseminadas, deve se utilizar as diferentes formulações da anfotericina B, de utilização endovenosa (57,22). A anfotericina B é uma droga da classe dos polienos desenvolvida nos anos 50. Seu mecanismo de ação envolve alterações de permeabilidade celular, alterações da composição da membrana mitocôndrias e núcleo das células fúngicas. Apresenta alta toxicidade e há também o inconveniente de ser de administração injetável. A dose acumulativa é de 1g a 3g, uma vez alcançada a dose acumulativa e haja resposta terapêutica, é preferível mudar o tratamento para o uso de itraconazol (40). Ao contrário do itraconazol a anfotericina B pode ser administrada em gestantes, quando necessário (1).

No caso de impossibilidade do uso de itraconazol ou terbinafina, o Fluconazol pode ser usado na dose de 400 a 800 mg/ dia.

Entre os antifúngicos triazólicos mais novos, o posaconazol mostrou eficácia, mas o número de casos ainda é relativamente pequeno. O voriconazol e o isavuconazol, embora de amplo espectro e bastante tolerados, apresentaram altas concentrações inibitórias mínimas em testes de susceptibilidade *in vitro* e não foram usados em esporotricose, em casos suficientemente estudados para ser considerado tratamento de escolha na esporotricose humana (58).

Por ser uma doença causada por um fungo termo sensível, o uso de calor local como monoterapia e mais frequentemente como terapia coadjuvante melhora a resposta terapêutica. A eletrocoagulação e a crioterapia também podem ser utilizadas, sobretudo em casos resistentes com lesões crostosas (22). Testes de susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* em animais mostraram eficácia utilizando terapia fotodinâmica contra algumas espécies de *Sporothrix* e também em outras micoses (59).

1.8 SUSCEPTIBILIDADE *in vitro*

Estudos que avaliaram a susceptibilidade *in vitro* de *Sporothrix spp.* aos principais antifúngicos usados na terapêutica da esporotricose sugerem que pode

haver sensibilidade diferente entre as espécies testadas, mas sem a correlação com resistência *in vivo*, aos antifúngicos mais utilizados, como itraconazol e a terbinafina (60,61). Embora a maioria dos estudos tenha analisado essa espécie de fungo apenas na fase filamentosa, a diferença de susceptibilidade aos antifúngicos é atribuída à diversidade genética das diferentes espécies que causam doença humana ou animal (40,46,62).

A terbinafina apresenta com frequência menores concentrações inibitórias mínimas nos testes de susceptibilidade *in vitro* (63).

Para alguns testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro*, são estabelecidos pontos de corte clínicos, (do inglês, *Clinical Breakpoints* - CBPs). Os pontos de corte clínicos categorizam as linhagens como suscetíveis quando são inibidas por concentrações de fármaco que são alcançáveis clinicamente no local da infecção, e como resistentes quando não são inibidas por tais concentrações. Valores de CBPs ainda não foram estabelecidos para *Sporothrix brasiliensis* (64).

Nesse contexto, valores de corte epidemiológicos (ECVs) foram propostos. Almeida-Paes e colaboradores (2017), que sugeriram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$ para a terbinafina, e $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ para o itraconazol, como indicativos de susceptibilidade ou resistência, respectivamente.

Relatos recentes de pacientes com acometimento neurológico por *S. brasiliensis*, sugerem que esse microrganismo é capaz de formar pseudo cistos de conteúdo viscoso, semelhantes a biofilmes capazes de causar hipertensão intracraniana crônica e hidrocefalia (33).

A resistência de microrganismos, sejam bactérias ou fungos tem sido robustamente demonstrada na literatura, devido ao aumento de resistência dos mesmos quando causam infecções relacionadas à biofilmes (65). Há estudos demonstrando que leveduras do gênero *Candida*, *Cryptococcus* e outros fungos dimórficos, são produtores de biofilmes (66).

A capacidade da forma leveduriforme de *Sporothrix* sp de constituir biofilmes *in vitro*, assim como sua sensibilidade aos antifúngicos mais utilizados na terapêutica da esporotricose ainda foi pouco estudada (67). O melhor conhecimento da sensibilidade do agente a antifúngicos na fase parasitária abrigada em biofilmes, pode contribuir para melhorar estratégias terapêuticas de algumas das formas clínicas da esporotricose humana.

1.9 O PAPEL DOS BIOFILMES

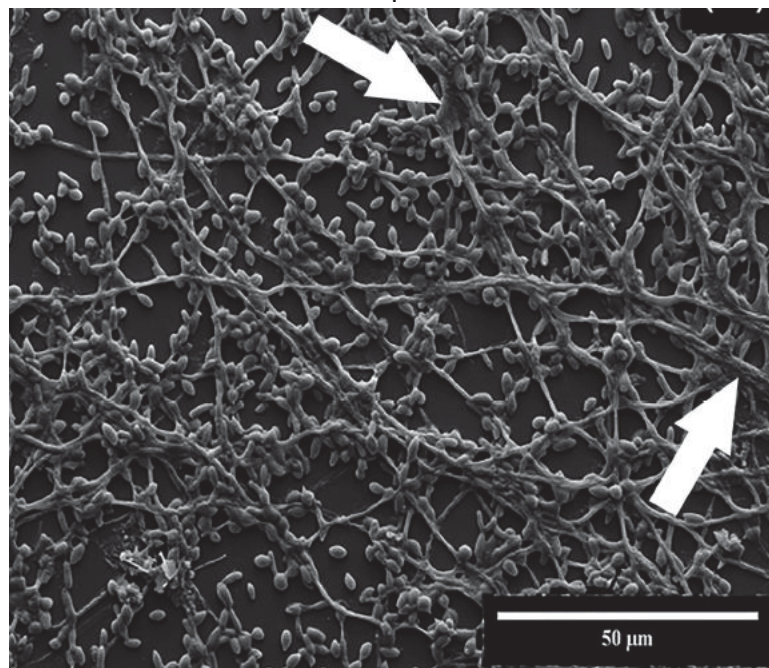
Bactérias e fungos, de uma maneira geral, são tradicionalmente descritos no meio ambiente em estado livre, suspenso e/ou flutuante, agindo individualmente. Este estado é denominado planctônico (68). Biofilmes são comunidades microbianas sésseis que aderem fortemente às superfícies e entre si, sendo protegidas e interligadas por uma matriz extracelular (MEC) composta principalmente por polissacarídeos (69,70).

As células, nesse contexto, exibem maior resistência e apresentam fenótipos diferentes em comparação com células planctônicas ou livres, estando associadas à persistência das infecções. Biofilmes podem aderir a superfícies bióticas como pele, dentes, ossos, articulações, traqueia e outros ou abióticas, como próteses e catéteres; em particular, as leveduras se aproveitam dessa condição para acessar a corrente sanguínea, devido ao tamanho reduzido, atingindo os órgãos internos dos pacientes. Isso é alarmante, pois infecções fúngicas disseminadas possuem uma alta taxa de mortalidade (71,1).

Estas comunidades multicelulares oferecem algumas vantagens aos microrganismos. Os benefícios incluem: maior resistência a agentes antimicrobianos, e antifúngicos, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, aumento da virulência, comunicação, cooperação metabólica e expressão gênica diferencial baseada na comunidade (72,2).

As primeiras investigações da matriz extracelular de espécies de biofilme fúngicos foram realizadas com *Candida albicans* (71,66). A capacidade de formação de biofilmes por linhagens do gênero *Sporothrix* em fase filamentosa, a morfologia dos mesmos bem como a susceptibilidade *in vitro* a diversos antifúngicos como itraconazol, voriconazol, anfotericina B, cetoconazol, terbinafina e caspofungina já foi demonstrada em estudos anteriores (65,73,74) (FIGURA 10).

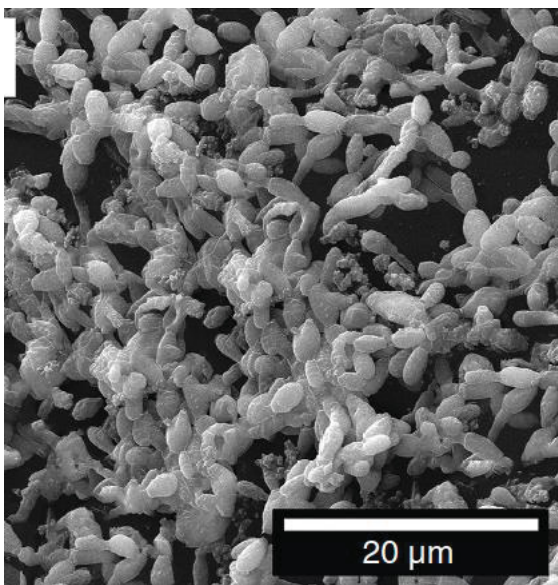
FIGURA 10 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILME DE FORMA FILAMENTOSA DE *Sporothrix brasiliensis*



LEGENDA: Observação da matriz extracelular (seta).
FONTE: Adaptado de Brilhante et al (2017).

Como a forma infectante do *S. brasiliensis* em humanos é a forma leveduriforme, estudos sobre a formação destes biofilmes, bem como a susceptibilidade dos mesmos a antifúngicos vêm ganhando destaque na literatura para melhor entendimento e ajustes no tratamento destas doenças (75,76) (FIGURA 11).

FIGURA 11 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILME DE FORMA LEVEDURIFORME DE *Sporothrix brasiliensis*.



FONTE: Adaptado de Brilhante et al., (2018).

2 JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Todas as espécies do gênero *Sporothrix* de interesse médico já foram relatadas como causadores de infecções recalcitrantes ou persistentes, sugerindo resistência a agentes antifúngicos (77,57,14).

Além disso, numerosos aspectos genéticos e bioquímicos de culturas planctônicas foram examinados, em particular, a composição glicoproteica da matriz extracelular que é secretada por esses agentes patogênicos na formação e manutenção dos biofilmes (78). Estes compostos já foram considerados como um dos fatores que contribuem para a resistência a antifúngicos (79). Em adição, já foi sugerido que, pelo menos em modelos experimentais, *S. brasiliensis* é mais virulento *in vivo* do que as outras espécies do mesmo gênero (80).

Estudos anteriores revelaram a capacidade de *Sporothrix spp.* de produzir biofilmes e que estes podem ser sensíveis a doses maiores de antifúngicos do que as formas planctônicas (81,75,82).

A lenta resposta ao tratamento na esporotricose, mesmo em indivíduos imunocompetentes, pode estar relacionada à capacidade do *Sporothrix brasiliensis* em formar biofilmes (83,33,84).

Sendo as formas leveduriformes de *Sporothrix brasiliensis* as formas infectantes e as formas encontradas em exames anatomopatológicos, os biofilmes formados por estas formas (leveduriformes) podem ser mais resistentes aos antifúngicos disponíveis para o tratamento de esporotricose, levando à necessidade e de se propor novos esquemas terapêuticos (38,85).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a capacidade de produção de biofilmes de *Sporothrix brasiliensis* e se a mesma pode estar implicada na resistência à resposta terapêutica da esporotricose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Produção de biofilmes *in vitro* por células leveduriformes de *S. brasiliensis*.
- 2) Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de biofilmes da forma parasitária de *S. brasiliensis* aos antifúngicos itraconazol e terbinafina.
- 3) Descrever a ultraestrutura de biofilmes produzidos por *S. brasiliensis* através de microscopia confocal (MC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética, do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) número de certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) 41462620.5.0000.0096 e parecer 6.610.812.

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, de natureza laboratorial, que avaliou a suscetibilidade antifúngica de formas planctônicas e de biofilmes de *Sporothrix brasiliensis* ao itraconazol e à terbinafina, testados isoladamente e em associação. As concentrações inibitórias mínimas e a interação entre os antifúngicos foram determinadas para células planctônicas por microdiluição em caldo e método de *CHECKERBOARD*, conforme o CLSI M27-A3. A produção e a susceptibilidade dos biofilmes foram analisadas por métodos quantitativos e qualitativos, incluindo espectrofotometria, microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura.(86,87).

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (LabMicro), em parceria com o Setor de Micologia do Complexo Hospital de Clínicas de Curitiba, (CHC/UFPR), no Centro de Microscopia Confocal (UFPR) e no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) também da UFPR.

4.3 LINHAGENS DE *Sporothrix brasiliensis*

Um total de 7 linhagens de *Sporothrix brasiliensis* foram isolados de casos humanos de pacientes com esporotricose tratados no ambulatório de doenças infecciosas do Complexo Hospital de Clínicas de Curitiba (CHC-UFPR). As linhagens foram identificadas como *Sporothrix* por micromorfologia e cultura no Laboratório de

Micologia Médica e armazenadas em ágar Sabouraud dextrose (KASVI Ltda, Pinhais, PR, Brasil).

Todas as linhagens foram depositadas nas Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense - Taxonline - (<https://www.cmrp-taxonline.com>), do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, até sua utilização. A identificação molecular das linhagens foi realizada por sequenciamento do gene calmodulina (*CAL*), pelo Departamento de Microbiologia da UFPR, com posterior comparação em banco de dados GenBank. A identificação das linhagens, tipo de lesão e origem dos materiais colhidos para as culturas e os números de acesso no GenBank encontram-se sumarizados na Tabela 2 (TABELA 2).

TABELA 2 - LINHAGENS REFERÊNCIAS UTILIZADAS NO ESTUDO

Identificação	Número de coleção	Número de Acesso GenBank	Fonte
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CMRP3967	OQ571295.1	Isolado de abscesso forma linfo cutânea
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CMRP5491	Em processo	Secreção conjuntival
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CMRP2525	MG869808.1	Isolado de líquido peritoneal
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CMRP3955	OQ571286.1	Biópsia de antebraço direito
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CMRP5318	ON397982.1	Abcesso braço direito
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CMRP3944	Em processo	Biópsia de pele
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CMRP5083	ON397983.1	Secreção de lesão em punho

Fonte: A autora (2025).

4.4 OBTENÇÃO DE FORMAS LEVEDURIFORMES

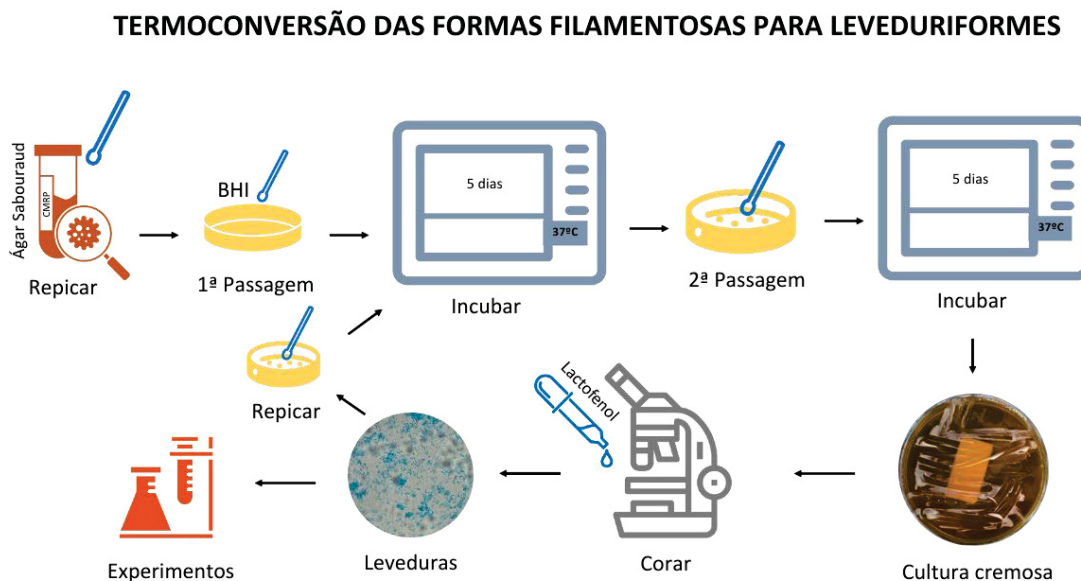
4.4.1 Termoconversão de formas filamentosas para formas leveduriformes de *Sporothrix brasiliensis*.

As linhagens foram armazenadas em Ágar Sabouraud a 28°C na forma filamentosa, e para os experimentos a termo conversão de formas filamentosas para formas leveduriformes foi obtida por culturas em BHI. Os espécimes foram repicados e inoculados em meio de BHI e foram incubadas por 5 dias a 37°C para cada passagem.

Após reversão em BHI, foi realizada análise microscópica das colônias utilizando o corante lactofenol de Amann acrescido com azul de algodão (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Indaiatuba, SP, Brasil) e foram analisadas em microscópio até que só houvesse formas leveduriformes nas lâminas, para avaliar se houve reversão completa. Subculturas foram realizadas a cada 5 dias durante os ensaios para manter as linhagens sob essas condições (com a presença de células em forma de charuto e sem a presença de hifas nas lâminas) e só depois essas culturas foram utilizadas nos experimentos (88).

A termo conversão das linhagens está representada esquematicamente na ilustração da FIGURA 12.

FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TERMOCONVERSÃO DE FORMAS LEVEDURIFORMES DE *Sporothrix brasiliensis*



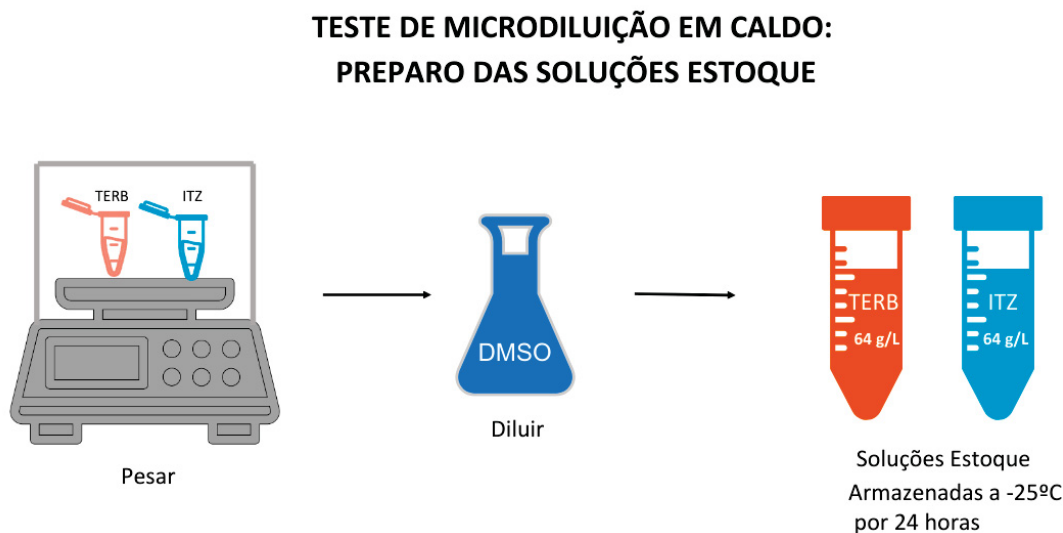
FONTE: A autora (2025).

4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* (MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO)

4.5.1 Antifúngicos utilizados – preparo das soluções estoque

Dois antifúngicos foram usados no teste de suscetibilidade: o itraconazol (ITZ; Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EUA) e a terbinafina (TERB; Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EUA). Os antifúngicos foram pesados em balança analítica de precisão (Shimadzu do Brasil Co. São Paulo, SP, Brasil) diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO - Merck, Darmstadt, Alemanha) como recomendado no documento M27-A3, nas concentrações de 64 gramas por litro e foram estocados a -25°C até o momento dos experimentos (89) (FIGURA 13).

FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE PARA OS TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE COM A TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

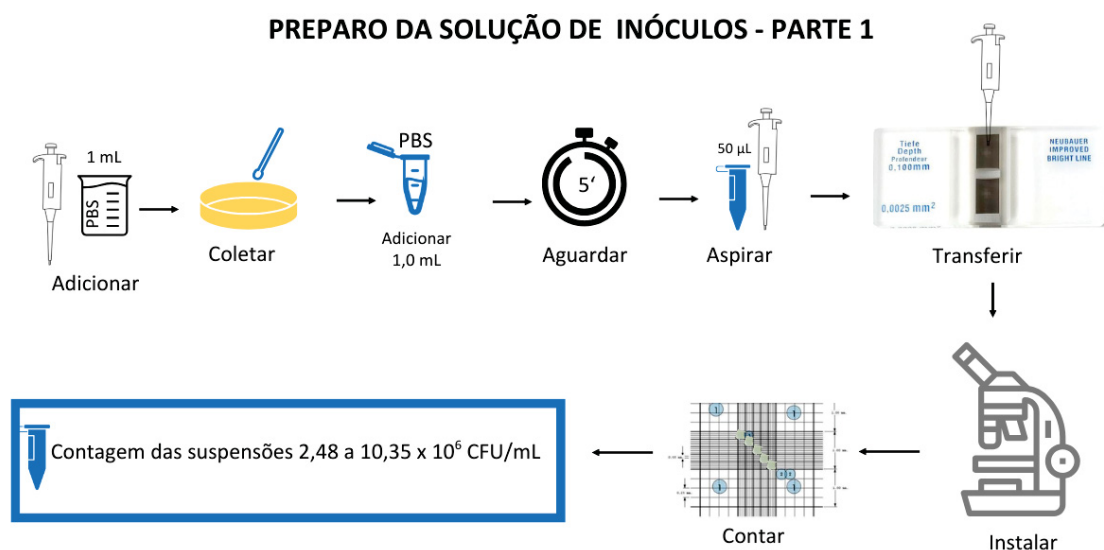


FONTE: A autora (2025).

4.5.2 Preparo das soluções de inóculos para os testes de susceptibilidade de terbinafina e itraconazol

Para todos os experimentos foi necessária a preparação da solução de inóculos de todas as linhagens. Para obter cada solução, o volume de 1 mL de solução salina fosfato tamponada (PBS) foi adicionada à cada colônia. A suspensão fúngica foi escarificada com alça de inoculação esterilizada, o conteúdo escarificado foi adicionado um tubo do tipo Eppendorf de 2 mL contendo 1 mL de PBS. Após aguardar 5 minutos, que é o tempo requerido para a sedimentação, a alíquota de 50 μ L de cada suspensão foi colocada numa Câmara de Neubauer para a contagem celular. As contagens corresponderam a 2,48 to 10,35 $\times 10^6$ unidades formadoras de colônia por mililitro de solução de inóculos (UFC/mL) (65). A representação esquemática desta etapa (etapa 1) do preparo de inóculos está representada na ilustração da FIGURA 14.

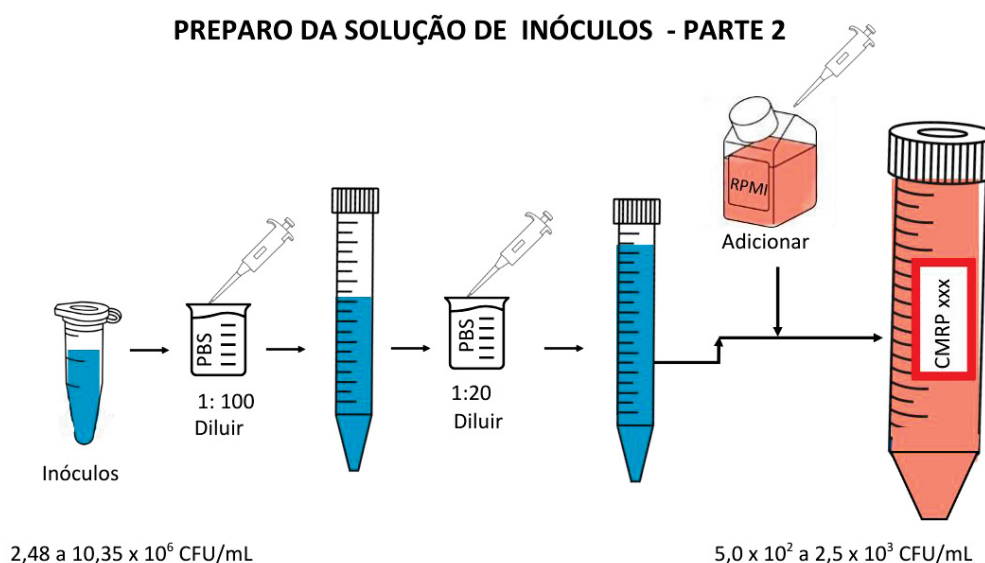
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO DA SOLUÇÃO DE INÓCULOS DE *Sporothrix brasiliensis* (ETAPA 1)



FONTE: A autora (2025).

Na etapa seguinte (etapa 2), realizada logo em seguida, a solução de inóculos obtida na etapa 1 foi diluída 1:100 e em seguida 1:20 em PBS e a quantidade suficiente do meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (Nova Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) foi adicionada às suspensões para obter uma solução final de inóculos com a concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. A FIGURA 15 representa esquematicamente a etapa 2 do preparo da solução de inóculos.

FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DA SOLUÇÃO DE INÓCULOS – ETAPA 2



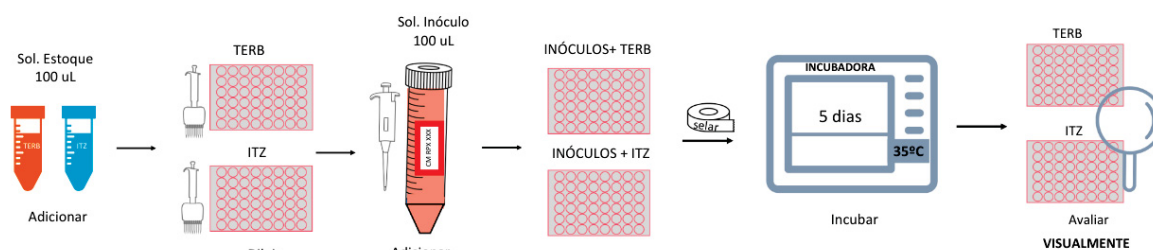
FONTE: A autora (2025).

4.5.3 Montagem das microplacas para os testes de susceptibilidade

Os antifúngicos foram testados na concentração final variando de 0,03 a 16 $\mu\text{g/mL}$. Os testes foram executados em duplicata para cada linhagem. Para o ensaio de microdiluição em caldo foram utilizadas 2 microplacas de poliestireno de 96 poços. Uma para terbinafina e outra para Itraconazol. A alíquota 100 μL das soluções de cada droga foi adicionada em cada poço com 100 μL de solução de inóculos em RPMI. As microplacas foram seladas e incubadas a 35°C por 5 dias em incubadora de laboratório de ventilação forçada HF 212UV (HealForce Co., Xangai, China). A linhagem *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi incluída como controle de qualidade. Após o período de incubação, a leitura do experimento foi visual (63,90) (FIGURA 16).

FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS PARA TESTE DE DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE TERBINAFINA E ITRACONAZOL

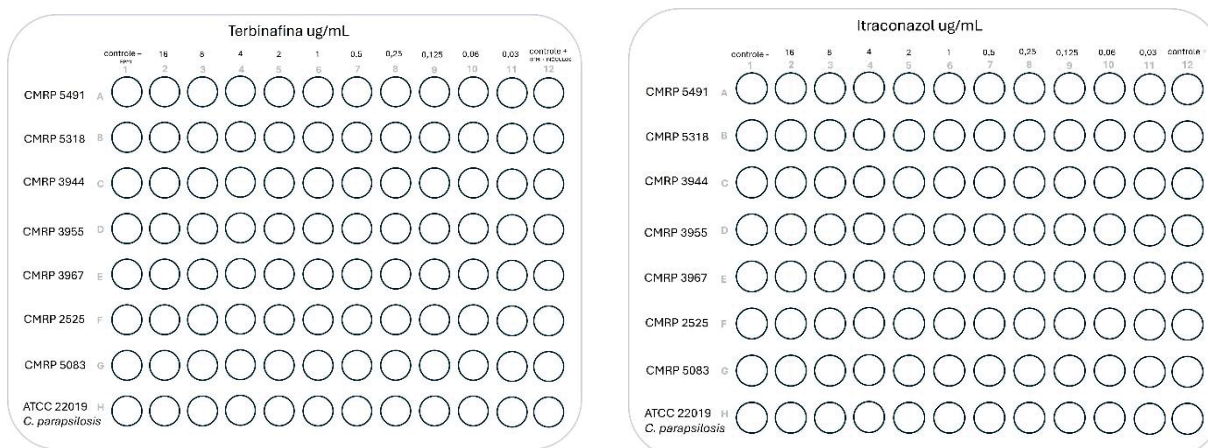
TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO - PREPARO DAS MICROPLACAS



FONTE: A autora (2025).

As colunas 1 das microplacas foram preparadas para serem os controles negativos, contendo 200 µL de RPMI e a colunas 12 foram preparadas para serem os controles positivos contendo 200 µL de soluções de inóculos (FIGURA 17).

FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MICROPLACAS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE TERBINAFINA E ITRACONAZOL



FONTE: A autora (2025).

4.5.4 Medidas Avaliada na leitura dos testes de susceptibilidade *in vitro*

Através da leitura visual dos testes de susceptibilidade *in vitro* foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM ou MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) a qual é a mínima concentração de antifúngico capaz de inibir

80% do crescimento fúngico para terbinafina e 100% para a itraconazol comparados ao controle positivo já previamente estabelecido (63). As concentrações mínimas capazes de inibir 50% (MIC 50) e 90% (MIC 90) do crescimento de fungos para as respectivas linhagens também foram calculadas (81).

4.5.5 Testes de interações dos antifúngicos

A avaliação das interações entre as drogas foi feita através da técnica de *checkerboard* (61). Para executar o ensaio de *checkerboard* foi selecionada uma das sete linhagens com base em critérios específicos para garantir uma representatividade de resultados confiável.

A linhagem *Sporothrix brasiliensis* CMRP 2525 foi a escolhida porque apresentou visualmente um aspecto mais cremoso nas culturas sem estruturas algodonosas na superfície e por apresentar maior número de células nos esfregaços das lâminas coradas com lactofenol.

Os ensaios de *checkerboard* foram feitos em duplicata e em 2 dias diferentes (41). As soluções estoque para estes ensaios de foram preparadas na concentração de 3200 µg/mL. Estas soluções antifúngicas foram adicionadas à meios de cultura RPMI de modo que a concentração para o ensaio de TERB foi de 0,5 µg/mL e de ITZ foi de 4 µg/mL . Cada droga foi diluída em série utilizando o fator de diluição 2 baseado nos valores encontrados previamente no teste de susceptibilidade.

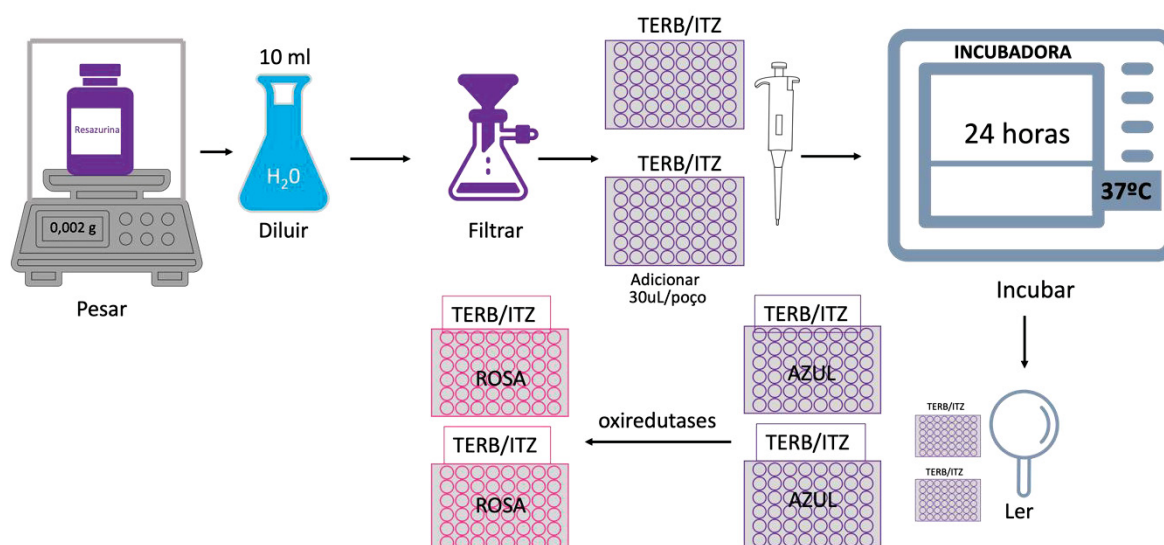
As soluções antifúngicas foram distribuídas em microplacas de 96 poços, numa quantidade de 100 µL por poço. Para poder interpretar os resultados corretamente, foram incluídas diluições suficientes para duas vezes abaixo e acima da CIM para cada antifúngico.

Depois da preparação das microplacas com as drogas 100 µL de solução de inóculo foram adicionadas aos poços. O poço 12H foi preenchido com solução de inóculo e RPMI para servir de controle positivo. Depois de semeadas, as microplacas foram seladas e incubadas por 7 dias a 35°C ().

A leitura do teste de *checkerboard* foi feita de maneira visual utilizando o corante resazurina (91,92).

O sal de resazurina (Exodo Scientific, Sumaré, SP, Brasil) foi diluído de acordo com as instruções do fabricante adicionando 0,02 g do referido corante em pó a 10 mL de água destilada. Após a filtragem, o volume de 30 μ L do corante foi adicionado a cada poço e depois de seladas as microplacas foram novamente incubadas a 37° por mais de 24 horas. A mudança na coloração de azul para rosa indica a transformação da resazurina em resorufina na presença de oxiredutases de células viáveis indicando que houve crescimento fúngico. (FIGURA 20)

FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA COLORAÇÃO DAS MICROPLACAS DOS ENSAIOS DE *checkerboard* COM RESAZURINA



FONTE: A autora (2025).

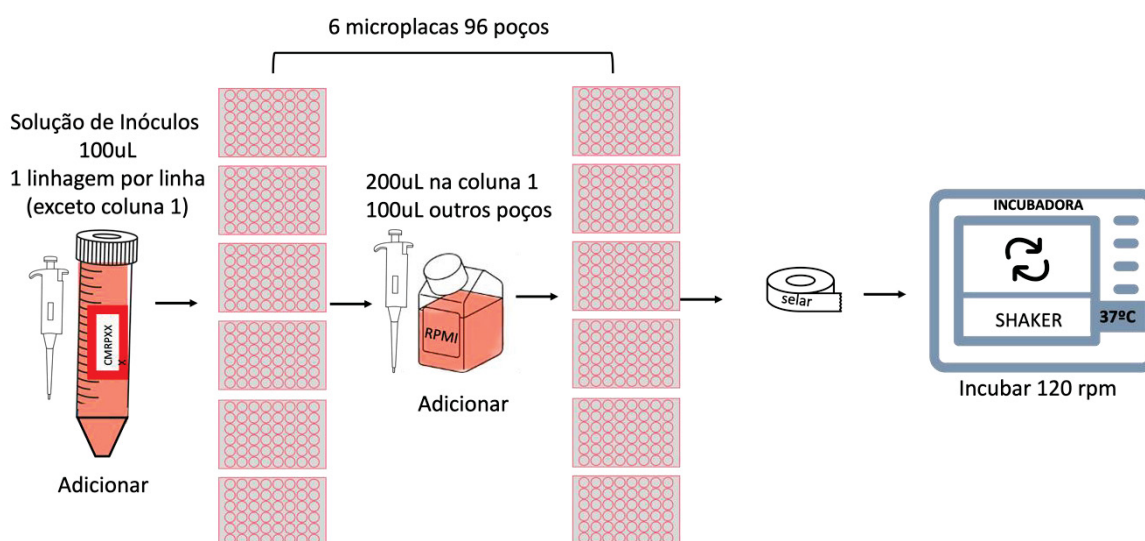
A concentração inibitória fracionada (FIC, do inglês, *fractional inhibitory concentration*) foi calculada para cada agente dividindo o valor da CIM de cada droga em combinação pelo valor da CIM de cada droga isoladamente. E para este cálculo as CIMs foram arredondados para a próxima concentração mais alta disponível. Depois de encontrar a concentração inibitória fracionada os valores de FIC foram somados para determinar o índice de concentração inibitória fracionada (FICI, do inglês, *fractional inhibitory concentration index*) e a partir desse índice, foi determinado

como sinergismo $FICI \leq 0,5$, indiferença se $0,5 < FICI \leq 4$ e antagonismo se $FICI > 4$ (93).

4.6 PRODUÇÃO DE BIOFILMES

Para avaliação do crescimento cinético e da biomassa, 6 microplacas de poliestireno de 96 poços foram completadas com 100 μL de suspensão de inóculos de cada isolado e 100 μL de RPMI. As microplacas foram então seladas e incubadas a 37° em incubadora do tipo *shaker* refrigerada com agitação orbital (Modelo SL-223, Solab Equipamentos, Piracicaba, SP, Brasil), com agitação orbital contínua ajustada a 120 rotações por minuto (rpm), para promover o crescimento celular. Os ensaios foram realizados em duplicata e em dias diferentes (FIGURA 21).

FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DE MICROPLACAS PARA PRODUÇÃO DE BIOFILMES E ESTUDO DE BIOMASSA

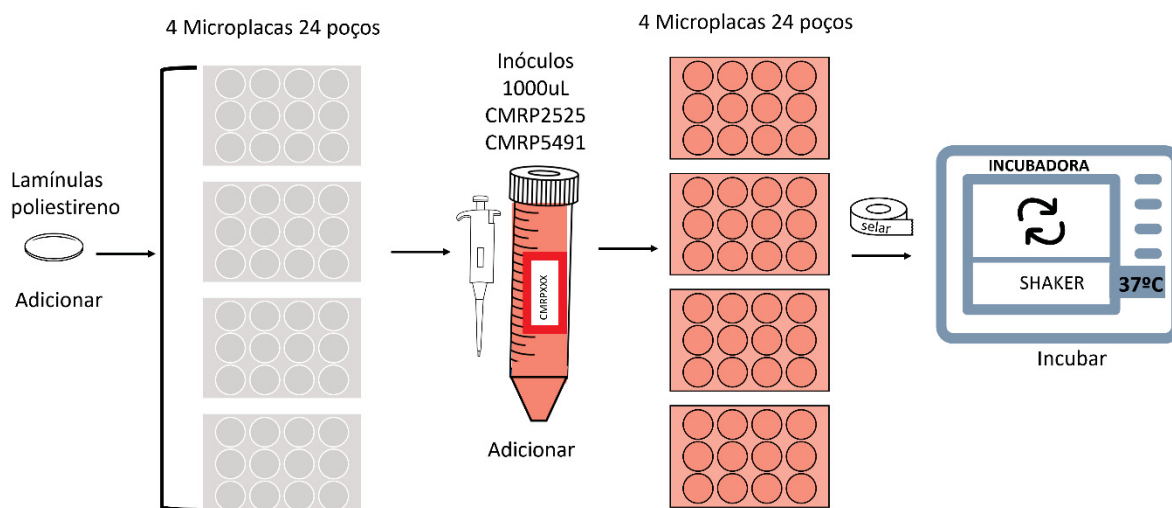


FONTE: A autora (2025).

Para os estudos de morfologia, alterações estruturais e susceptibilidade antifúngica dos biofilmes através da microscopia confocal e da microscopia eletrônica, depois da preparação das soluções de inóculos utilizando a metodologia já descrita, uma alíquota de 1000 μL de solução de inóculos de 2 linhagens a CMRP 2525 e a CMRP 5491, foram adicionados à 4 microplacas de 24 poços contendo 1 lamínula redonda de cultura celular (SPL Life Sciences Co. Coréia do Sul) por poço. Estas

microplacas também foram seladas e incubadas a 120 rotações por minuto e a 37° em incubadora *shaker* com agitação orbital contínua por um período de 3 horas de incubação (FIGURA 22).

FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS PARA PRODUÇÃO DE BIOFILME PARA MICROSCOPIA CONFOCAL E MICROSCOPIA ELETRÔNICA



FONTE: A autora (2025).

4.7 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS BIOFILMES DE FORMAS LEVEDURIFORMES DE *Sporothrix brasiliensis*

4.7.1 Soluções estoque de antifúngicos para o tratamento em biofilmes

Para os ensaios de biofilme, soluções estoques de terbinafina de 50 µg/mL e de itraconazol de 400 µg/mL, diluídas em DMSO foram preparadas para atingir 4 vezes a concentração inibitória mínima de cada antifúngico, previamente determinados nos experimentos de teste de susceptibilidade *in vitro*. As soluções estoque dos dois antifúngicos foram diluídas em 10 vezes de modo que a concentração final variou de 0.002 a 1 µg/mL para terbinafina e de 0.016 a 8 µg/mL para itraconazol. As microplacas para avaliação da interação com drogas foram preparadas de acordo com o método descrito acima, com a diferença que as soluções acima foram diluídas previamente aos experimentos, de modo que as 10

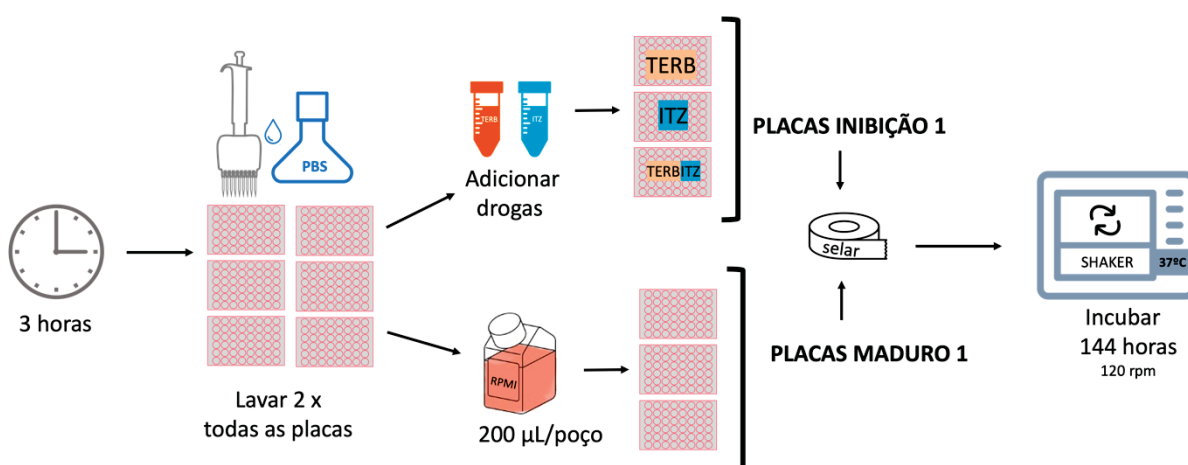
concentrações variaram de 0,002 a 1 µg/mL a 0,016/8 µg/mL para terbinafina e itraconazol respectivamente.

4.7.2 Ensaios de inibição da formação de biofilmes

Após um período de 3 horas de incubação, cada poço das 6 microplacas de 96 poços preparadas com biofilmes e incubadas foram lavados 2 vezes com solução de PBS. As soluções estoque de RPMI contendo TERB nas concentrações que acima detalhadas foram adicionadas a uma das microplacas. Uma segunda microplaca recebeu soluções estoque de RPMI contendo ITZ enquanto a terceira microplaca foi preenchida com a combinação dos 2 antifúngicos nas mesmas concentrações adicionadas a cada um dos poços. Estas 3 microplacas após preparadas foram nomeadas “placas inibição 1”.

As 3 microplacas restantes foram preparadas com a adição de 200 µL de RPMI e foram nomeadas “placas maduro 1”. Todas as microplacas em seguida foram seladas e incubadas a 120 rotações por minuto e a 37° em incubadora *shaker* com agitação orbital contínua. (FIGURA 23).

FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS DE 96 POÇOS PARA TESTE DE INIBIÇÃO DOS BIOFILMES

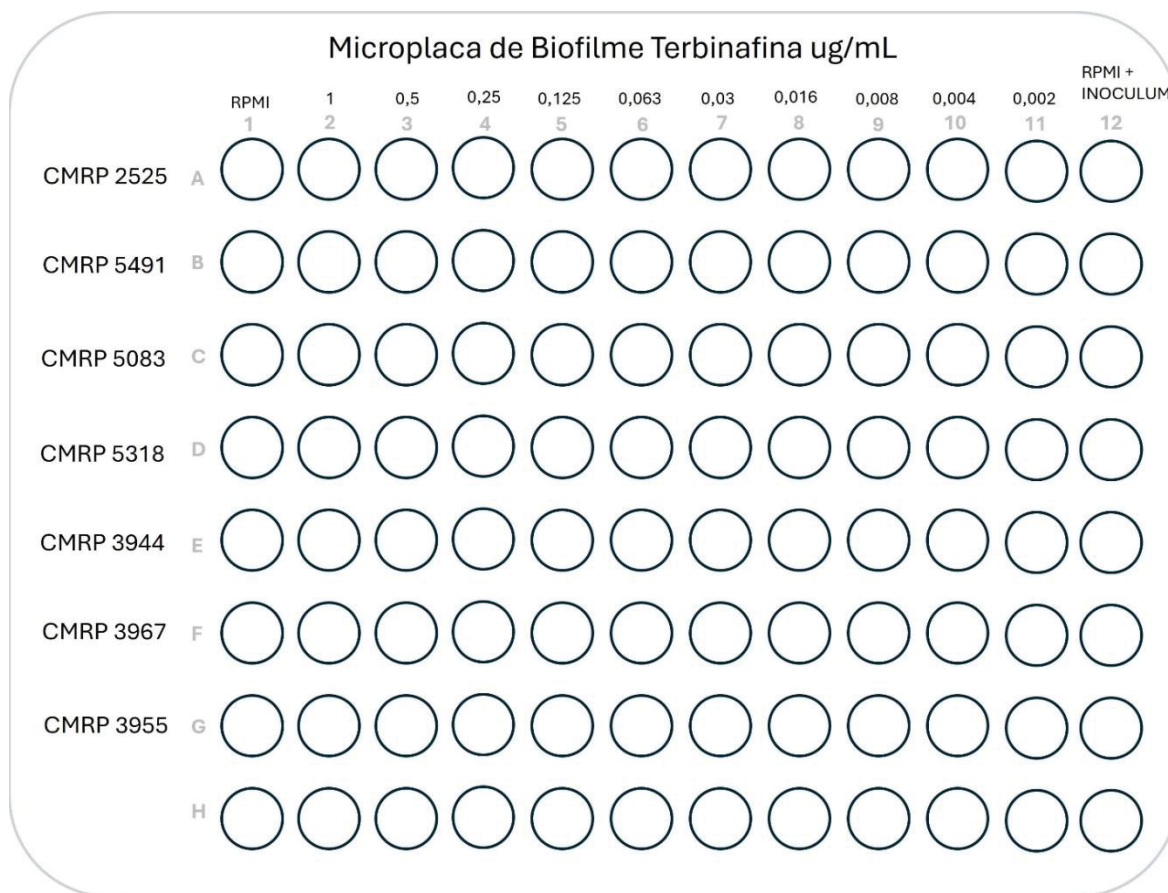


FONTE: A autora (2025).

Os controles negativos (OD branco) foram preparados adicionando 200 µL do meio RPMI não inoculado nos primeiros poços da esquerda (coluna 1) e os controles positivos (OD controle) adicionando 100 µL de solução de inóculos a 100 µL de RPMI

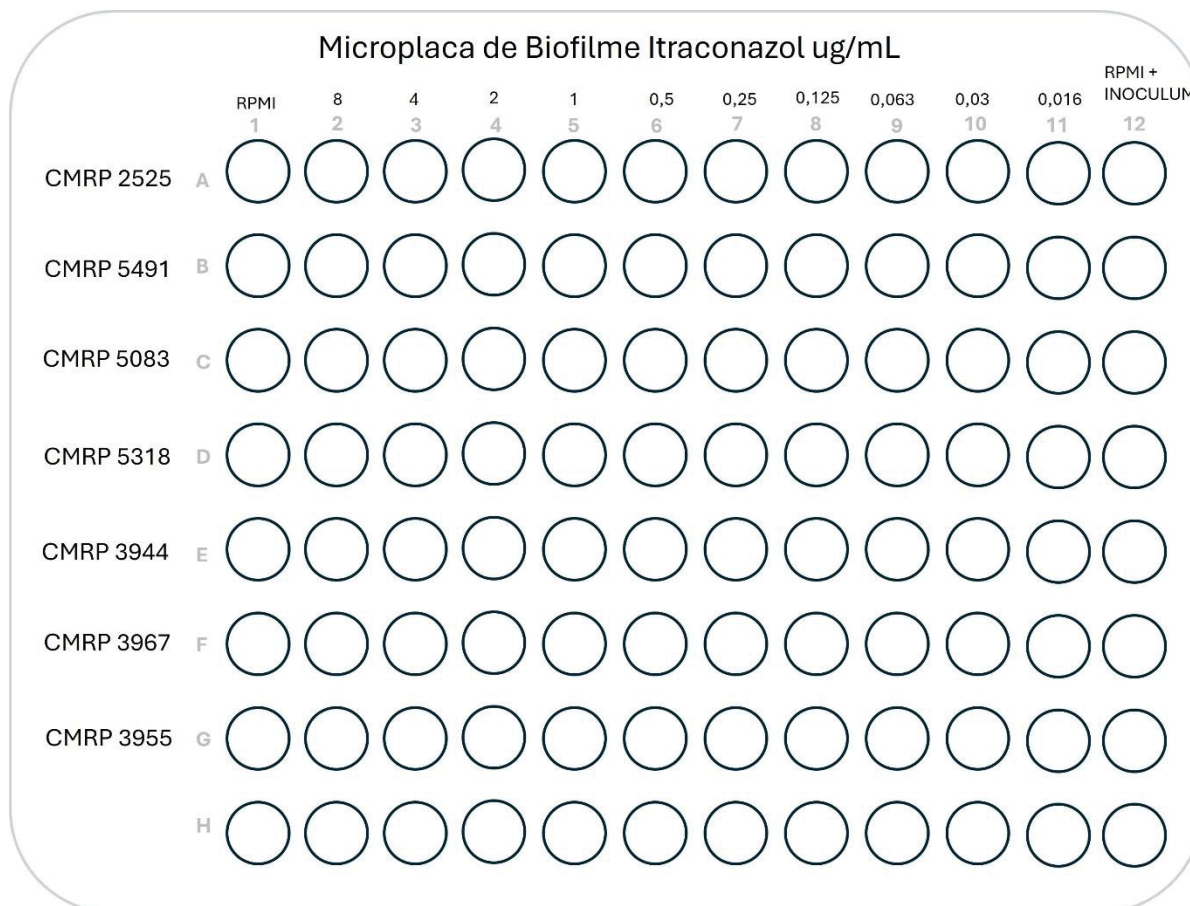
últimos poços da direita (coluna 12). A representação esquemática da configuração destas 3 microplacas está representada nas FIGURA 24, FIGURA 25 e FIGURA 26.

FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO DAS MICROPLACAS COM TERBINAFINA DO TESTE DE INIBIÇÃO DE BIOFILMES



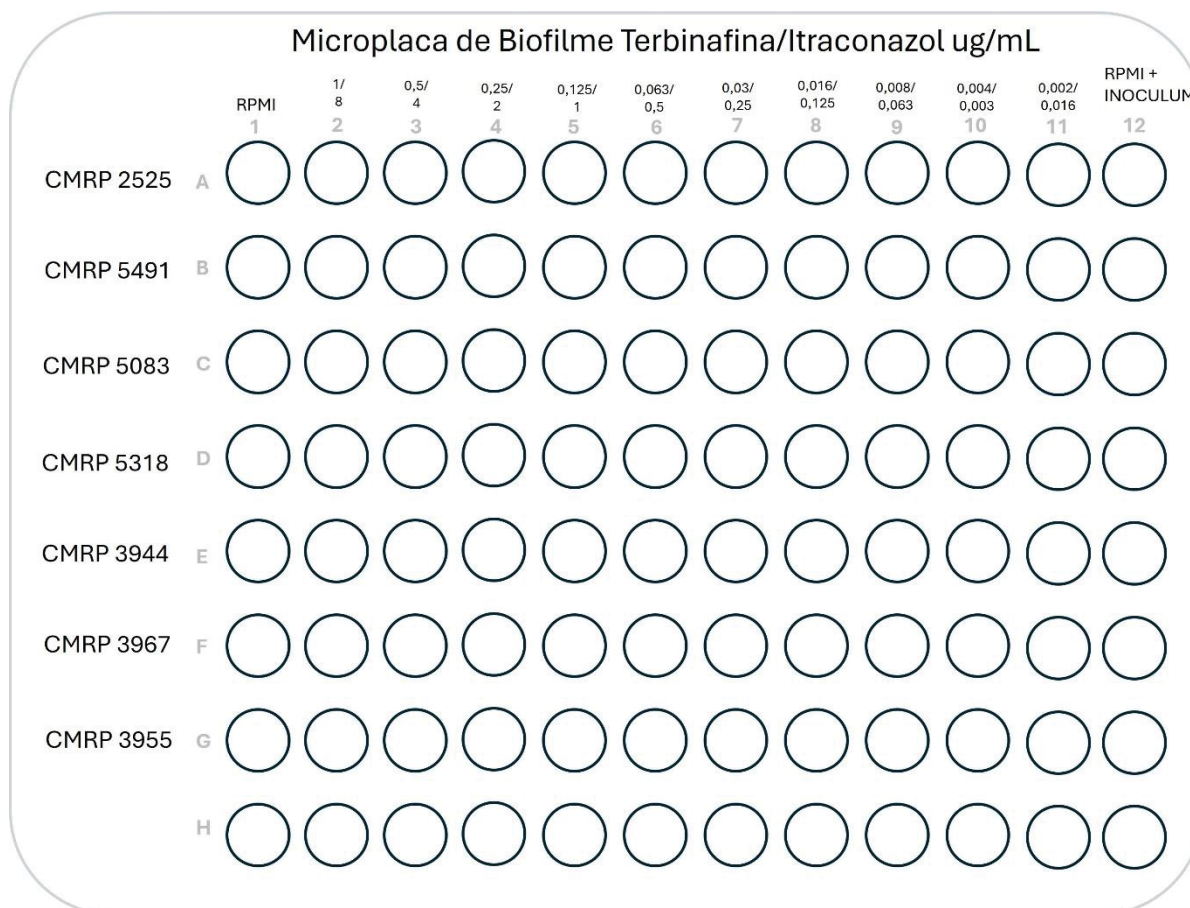
FONTE: A autora (2025).

FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO DAS MICROPLACAS COM ITRACONAZOL DO TESTE DE INIBIÇÃO DE BIOFILMES



FONTE: A autora (2025).

FIGURA 26 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFIGURAÇÃO DAS MICROPLACAS COM TERBINAFINA/ITRACONAZOL DO TESTE DE INIBIÇÃO DE BIOFILMES

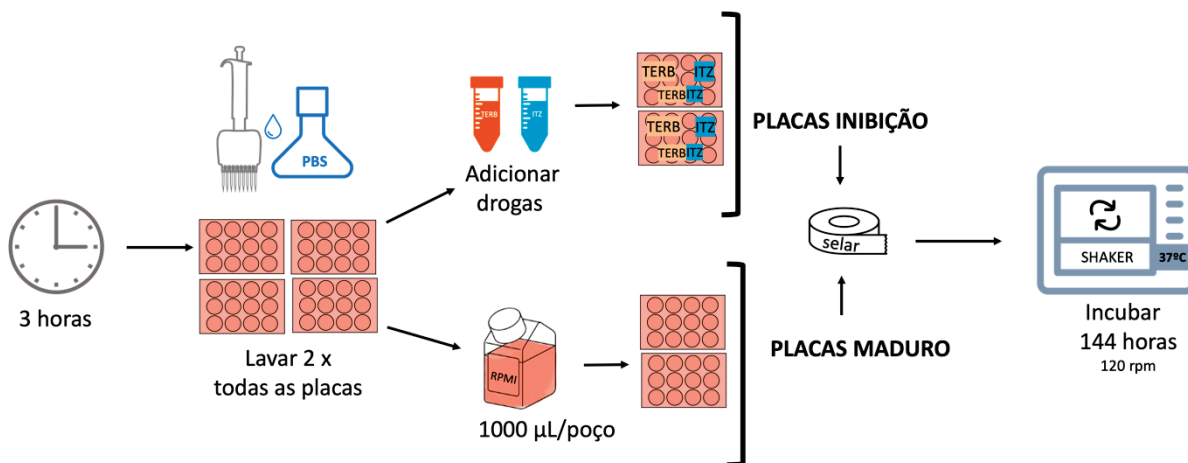


FONTE: A autora (2025).

A produção de biofilmes nas microplacas específicas para análise em MCVL e MEV (24 poços) foram preparadas da mesma maneira que as microplacas de 96 poços destinadas à quantificação de biomassa. Para os testes de inibição de biofilmes a serem realizados através de MCVL e MEV, após um período de 3 horas na incubadora tipo *shaker*, as referidas microplacas foram lavadas 2 vezes com PBS. Em 2 das microplacas foram adicionados os antifúngicos e foram nomeadas “placas inibição 2”.

Às duas microplacas de 24 poços restantes, foi adicionado 1000 µL de RPMI após a dupla lavagem com PBS e foram denominadas “placas maduro 2”. As 4 microplacas foram seladas e levadas a incubadora tipo *shaker* sob mesmas condições de temperatura e rotações. (FIGURA 27).

FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS DE 24 POÇOS PARA TESTE DE INIBIÇÃO DOS BIOFILMES



FONTE: A autora (2025).

A distribuição das concentrações de antifúngicos nas microplacas de “inibição 2” foi baseada nos resultados da quantificação da biomassa e está representada na FIGURA 28.

FIGURA 28 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS NAS MICROPLACAS “INIBIÇÃO 2” PARA MCVL E MEV



FONTE: A autora (2025).

4.7.3 Ensaios de erradicação de biofilmes

Após o período de 144 horas de incubação, as placas as “placas maduro 1” e “placas maduro 2” receberam o tratamento antifúngico após dupla lavagem e todas as microplacas foram incubadas a 37° C a 120 rpm por mais 24 horas.

A distribuição das concentrações de antifúngicos nas microplacas de “maduro 2” foi baseada nos resultados da quantificação da biomassa e difere das microplacas inibição 2”. (FIGURA 29).

FIGURA 29 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS NAS MICROPLACAS “MADURO 2” PARA MCVL E MEV



FONTE: A autora (2025).

4.7.4 Análise da atividade antibiofilme

A análise da atividade antibiofilme foi obtida através a análise quantitativa pela determinação da biomassa e a análise das alterações morfológicas e estruturais dos biofilmes foram realizadas através da MCVL e MEV.

4.7.5 Determinação da biomassa total

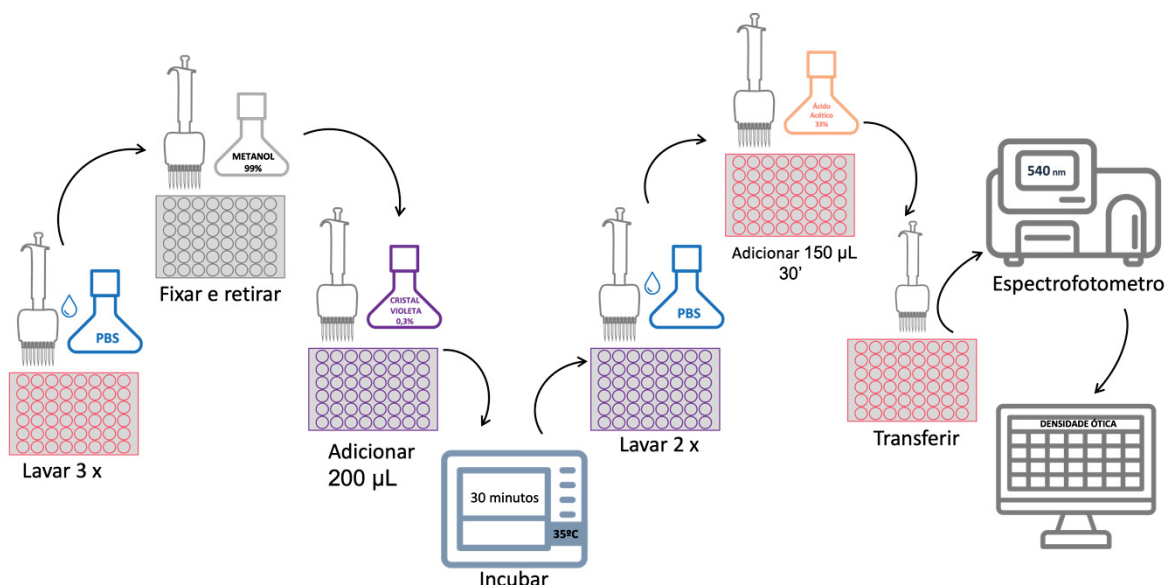
A determinação da biomassa utilizou o método de coloração com cristal violeta das microplacas “inibição 1” e “maduro 1” baseada na retenção da biomassa fúngica pelo corante que pode ser medida por espectrofotometria.

No experimento de coloração com cristal violeta, depois de 24 horas de incubação após tratamento com os antifúngicos, todos os poços das placas “inibição 1” e “maduro 1” foram lavados 3 vezes com PBS para remover as células não aderentes. Em seguida, as estruturas fúngicas foram fixadas com metanol 99%. O metanol foi aspirado e o volume de 200 μ L de solução de cristal violeta 0,3% (Merck, Darmstadt, Alemanha) filtrada foi adicionado em cada poço.

Após um período de 30 minutos de incubação a 35° C o corante foi removido dos poços e estes foram lavados novamente 2 vezes com 200 μ L de PBS.

Após a lavagem dos poços, a alíquota de 150 μ L s de ácido acético 33% foi adicionado em cada poço corado e deixado por 30 segundos. Após esse período, o conteúdo desses poços foi transferido para outra microplaca e esta foi imediatamente levada para a leitura em espectrofotômetro de microplacas modelo Multiskan SkyHigh (ThermoFisher Scientific, Oslo, Noruega) de 540 nanômetros para quantificação da absorbância pelo cristal violeta e determinação valores de variações de densidade óptica (DO) (65,94,79) (FIGURA 30).

FIGURA 30 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL:
COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA



FONTE: A autora (2025).

4.7.6 Determinação da concentração mínima inibitória de biofilmes (MBIC)

Através da análise das densidades ópticas a concentração mínima inibitória de biofilmes foi determinada como a menor concentração de antifúngico que inibe 100% da atividade do biofilme e foi calculado utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de inibição de atividade do biofilme} = \frac{(OD \text{ controle} - OD \text{ branco}) - (OD \text{ teste} - OD \text{ branco})}{(OD \text{ controle} - OD \text{ branco})} \times 100$$

4.7.7 Determinação da concentração mínima de erradicação de biofilmes (MBEC)

A determinação da menor concentração de antifúngicos capaz de reduzir 100% dos biofilmes maduros foi calculada utilizando os dados fornecidos pela espectrofotometria dos biofilmes maduros foi calculado utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de erradicação de atividade do biofilme} = \frac{(OD \text{ controle} - OD \text{ branco}) - (OD \text{ teste} - OD \text{ branco})}{(OD \text{ controle} - OD \text{ branco})} \times 100$$

4.7.8 Ensaios de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Após 168 horas de incubação o RPMI de todas as microplacas de 24 poços “inibição 2” e “maduro 2” preparadas para microscopia confocal foi aspirado. As microplacas foram gentilmente lavadas 2 vezes com PBS. A solução do Kit corantes LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen Co., Calsbad, CA, EUA) foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. O kit contém os corantes SYTO 9 e iodeto de propídio (PI). O corante SYTO 9 é um fluoróforo que penetra facilmente em microorganismos celulares vivos devido à sua capacidade de atravessar membranas celulares intactas. Uma vez dentro da célula, SYTO 9 se liga ao DNA, emitindo fluorescência verde quando excitado por luz apropriada.

O mecanismo de coloração seletiva ocorre porque células vivas mantêm a integridade da membrana, permitindo a entrada de SYTO 9, enquanto células mortas ou com membranas danificadas podem permitir a entrada de outros corantes, como o iodeto de propídio, o qual, uma vez dentro da célula danificada, liga-se ao DNA emitindo fluorescência vermelha (10).

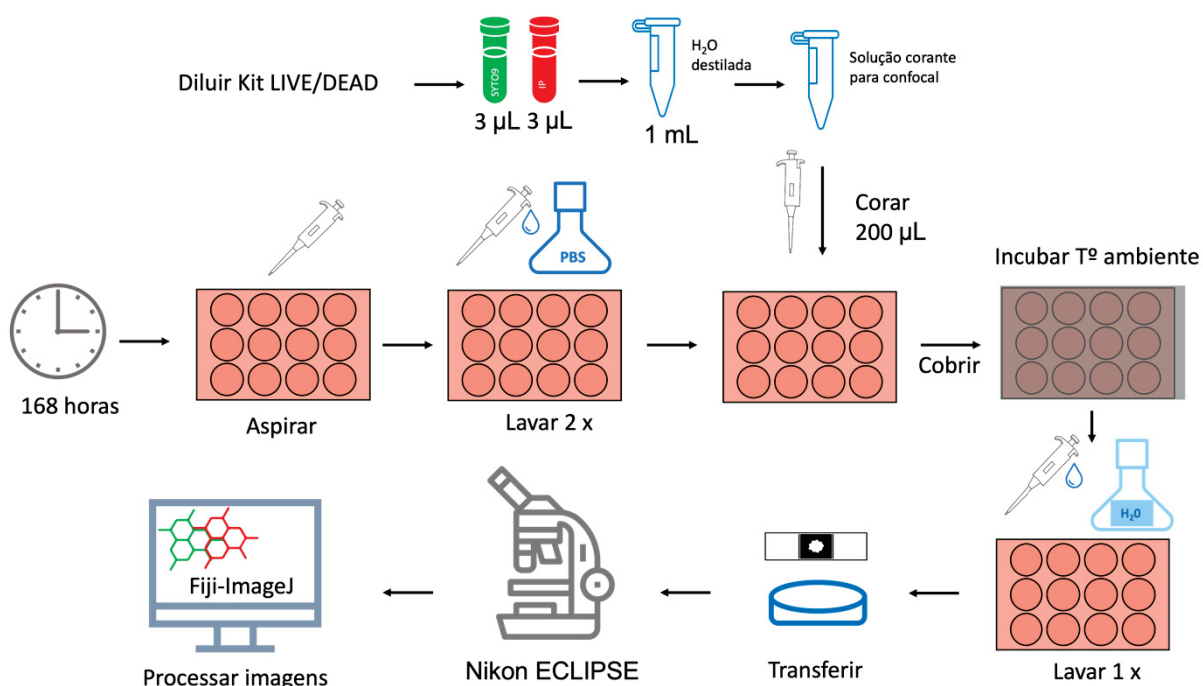
Segundo instruções do fabricante, a alíquota de 3 µL de cada corante são adicionados a 1 mL de água destilada estéril em um tubo do tipo Eppendorf de 2 mL. Depois da lavagem das microplacas “inibição 2” e “maduro 2” preparadas para microscopia confocal, foram adicionados 200 µL da solução de corantes em todos os poços. As microplacas foram protegidas da luminosidade com papel alumínio por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram delicadamente lavados com água destilada e as lamínulas redondas de cultivo celular, colocadas no fundo dos poços para a produção de biofilmes, foram transferidas para placas de microscopia confocal de poliestireno de 35 mm (SPL Life Sciences Co., Coréia do Sul) e para lâminas de vidro com a superfície dos biofilmes virados para abaixo.

As placas de microscopia confocal foram fechadas com a tampa e as lâminas de vidro foram seladas com base de unha incolor para evitar o deslocamento e o ressecamento das lamínulas. Em seguida as placas de microscopia confocal e as lâminas coradas foram levados ao Centro de Microscopia Confocal da UFPR onde foram analisadas no microscópio confocal modelo Nikon ECLIPSE Ti-E (Nikon Instruments , Kawasaki – Kanagawa, Japão).

As células vivas são detectadas a 488 nanômetros utilizando o corante SYTO 9, que cora células vivas em verde e as células danificadas são identificadas com 561

nanômetros pelo iodeto de propídio, o qual cora as referidas células em vermelho. As imagens dos biofilmes foram geradas utilizando o programa Fiji-Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). FIGURA 31).

FIGURA 31 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA DE PREPARO DAS MICROPLACAS COM BIOFILMES PARA MICROSCOPIA CONFOCAL



FONTE: A autora (2025).

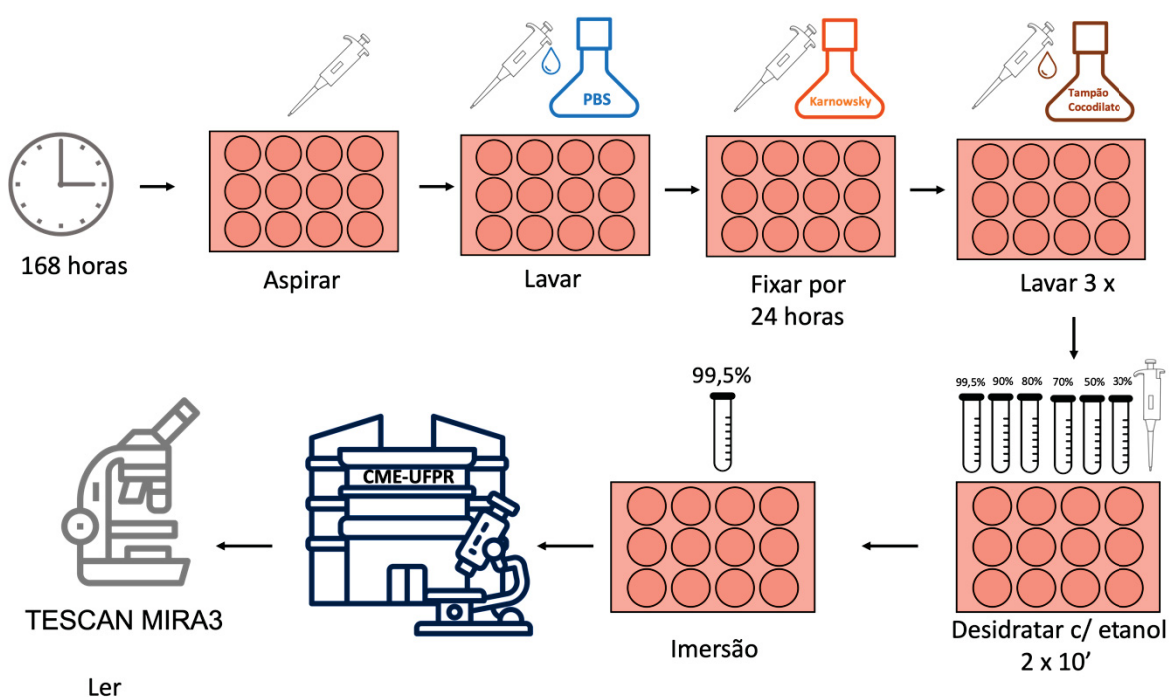
4.7.9 Ensaios de microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar as alterações morfológicas e estruturais dos biofilmes causadas pelos antifúngicos foi realizada a microscopia eletrônica de varredura. Após o período de incubação de 168 horas, na presença ou ausência de antifúngicos, o sobrenadante de todos os poços foi removido, as microplacas de 24 poços inibição 2” e “maduro 2” preparadas para microscopia eletrônica de varredura foram gentilmente lavadas 2 vezes com PBS. Após a lavagem, os biofilmes foram fixados sobre as lamínulas de poliestireno com a adição de 1 mL de solução de Karnovsky por 24 horas. Depois desse período, a solução foi aspirada, os poços foram lavados 3 vezes com solução tampão cocodilato (Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, SP, Brasil, 0.05

M, pH 7.4). Cinco minutos depois, as lamínulas de poliestireno foram desidratadas 2 vezes por 10 minutos cada, com concentrações progressivas de etanol (30%, 50%, 70%, 8%, 90% e 99,5%).

Finalmente, as microplacas foram levadas imersas em etanol 99,5% para o Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Lá as amostras foram submetidas a ponto crítico de secagem e lâminas foram montadas usando fita condutora seguida pelo revestimento com pulverização catódica de ouro e as imagens foram obtidas utilizando o microscópio de scanner eletrônico da marca TESCAN MIRA3 (Tescan Orsay Holding, Brno, República Tcheca). (69,95) (FIGURA 32).

FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DAS MICROPLACAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA



FONTE: A autora (2025).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Gráficos mostrando variações de densidade óptica em relação às doses dos antifúngicos isolados ou em combinação foram criadas no programa GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A análise estatística foi executada

está usando o SPSS 20 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA) com medidas descritivas como média, desvio padrão mínimo e máximo e calculada em cada nível de concentração.

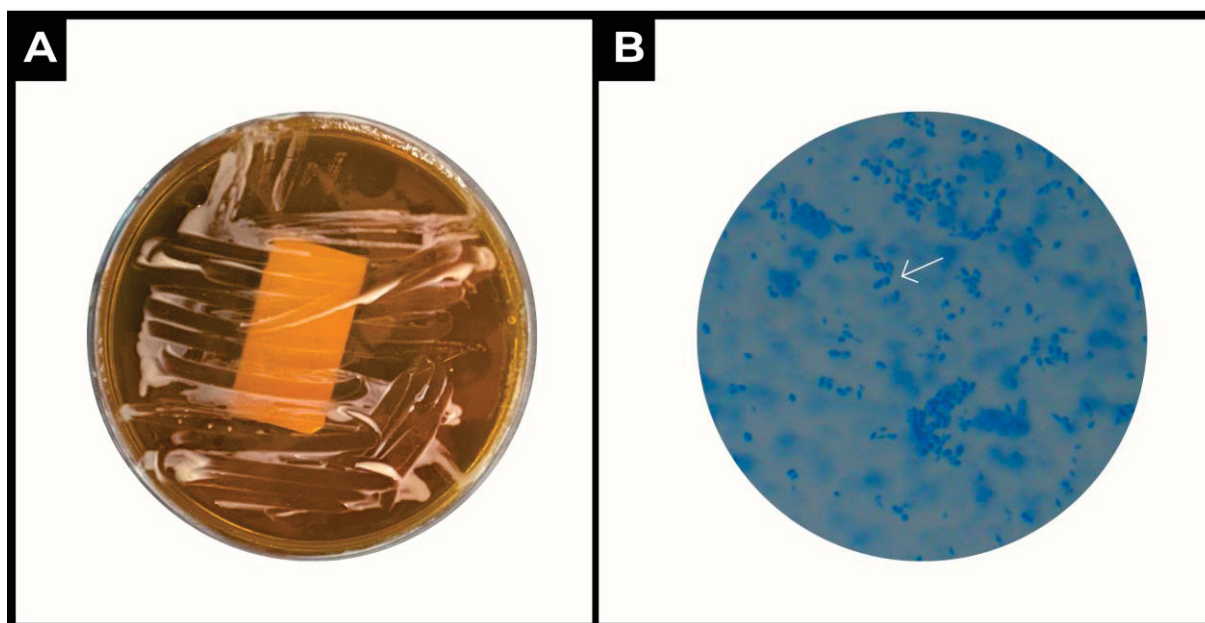
Gráficos em linha foram criados para visualizar o comportamento das variáveis entre as concentrações. Para observar o impacto das concentrações na densidade óptica o método linear misto generalizado foi aplicado observando os efeitos fixos no caso a concentração e efeitos padrão como a variação entre as amostras. A significância desses efeitos foi avaliada com $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 CULTURAS LEVEDURIFORMES OBTIDAS

Após 2 subculturas incubadas em BHI a 37°C por 5 dias foram obtidas culturas brancas e cremosas. Para confirmar que as culturas eram compostas de formas leveduriformes, a observação de lâminas coradas com lactofenol de Amann com azul de algodão em microscópio óptico L2000 com câmera Digiswift (Labor Health Supply, Osasco, SP, Brasil) revelou a presença de as células em forma de charuto com brotamentos sem a presença de hifas. (FIGURA 33)

FIGURA 33 - CULTURA LEVEDURIFORME DE *Sporothrix brasiliensis* E LÂMINA CORADA COM LACTOFENOL DE AMANN COM AZUL DE ALGODÃO



LEGENDA: Aspecto de 2ª subcultura da linhagem *Sporothrix brasiliensis* CMRP2525 e foto de microscópio de esfregaço da mesma cultura corada com lactofenol de Amann com azul de algodão. A) Aspecto cremoso de cor branca da cultura; B) Células em forma de charuto (seta branca) coradas em azul e ausência de hifas. (Aumento 40X)

FONTE: A autora (2024).

5.2 CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS PARA FORMAS LEVEDURIFORMES PLANCTÔNICAS DE *Sporothrix brasiliensis*

A terbinafina demonstrou atividade antifúngica superior *in vitro* contra todas as linhagens, apresentando CIM de 0,125 µg/mL, dezesseis vezes menor comparada ao itraconazol que apresentou CIM 2 µg/mL. Os valores do controle positivo são os esperados descritos no documento M23-A do CLSI. (Tabela 3).

TABELA 3 - SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA de *Sporothrix brasiliensis* NAS FORMAS LEVEDURIFORMES PLANCTÔNICAS

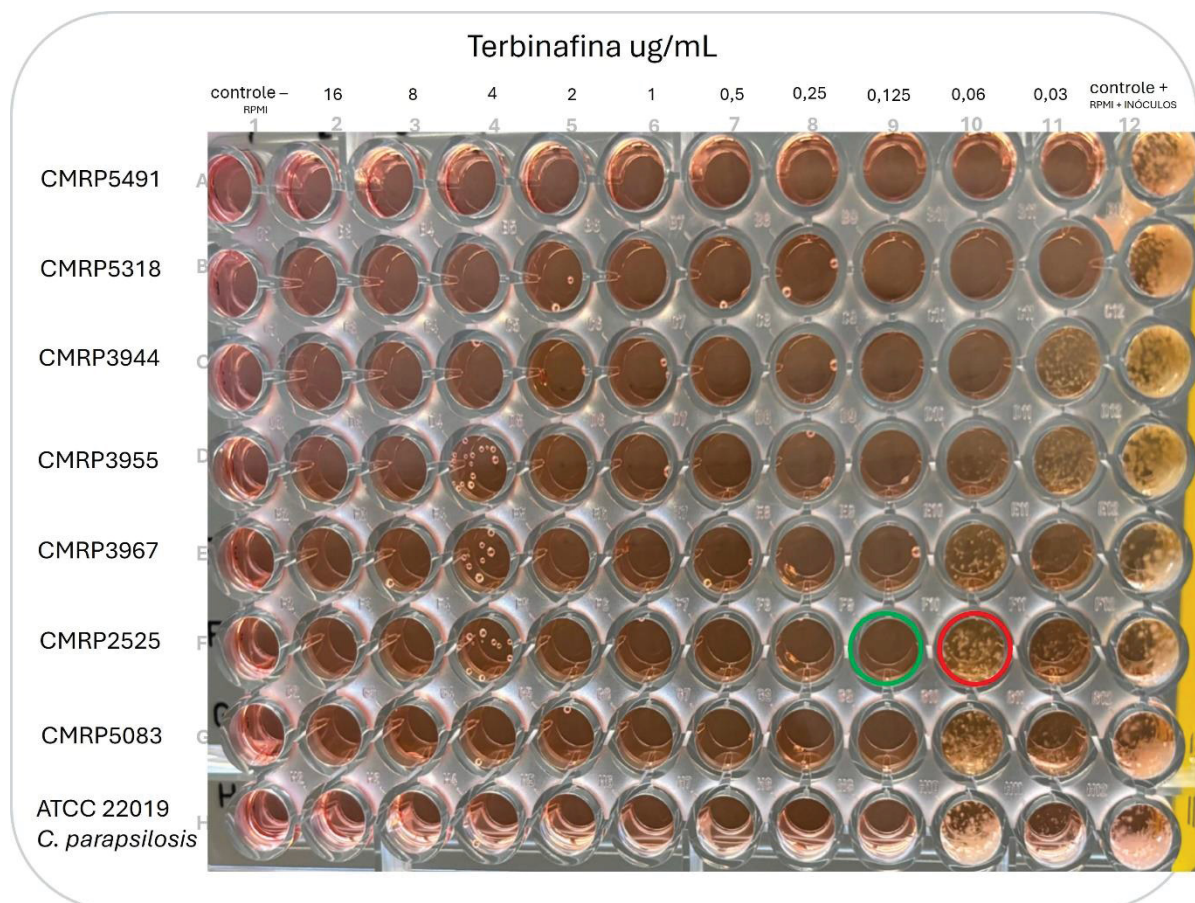
LINHAGENS	TERB (µg/mL)	ITZ (µg/mL)
<i>S. brasiliensis</i> CMRP5491	0,125	1
<i>S. brasiliensis</i> CMRP5318	0,125	1
<i>S. brasiliensis</i> CMRP3944	0,125	1
<i>S. brasiliensis</i> CMRP3955	0,125	2
<i>S. brasiliensis</i> CMRP3967	0,125	2
<i>S. brasiliensis</i> CMRP2525	0,125	1
<i>S. brasiliensis</i> CMRP5083	0,125	1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 (controle)	0,125	1
CMI50	0,125	1
CMI90	0,125	2

LEGENDA: CMRP - Coleção de Microrganismos da Rede Paranaense; CIM – Concentração Inibitória Mínima; TERB - Terbinafina; ITZ - Itraconazol.

FONTE: A autora (2025).

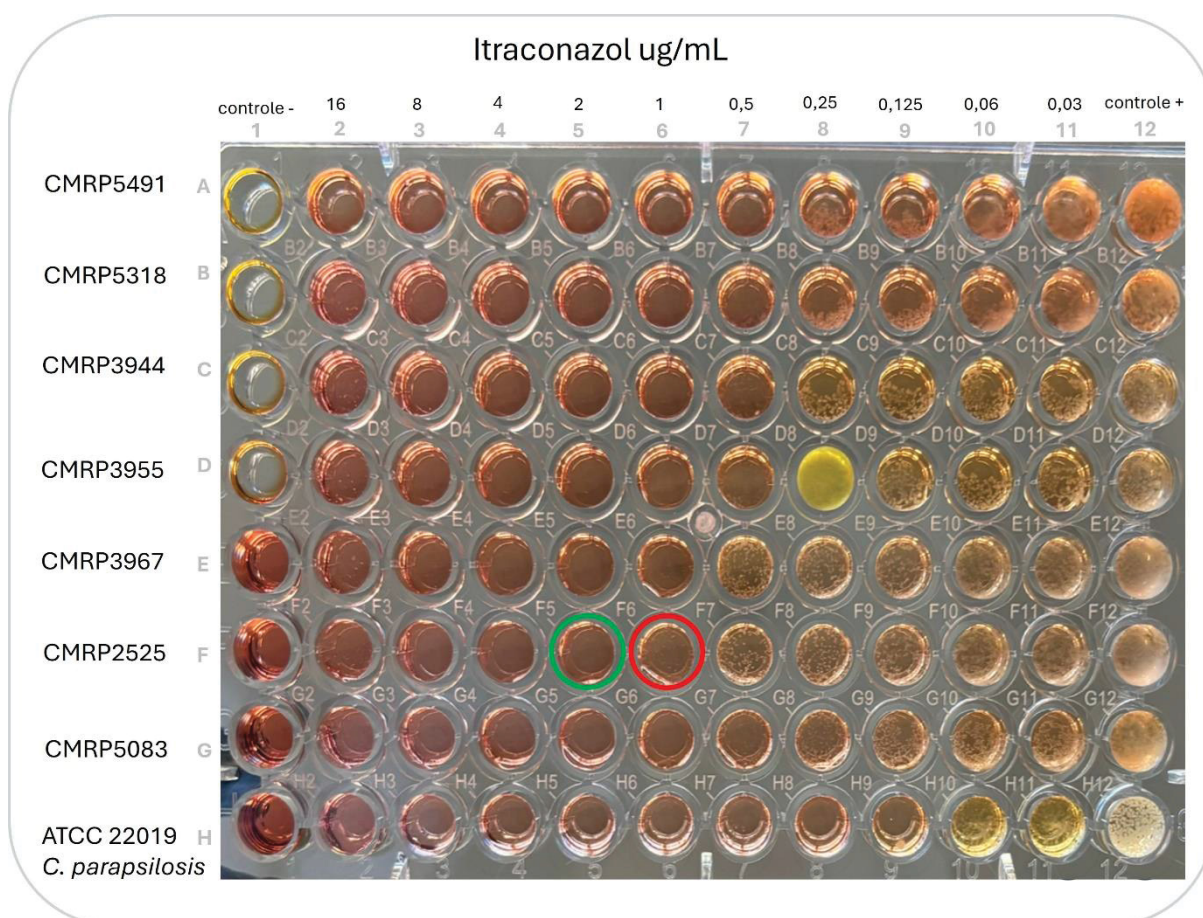
Na leitura visual do teste de susceptibilidade *in vitro* foi possível observar a diferença de coloração e elementos entre poços sem crescimento fúngico até limites de concentração em direção às colunas à direita (concentrações menores), onde elementos fúngicos esbranquiçados foram observados (FIGURA 34 e FIGURA 35).

FIGURA 34 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA COM IMAGEM DE LEITURA VISUAL DE TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE TERBINAFINA CONTRA LINHAGENS DE *Sporothrix brasiliensis*



LEGENDA: A CIM mais alta foi de 0.125 ug/mL (círculo verde). Presença de estruturas fúngicas em doses mais baixas, como 0,06 ug/mL (círculo vermelho).
FONTE: A autora (2025).

FIGURA 35 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA COM IMAGEM DE LEITURA VISUAL DE TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE ITRACONAZOL CONTRA LINHAGENS DE *Sporothrix brasiliensis*

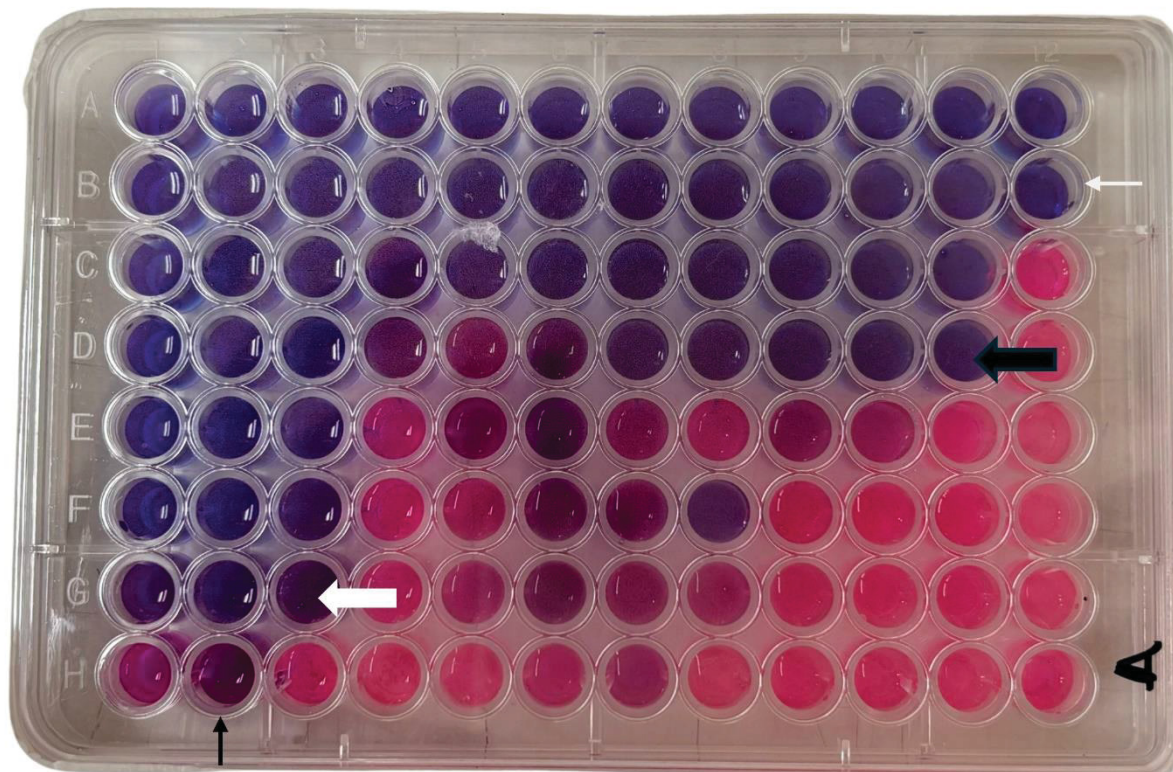


LEGENDA: A CIM mais alta foi de 2 ug/mL (círculo verde). Presença de estruturas fúngicas em doses mais baixas, como 1 ug/mL (círculo vermelho).
FONTE: A autora (2025).

5.3 INTERAÇÕES ENTRE OS ANTIFÚNGICOS PARA FORMAS LEVEDURIFORMES PLANCTÔNICAS

A leitura do teste de susceptibilidade *in vitro* das microplacas contendo a combinação TERB e ITZ demonstrou a variação da coloração azul para rosa, pela transformação de resazurina em resorufina por oxiredutases presentes em células fúngicas viáveis. Quando associada ao ITZ a TERB apresentou sinergismo na concentração de 0,063 ug/mL e 250 ug/mL, para o ITZ (Índice FICI = 0,38), demonstrado na FIGURA 36.

FIGURA 36 - FOTOGRAFIA DA PLACA DE MICRODILUIÇÃO EM CHECKERBOARD PARA A LINHAGEM *S. brasiliensis* CMRP 2525

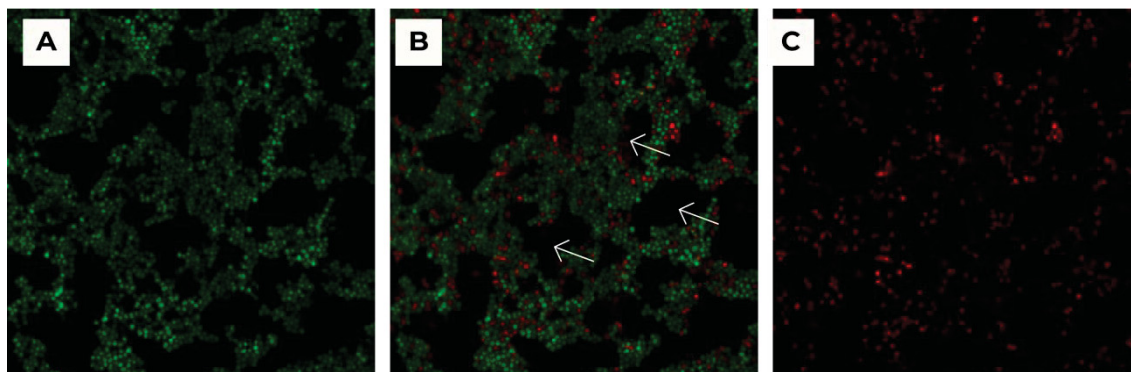


LEGENDA: Seta branca estreita: CIM da TERB isolada (250 ug/mL); seta preta estreita: CIM de ITZ isolado (2 ug/mL); seta branca larga: CIM de ITZ em combinação com TERB (250 ug/mL). Seta preta larga: CIM da TRB (0,063 ug/mL) em combinação com ITZ.
 FONTE: A autora (2025).

5.4 CAPACIDADE DO *Sporothrix brasiliensis* EM FORMAR BIOFILMES

A capacidade do *Sporothrix brasiliensis* em formar biofilmes foi avaliada pela MCVL E MEV. A MCVL revelou a formação de biofilmes densos e compactos compostos principalmente por células arredondadas coradas principalmente em verde pelos SYTO9 e uma pequena proporção de células inviáveis em vermelho coradas pelo brometo de propídio, em permeio as células vivas e espaços livres entre essas células que correspondem aos canais de água dos biofilmes. (FIGURA 37)

FIGURA 37 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLSM) DE BIOFILME MADURO DA LINHAGEM *Sporothrix brasiliensis* CMRP 5491 SEM TRATAMENTO ANTIFÚNGICO

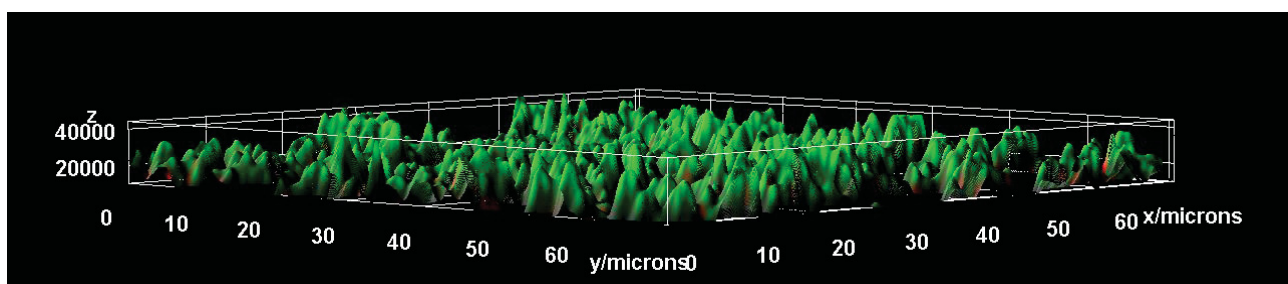


LEGENDA: A) Biofilme denso e compacto, composto por células arredondadas viáveis organizadas arquitetonicamente (verde); B) O mesmo biofilme mostrando uma pequena proporção de células não viáveis (vermelho) com espaços livres de células evidentes (seta branca); C) Células arredondadas não viáveis esparsas (vermelho). Ampliação: 400x.

FONTE: A autora (2025).

As imagens com reconstrução tridimensional (3D) de MCVL evidenciaram biofilmes controle de espessura de 4000 μm , com estrutura robusta e compacta, com predominância de células vivas (verdes) (FIGURA 38).

FIGURA 38 - IMAGEM 3D DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLSM) DE BIOFILME SEM TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO

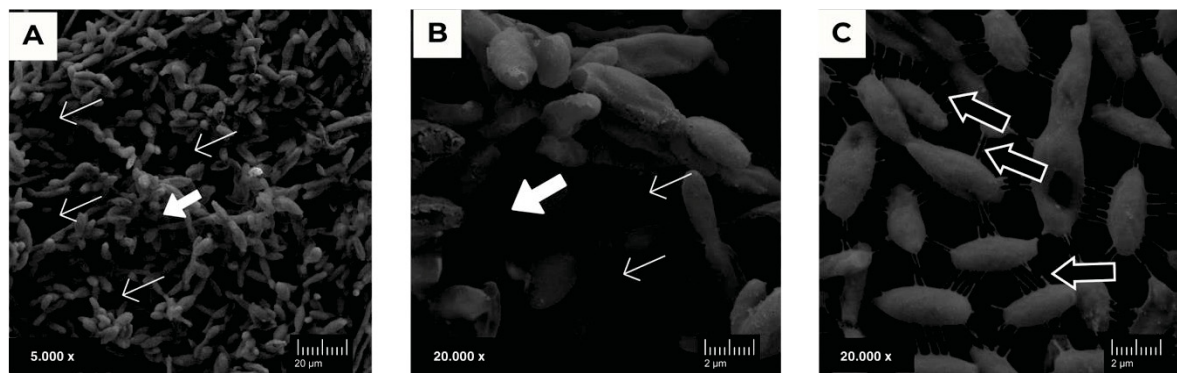


LEGENDA: Biofilme maduro da linhagem *Sporothrix brasiliensis* CMRP5491

FONTE: A autora (2025).

As imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV), evidenciaram biofilmes compostos de células em forma de charuto, algumas em brotamento, interconectadas por uma matriz extracelular bem formada e com a presença de canais de água. Em maiores aumentos (20.000 X) foi possível observar prolongamentos intercelulares (FIGURA 39).

FIGURA 39 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE BIOFILME DE *S. brasiliensis* NA FORMA LEVEDURIFORME SEM TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICO



LEGENDA: MEV de biofilme leveduriforme maduro da linhagem *S. brasiliensis* CMRP5491 A: Biofilme formado por células em forma de charuto interconectadas, com matriz extracelular (setas brancas largas) e canais de água (setas brancas estreitas). B e C: Ampliação de 20.000x do painel A. B: mostrando as células em forma de charuto agrupadas, com matriz extracelular (setas brancas largas) e canais de água (setas brancas estreitas). C: Células leveduriformes de *S. brasiliensis* em forma de charuto, algumas conectadas entre si, com extensões intercelulares (setas pretas). FONTE: A autora (2024).

5.5 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA TERBINAFINA, DO ITRACONAZOL E DA COMBINAÇÃO DOS ANTIFÚNGICOS

A avaliação da atividade antibiofilme de TERB e ITZ foi determinada pelo cálculo da concentração mínima inibitória da formação de biofilmes (MBIC), da concentração mínima de erradicação dos biofilmes (MBEC), pela MCVL e pela MEV. Os resultados de MBIC e MBEC de todas as linhagens estudadas estão listados na Tabela 4.

TABELA 4 - RESULTADOS DE MBIC E MBEC PARA DIFERENTES ISOLADOS DE *Sporothrix brasiliensis* TRATADOS COM TERBINAFINA, ITRACONAZOL E A COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS (TERB/ITZ)

LINHAGENS	MBIC/MBEC	ITZ ($\mu\text{g/mL}$)	TERB ($\mu\text{g/mL}$)	TERB/ITZ ($\mu\text{g/mL}$)
CMRP 2525	MBIC	0,03	0,004	0,002/0,017
	MBEC	0,03	0,004	0,002/0,017
CMRP 5491	MBIC	0,063	0,002	0,002/0,018
	MBEC	0,03	0,002	0,125/1
CMRP 5083	MBIC	0,016	0,004	0,002/0,017
	MBEC	0,016	0,002	0,016/0,125
CMRP 5318	MBIC	0,016	0,002	1/8
	MBEC	0,016	0,016	>1/8
CMRP 3944	MBIC	0,03	0,002	0,125/1
	MBEC	0,016	0,008	0,063/0,5
CMRP 3967	MBIC	0,03	0,004	0,25/2
	MBEC	0,016	0,008	0,002/0,016
CMRP 3955	MBIC	0,063	0,002	0,002/0,017
	MBEC	0,016	0,063	0,002/0,016

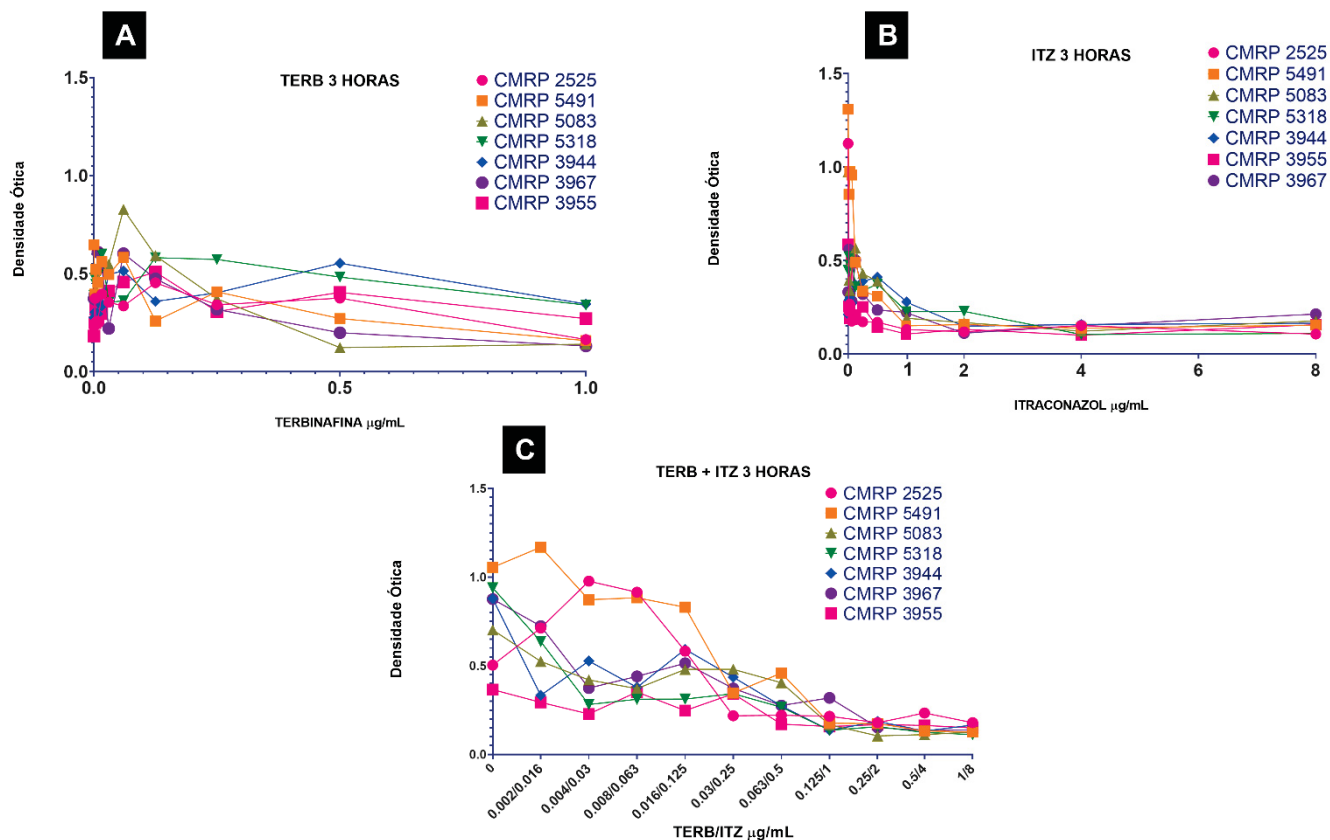
FONTE: A autora (2025).

5.6 COMPORTAMENTO DOS BIOFILMES EM FASE DE ADESÃO APÓS A ADIÇÃO DE ANTIFÚNGICOS

5.6.1 Determinação da concentração mínima inibitória de biofilmes (MBIC)

A inibição da formação de biofilmes foi avaliada através da variação da densidade óptica medida pela espectrofotometria das microplacas “inibição 1” para determinação da MBIC. Gráficos foram elaborados para analisar as densidades ópticas de todas as linhagens em relação a concentrações crescentes de terbinafina itraconazol e a combinação das 2 drogas após 3 horas de incubação. Os gráficos gerados mostram uma diminuição da densidade óptica a partir de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para TERB de 1 $\mu\text{g/mL}$ para ITZ e da dose 0,063/0,5 $\mu\text{g/mL}$ para a combinação de TERB e ITRA, respectivamente (FIGURA 40).

FIGURA 40 - GRÁFICOS DEMONSTRANDO A VARIAÇÃO NA DENSIDADE ÓTICA EM RELAÇÃO À CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DOS BIOFILMES DE *S. brasiliensis*, APÓS A ADIÇÃO DE ANTIFÚNGICOS

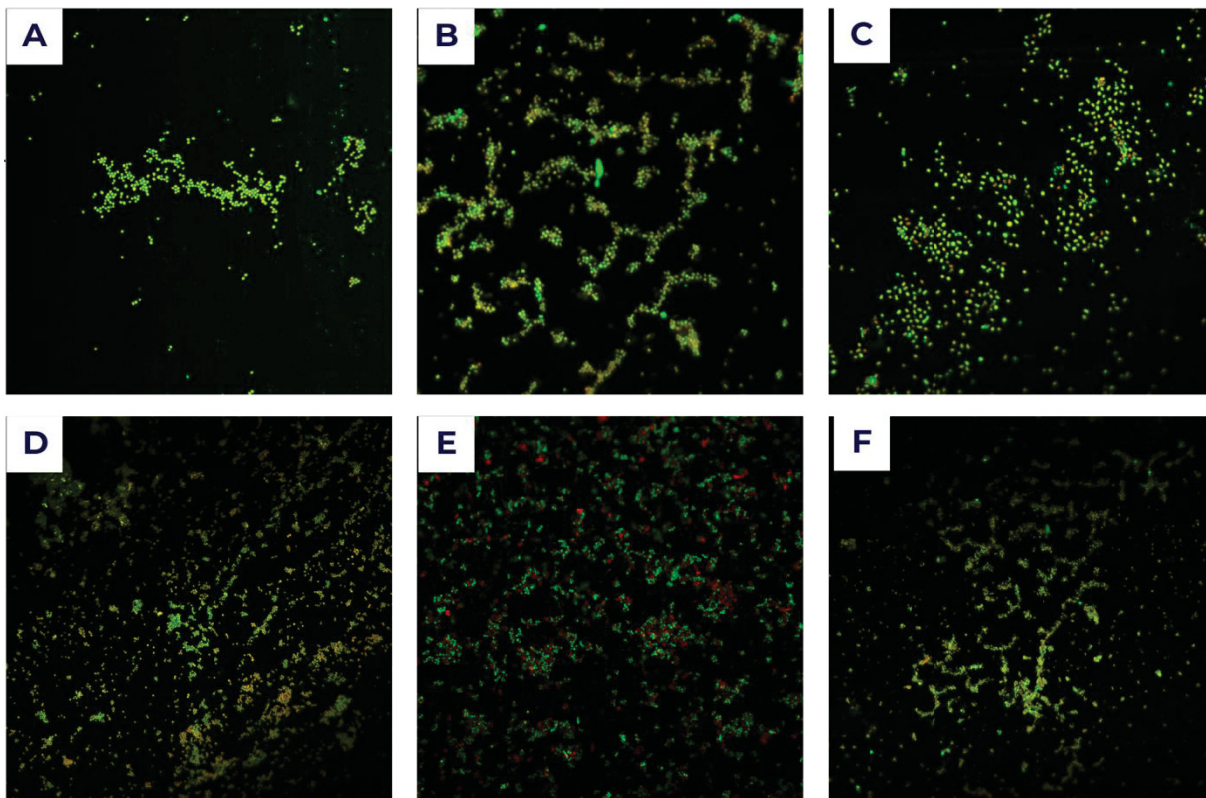


LEGENDA: (A) TERB, (B) ITZ e (C) TERB/ITZ após o período de adesão (3 horas).
 FONTE: A autora (2025).

5.6.2 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

A microscopia confocal de biofilmes tratados com 0,5 µg/mL de TERB, 1 µg/mL de ITZ e a combinação TERB/ITZ a 0,125/1 µg/mL, após 3 horas de incubação, mostrou um número reduzido de células arredondadas, sem organização arquitetural definida, predominantemente coradas em verde (vivas), misturadas com algumas células coradas em vermelho (mortas). (FIGURA 41).

FIGURA 41 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLSM) ILUSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO ANTIFÚNGICO PRECOCE (3 HORAS DE INCUBAÇÃO) NOS BIOFILMES DE *S. brasiliensis* NA FORMA LEVEDURIFORME

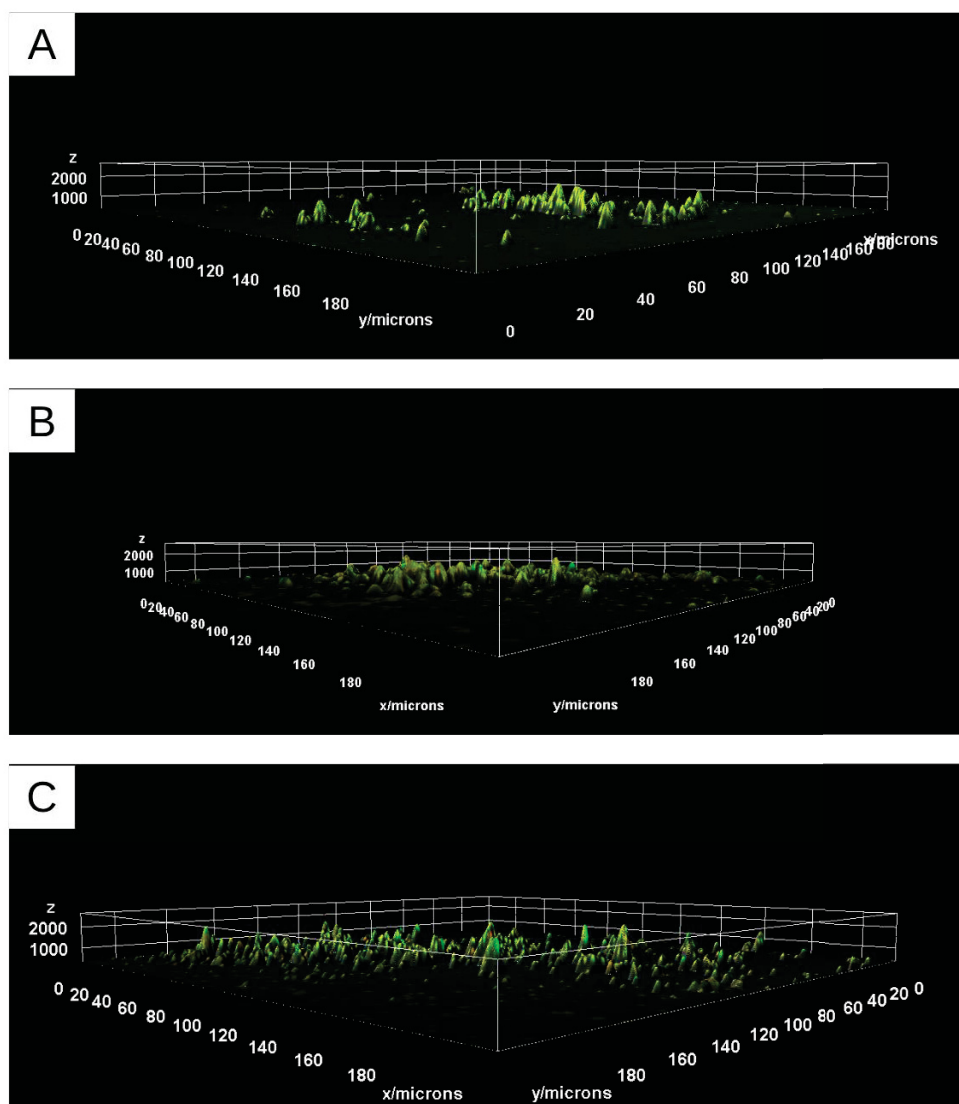


LEGENDA: A-C: *Sporothrix brasiliensis* CMRP5491, D-F: *Sporothrix brasiliensis* CMRP 2525. (A e D) TERB (0,5 µg/mL), (B e E) ITZ (1 µg/mL), (C e F) combinação de TERB/ITZ (0,125/1 µg/mL). Todos os painéis mostram redução na densidade celular, com células arredondadas e sem organização arquitetural definida, predominantemente vivas (verde), com poucas células mortas (vermelho). Ampliação de 200x.

FONTE: A autora (2025).

As reconstruções das imagens tridimensionais de MCVL demonstraram, além da presença de menor quantidade de estruturas coradas, menor espessura dos biofilmes (próximo a 1000 µm) comparados à espessura do biofilme controle (4000 µm). (FIGURA 42)

FIGURA 42 - IMAGEM 3D DE BIOFILME DA LINHAGEM *S. brasiliensis* CMRP5491 APÓS TRATAMENTO PRECOCE (3 HORAS) COM ANTIFÚNGICOS



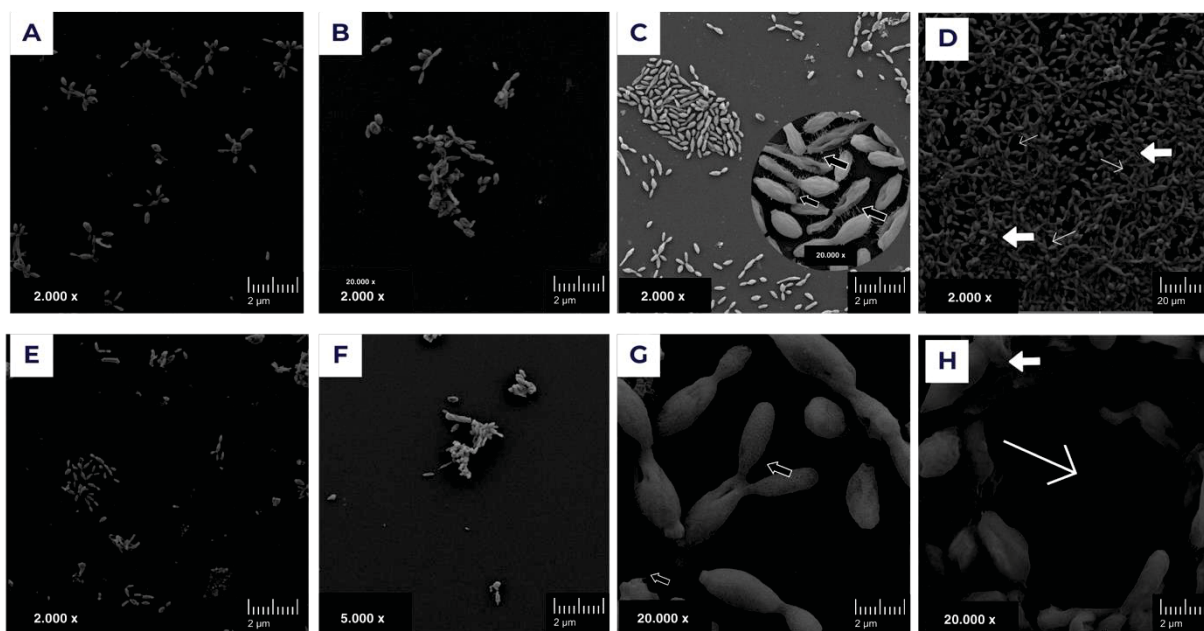
LEGENDA: A) Com TERB 0,5 µg/mL (corresponde à FIGURA 39A), B) Com ITZ 1 µg/mL (corresponde à Figura 39B), C) Com a combinação TERB 0,125µg/mL / ITZ1 µg/mL (corresponde à FIGURA 39C).
 FONTE: A autora (2025).

5.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica das microplacas “inibição 1” tratadas com concentrações mais altas de antifúngicos mostram pequenos acúmulos de células em forma de charuto. Em maior aumento (20.000 X) foi possível notar a alterações morfológicas das células e a diminuição das fibrilas intercelulares. Por outro lado, a MEV de biofilmes tratados com concentrações mais baixas de antifúngicos revelou

biofilmes bem formados e compactos, com matriz extracelular evidente e canais de água (FIGURA 43).

FIGURA 43 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) ILUSTRANDO O EFEITO DO TRATAMENTO ANTIFÚNGICO PRECOZE (3 HORAS DE INCUBAÇÃO) SOBRE BIOFILMES DE *Sporothrix brasiliensis* NA FORMA LEVEDURIFORME



LEGENDA: A-D: *S.brasiliensis* CMRP5491, E-H: *S.brasiliensis* CMRP 2525. (A e E) O tratamento com TERB (0,5 µg/mL) mostrou células em formato de charuto, distribuídas isoladamente ou em pequenos blocos (2.000×). (B e F) O tratamento com ITZ (1 µg/mL) apresentou alterações semelhantes às observadas em A (2.000×). (C e G) A combinação (TERB 0,125/ITZ 1 µg/mL) demonstrou um maior número de células aderidas (2.000×/20.000×); a imagem detalhada em C e a imagem G revelaram morfologia celular alterada e redução das fibrilas intercelulares (setas pretas) (20.000×). (D e H) A combinação em dose mais baixa (TERB 0,004/ITZ 0,03 µg/mL) resultou em um biofilme compacto e bem formado, com abundante matriz extracelular (setas brancas largas) e canais de água visíveis (setas brancas estreitas) (2.000×) a imagem H mostra estrutura semelhante em maior aumento (20.000 x).

FONTE: A autora (2024).

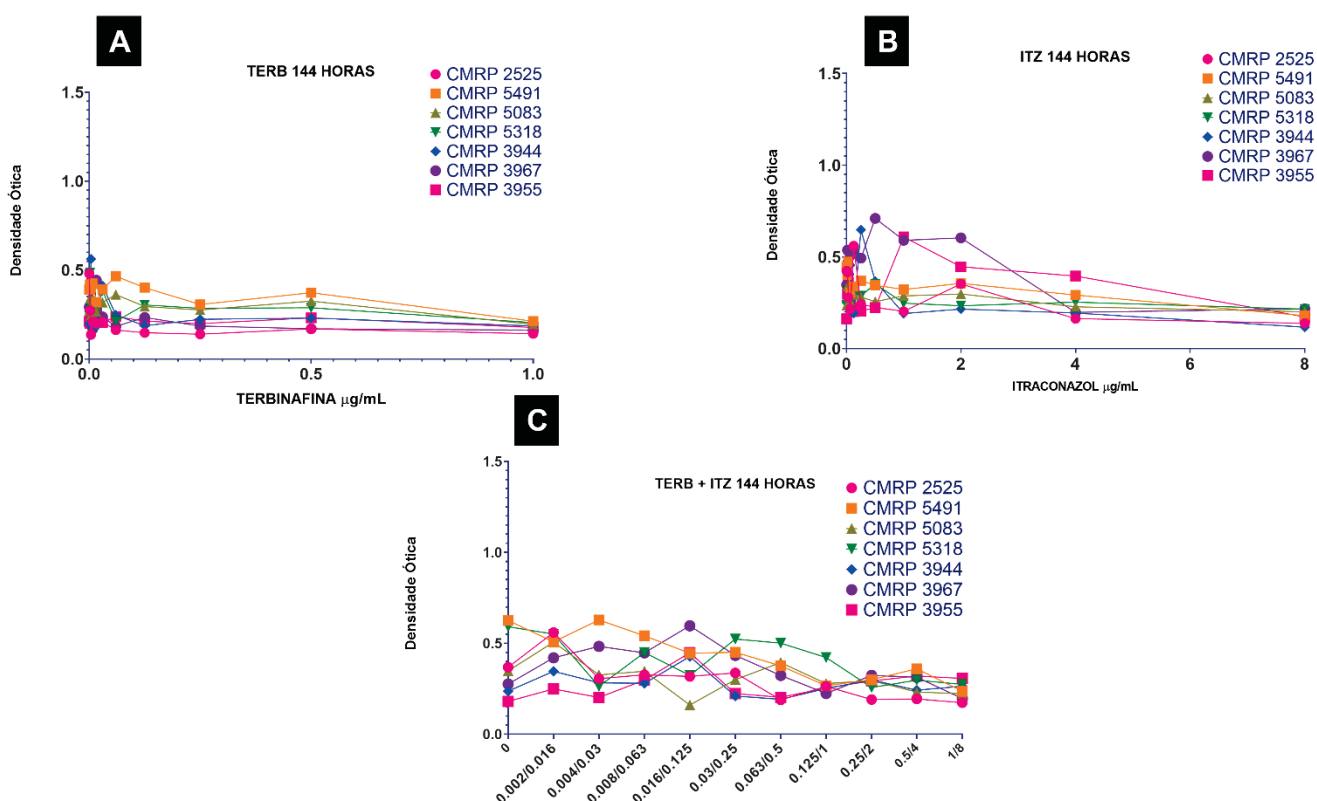
5.7 COMPORTAMENTO DOS BIOFILMES MADUROS APÓS A ADIÇÃO DE ANTIFÚNGICOS

5.7.1 Determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC)

Os gráficos obtidos a partir das variações das densidades óticas determinadas pela espectrofotometria revelaram que em placas de biofilmes maduros, com adição

dos fármacos após 144 horas de incubação, a redução das densidades ópticas se inicia a partir de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para TERB, 2 $\mu\text{g/mL}$ para ITZ e 0,125/1 $\mu\text{g/mL}$ para TERB/ITZ, observando-se uma tendência à estabilidade e homogeneidade em densidades ópticas mais baixas, mesmo com concentrações mais elevadas, para todos os isolados (FIGURA 44).

FIGURA 44 - GRÁFICOS DEMONSTRANDO A VARIAÇÃO NA DENSIDADE ÓPTICA EM RELAÇÃO À ADIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ANTIFÚNGICOS EM BIOFILMES MADUROS



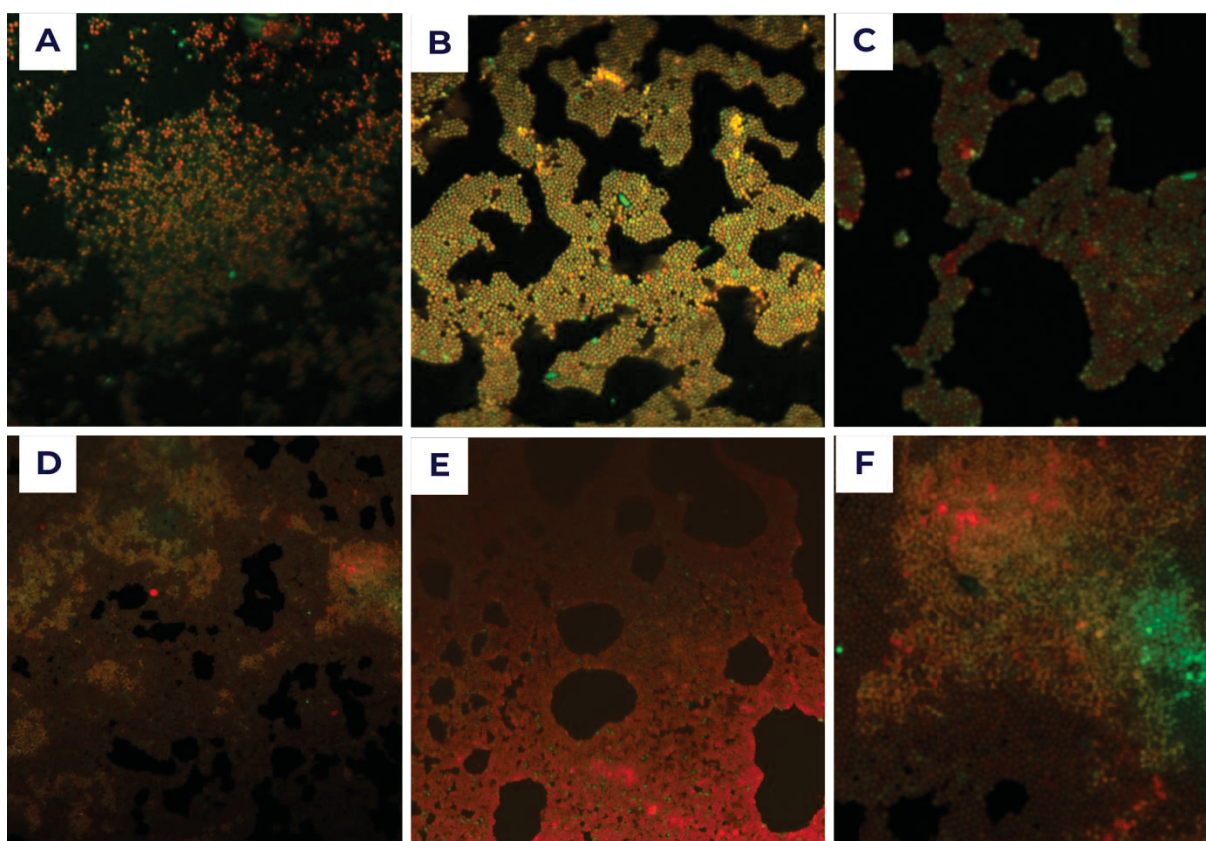
FONTE: A autora (2025).

5.7.2 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Na microscopia confocal a laser (MCVL), as lamínulas contendo biofilmes maduros apresentaram maior cobertura superficial em comparação àquelas tratadas por 3 horas. A arquitetura geral dos biofilmes foi preservada mesmo nas concentrações antifúngicas mais elevadas; especialmente nos biofilmes da linhagem *S. brasiliensis* CMRP 2525. No entanto, observou-se um aumento significativo no número de células não viáveis (coradas em vermelho). A sobreposição de células

coradas em verde e vermelho nas mesmas regiões resultou em uma aparência mais alaranjada de alguns biofilmes FIGURA 45).

FIGURA 45 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL) DE BIOFILMES MADUROS DE *Sporothrix brasiliensis* NA FORMA LEVEDURIFORME APÓS TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICOS

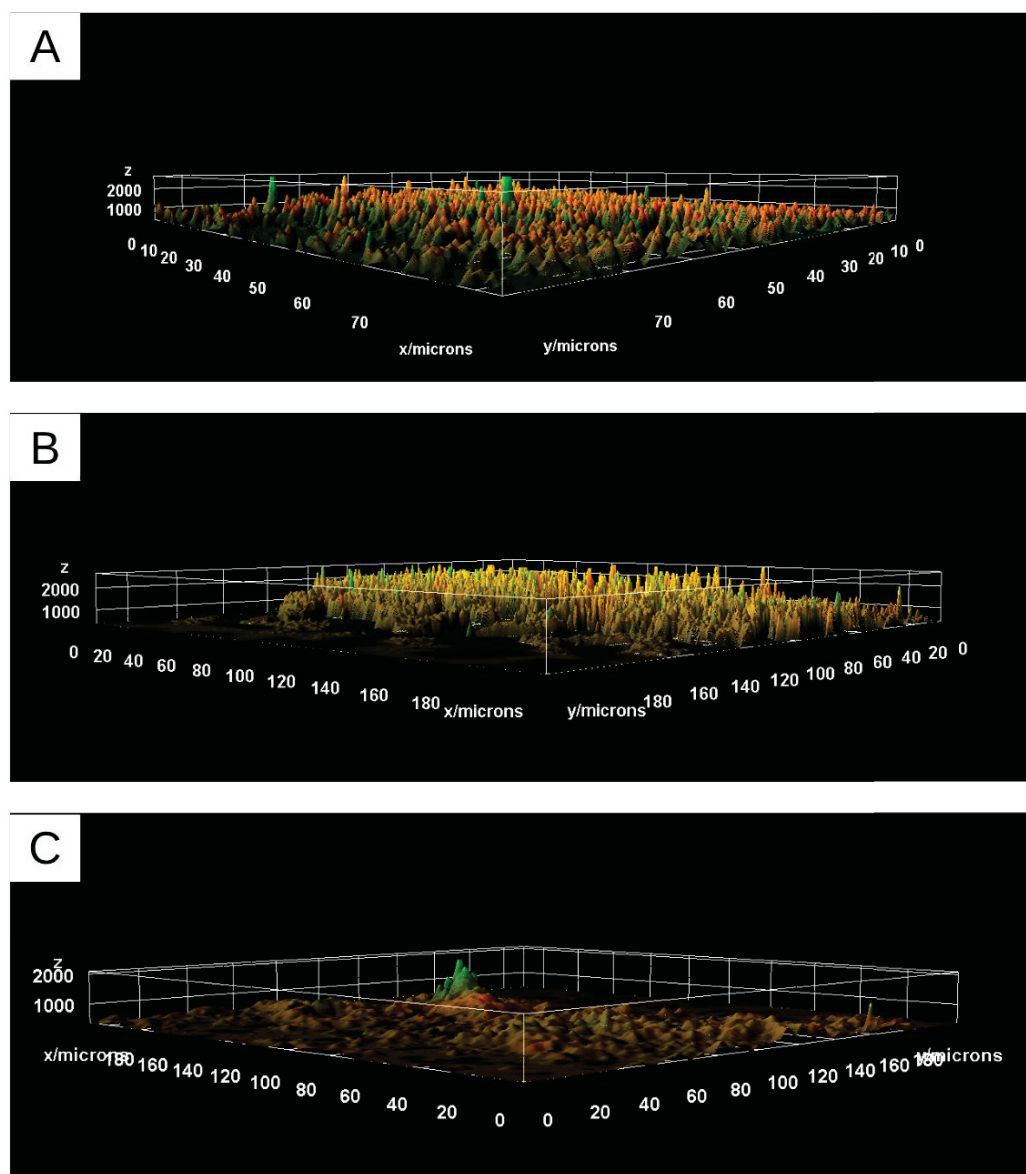


LEGENDA: A-C: Biofilmes da linhagem *S. brasiliensis* CMRP 5491, D-F Biofilmes da linhagem *S. brasiliensis* CMRP 2525. A e D) TERB a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B e E) ITZ a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C e F) Combinação de TERB 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / ITZ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todas as imagens mostram a arquitetura do biofilme preservada, células vivas (verde), células mortas (vermelho), espaços vazios entre blocos celulares, com predomínio de coloração alaranjada em A, B, D e F resultante da sobreposição da fluorescência verde (células vivas) e vermelha (células mortas), da maior presença de células mortas coradas em vermelho em E. Ampliação: 400x.

FONTE: A autora (2025).

As imagens de tridimensionais da MCVL evidenciaram que apesar da arquitetura preservada, os biofilmes maduros apresentaram espessura reduzida (abaixo de 2000 μm) após o tratamento com antifúngicos, comparada à espessura dos biofilmes maduros sem tratamento (4000 μm), além da presença de áreas maiores coradas em vermelho ou ainda a sobreposição do vermelho sobre o verde tornando a coloração de alguns biofilmes alaranjados. A FIGURA 46 mostra exemplos de imagens 3D obtidas através da MCVL.

FIGURA 46 - IMAGEM 3D DE BIOFILME MADURO DA LINHAGEM *S. brasiliensis* CMRP 5491 E CMRP 2525 APÓS TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICOS



LEGENDA: A) COM TERB 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (corresponde à FIGURA 43 A), B) Com ITZ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (corresponde à FIGURA 43B), C) Com a Combinação TERB 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / ITZ1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (corresponde à FIGURA 43F).

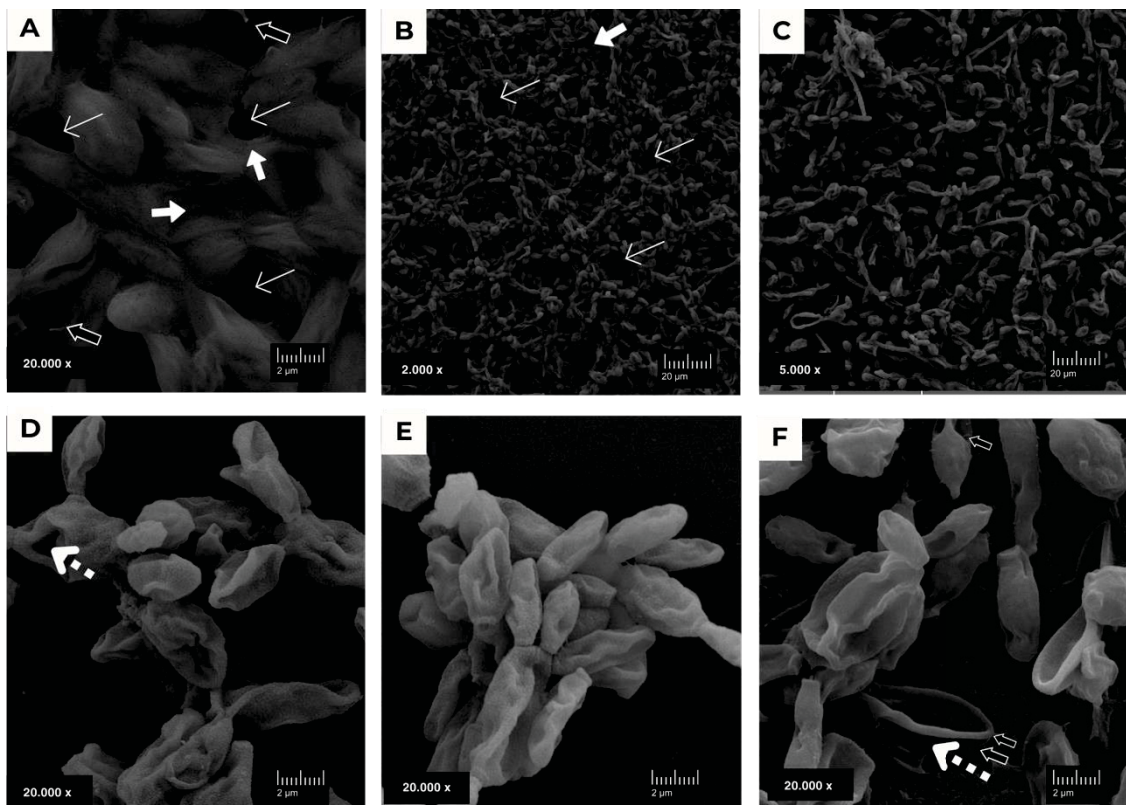
FONTE: A autora (2025).

5.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV dos biofilmes maduros revelaram uma preservação arquitetural dos biofilmes maduros mesmo com altas concentrações de antifúngicos. Foi possível observar a presença de matriz extracelular densa e a presença de canais de água. Nos maiores aumentos (20.000 X) foi possível observar alterações

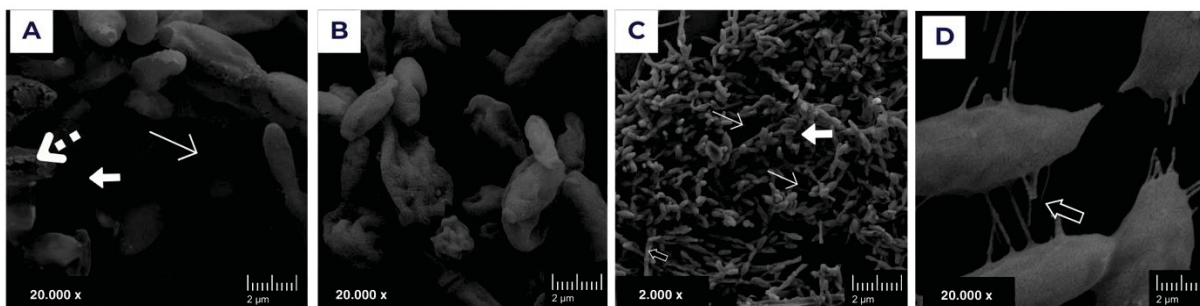
morfológicas significativas nas células em forma de charuto, redução das fibrilas intercelulares e alterações e rotura da parede celular. As imagens de MEV da linhagem CMRP 5491 são apresentadas na FIGURA 47 e as linhagem CMRP 2525 são apresentadas na FIGURA 48.

FIGURA 47 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILMES MADUROS DE *Sporothrix brasiliensis* CMRP 5491 APÓS TRATAMENTOS COM ANTIFÚNGICOS



LEGENDA: (A e D) Biofilmes tratados com TERB (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (B e E) ITZ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (C e F) Combinação de TERB (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ITZ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As imagens A–B mostram a preservação da arquitetura do biofilme, destacando uma matriz extracelular densa (setas brancas largas) e canais de água (setas brancas estreitas). Os painéis D–F, em maior ampliação, demonstram alterações morfológicas nas células, incluindo a redução das fibrilas intercelulares (setas pretas) e a desorganização da parede celular fúngica (setas brancas tracejadas).
FONTE: A autora (2025).

FIGURA 48 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILMES MADUROS DE *Sporothrix brasiliensis* CMRP 2525 APÓS TRATAMENTOS COM ANTIFÚNGICOS



LEGENDA: (A) Biofilme tratado com TERB (0,5 µg/mL) mostrando a preservação da arquitetura do biofilme, destacando uma matriz extracelular densa (setas brancas largas) e canais de água (setas brancas estreitas) além da desorganização da parede celular fúngica (seta branca tracejada) (20.000 x); (B) ITZ (1 µg/mL) mostrando alterações morfológicas celulares (20.000x); (C) A combinação em dose mais baixa (TERB 0,004/ITZ 0,03 µg/mL) resultou em um biofilme compacto e bem formado, com abundante matriz extracelular (setas brancas largas) e canais de água visíveis (setas brancas estreitas) (2.000×). (D) Alterações morfológicas nas células, incluindo a redução das fibrilas intercelulares (setas pretas) (20.000x).

FONTE: A autora (2025).

O modelo estatístico indicou uma diferença significativa entre os tratamentos antifúngicos em relação à inibição dos biofilmes de *S. brasiliensis* ($p = 0,016$) e uma interação significativa entre o medicamento e a concentração ($p < 0,001$), revelando um efeito dose-dependente. Nas concentrações de ITZ de 0,03 a 0,25 µg/mL e da combinação TERB/ITZ de 0,004/0,03 a 0,03/0,25 µg/mL, o itraconazol e a combinação antifúngica apresentaram densidade óptica significativamente menor em comparação à terbinafina ($p < 0,05$). No entanto, o itraconazol exibiu valores de MBIC mais elevados, sugerindo que concentrações mais altas foram necessárias para inibir a formação inicial do biofilme.

A terbinafina apresentou um MBIC mais variável, indicando uma resposta menos consistente entre os isolados testados. A combinação antifúngica não demonstrou uma vantagem clara *in vitro* em relação ao itraconazol isolado.

Para os valores de MBEC em biofilmes maduros, o modelo ajustado indicou uma diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,001$), mas a interação entre o medicamento e a concentração não foi estatisticamente significativa ($p = 0,846$), sugerindo um efeito mais uniforme entre as doses. A análise comparativa mostrou que a terbinafina foi significativamente mais eficaz do que tanto o itraconazol quanto a

combinação antifúngica na redução de biofilmes maduros ($p = 0,004$ e $p < 0,001$, respectivamente).

O itraconazol apresentou valores de MBEC mais elevados, reforçando que doses mais altas foram necessárias para a erradicação. Mais uma vez, a combinação antifúngica não apresentou uma vantagem clara em relação ao itraconazol isolado.

Esses achados sugerem que, enquanto o itraconazol e a combinação antifúngica foram mais eficazes na fase de inibição, a terbinafina teve um desempenho superior na eliminação dos biofilmes maduros.

6 DISCUSSÃO

Embora seja a forma leveduriforme do *Sporothrix brasiliensis* a forma parasitária em vertebrados, a maioria dos estudos anteriores sobre susceptibilidade *in vitro* foram conduzidos utilizando as formas filamentosas de diferentes espécies dentro do gênero *Sporothrix* (96,97). Estudos focados nas formas leveduriformes têm ganhado atenção crescente, assim como estudos de susceptibilidade *in vitro* em biofilmes propriamente ditos (75,98).

Nesse contexto, nosso estudo contribui para o crescente corpo de dados sobre a susceptibilidade da fase leveduriforme, bem como para a descrição da metodologia. Neste estudo, a terbinafina (TRB) demonstrou maior atividade contra *Sporothrix brasiliensis* (Tabela 2) no teste de susceptibilidade de formas planctônicas *in vitro*. Estes resultados são consistentes com os valores previamente relacionados para esta fase fúngica. (99,90,65,82,100,97,88,41).

Neste estudo, estudamos a combinação de TERB e ITZ em método de *checkerboard* utilizando a resazurina como corante para a leitura do experimento, o que torna a leitura mais fácil, uma vez que a diferenças entre as colorações adquiridas nos micros poços utilizados no experimento é muito marcante. Apesar de ser uma metodologia relatada na literatura, o uso deste corante para leitura visual de testes de susceptibilidade *in vitro* de TERB e ITZ combinados contra formas leveduriformes de *S. brasiliensis* ainda estava por ser realizado Dessa forma, este estudo apresenta uma abordagem inédita para essa espécie e fase morfológica, contribuindo para a padronização de ensaios de combinação antifúngica e oferecendo uma estratégia simples, reprodutível e de fácil interpretação para a avaliação da atividade sinérgica entre antifúngicos.(91).

Duas linhagens do presente estudo, CMRP 2525 e CMRP 3967, apresentaram CIMs de 2 µg/mL para itraconazol, coincidindo com o valor de corte epidemiológico (VCE) previamente proposto para esta espécie. Os VCEs permitem diferenciar entre cepas selvagens (aquelas sem evidência de resistência adquirida, CIMs ≤ VCE) e potenciais cepas não selvagens (com possível resistência adquirida, CIMs > VCE). Nesse contexto, Almeida-Paes et al. (2017) propuseram que CIMs ≤ 0,25 µg/mL e ≥ 0,5 µg/mL para terbinafina, e ≤ 2 µg/mL e ≥ 4 µg/mL para itraconazol, poderiam ser indicativos de suscetibilidade ou resistência, respectivamente. Estas linhagens poderiam, portanto, ser considerados potencialmente não selvagens, ou

seja, situando-se no limiar entre linhagens suscetíveis e potencialmente resistentes. Neste estudo, a terbinafina demonstrou importante atividade *in vitro* contra todas as cepas de *S. brasiliensis* testadas, com CIMs de 0,125 µg/mL — valor bem abaixo do VCE proposto. Isso sugere suscetibilidade e corrobora achados prévios (93,101).

Como esperado, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos testes de formas planctônicas foram diferentes das concentrações antifúngicas que provocaram alterações na adesão e na erradicação de biofilmes, uma vez que a resposta a medicamentos pode ser modificada pela composição e pela estrutura tridimensional e organizada deles. (2). Assim, o teste de susceptibilidade *in vitro* das formas planctônicas serviu como base para definição de concentrações a serem utilizadas nos experimentos posteriores com os biofilmes de formas leveduriformes de *S. brasiliensis*.

Os resultados deste estudo confirmam a capacidade das formas leveduriformes de *Sporothrix brasiliensis* em formar biofilmes organizados e estruturados (FIGURAS 35-37), conforme previamente relatado em outros estudos (90,75,82).

A inibição da formação de biofilmes foi avaliada mediante a adição de agentes antifúngicos após três horas de incubação, período correspondente à adesão celular inicial, conforme descrito por Sánchez-Herrera et al. (2021).

A análise da biomassa destas micropilacas, demonstrou que, mesmo após a remoção das células não aderentes, os controles apresentaram alta densidade óptica, indicando uma capacidade relativamente rápida de adesão e formação de biofilme (FIGURA 38).

As imagens obtidas por MCVL e MEV corroboraram os achados da análise quantitativa, revelando uma estrutura completa de biofilme, com matriz extracelular, canais de água e blocos celulares interconectados, mesmo após a exposição a concentrações mais baixas dos fármacos (FIGURA 35-37, 41D).

Os tratamentos antifúngicos não impediram a adesão nem destruíram totalmente os biofilmes; contudo, reduziram a biomassa e causaram alterações estruturais e morfológicas significativas.

Como já mencionado anteriormente, organização estrutural de biofilmes de formas *S. brasiliensis* já foi demonstrada em estudos anteriores, inclusive com testes de susceptibilidade *in vitro* (70,98) . Todavia, o presente estudo é o primeiro a investigar o comportamento desses biofilmes após o tratamento com a combinação

de terbinafina (TERB) e itraconazol (ITZ). Esse achado inédito preenche uma lacuna relevante na literatura, uma vez que biofilmes apresentam perfis de resposta antifúngica distintos das formas planctônicas, estando frequentemente associados à persistência da infecção e à falha terapêutica. Assim, nossos resultados fornecem evidências iniciais sobre o potencial da terapia combinada frente a biofilmes maduros de *S. brasiliensis*, contribuindo para a compreensão dos mecanismos de tolerância antifúngica e oferecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas em casos refratários ou de difícil manejo clínico.

A capacidade de interligação através de fibrilas intercelulares e alterações da parede celular após tratamento de formas leveduriformes de *S. brasiliensis* já foi descrita em estudos através de MEV e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (90,39). No presente estudo, além da confirmação dessas fibrilas em biofilmes não tratados por MEV, demonstramos, de forma inédita, alterações dessas estruturas após o tratamento com antifúngicos, tanto de maneira isolada quanto combinada. Esse achado é particularmente relevante, uma vez que as fibrilas intercelulares desempenham papel fundamental na coesão celular e na manutenção da arquitetura do biofilme (102). Assim, as alterações observadas sugerem um impacto direto dos antifúngicos sobre a integridade estrutural do biofilme, possivelmente comprometendo mecanismos associados à adesão, estabilidade e tolerância antifúngica, como já observado em estudos prévios sobre susceptibilidade de biofilmes de *Aspergillus fumigatus* (103). Esses dados fornecem evidências morfológicas do efeito dos tratamentos sobre componentes-chave do biofilme e ajudam a explicar, em nível estrutural, a redução da viabilidade observada, reforçando o potencial da combinação de terbinafina e itraconazol como estratégia para superar a resistência associada ao crescimento em biofilme.

A microscopia confocal a laser (MCVL) da inibição evidenciou uma diminuição tanto na fluorescência verde (SYTO9), quanto nas células inviáveis (vermelho) e uma redução global na presença de células aderentes (FIGURAS 39 a 40). A MEV confirmou a baixa adesão celular, com alterações morfológicas marcantes e diminuição das fibrilas intercelulares (FIGURA 41).

Nos biofilmes maduros (144 horas), o tratamento antifúngico não conseguiu eliminar completamente a organização estrutural, resultado semelhante ao observado em outros estudos com biofilmes de fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp. (104).

Além disso, alterações fenotípicas conferem às células fúngicas organizadas em biofilme condições de vida bastante diferentes das observadas em suas contrapartes planctônicas. Uma das diferenças mais significativas é a resistência bem documentada dos biofilmes aos agentes antifúngicos (105).

A matriz extracelular pode impedir o acesso dos antifúngicos às células incorporadas ao biofilme, supostamente reduzindo a taxa de transporte ou ligando-se aos antifúngicos de forma extracelular, dificultando assim sua penetração nas células (78). Esse atributo também já foi descrito em outros fungos patogênicos humanos, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (103,106).

O mecanismo de formação e regulação do biofilme fúngico está intimamente relacionado ao ambiente externo, mas também envolve uma série de genes complexos e vias regulatórias. Por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*, o gene *flo11* é importante para a formação de biofilme e maior resistência à anfotericina B (107).

A MCVL demonstrou preservação parcial da arquitetura, mas com um aumento das células inviáveis (vermelho) e uma clara presença de coloração alaranjada, indicando a sobreposição de células vivas e mortas (FIGURA 43-44), conforme previamente relatado em estudos de viabilidade celular por microscopia confocal (108).

A MEV reforçou esses achados, mostrando manutenção da arquitetura geral, mas com danos celulares evidentes, e áreas com rotura da parede celular, possivelmente correspondentes às áreas avermelhadas e alaranjadas identificadas pela microscopia confocal (FIGURAS 45-46).

O período de incubação de seis dias, embora curto, foi suficiente para o desenvolvimento de biofilmes estruturalmente organizados que podem dificultar a atividade antifúngica (14). Esse achado reforça a importância da identificação da doença e tratamento imediato da esporotricose, visto que os pacientes geralmente buscam assistência médica apenas após vários dias ou semanas de progressão da infecção (48,35).

Na prática clínica, esse atraso diagnóstico compromete a eficácia terapêutica, especialmente devido à rápida capacidade de formação de biofilmes em superfícies inanimadas, o que pode acontecer em dispositivos médicos, como cateteres intravenosos e instrumental cirúrgico, por exemplo (80,33,20,6,19).

Corroborando estudos anteriores, este trabalho demonstrou uma resistência relativa dos biofilmes de *S. brasiliensis* ao itraconazol (ITZ) e à terbinafina (TERB). A análise quantitativa da biomassa mostrou maior atividade do ITZ na inibição de biofilmes iniciais, enquanto a TERB foi mais eficaz contra biofilmes maduros (109).

Os valores de MBIC indicaram que concentrações mais elevadas de ITZ foram necessárias para inibir os biofilmes, enquanto a TERB, apesar de requerer concentrações inibitórias mais baixas, apresentou respostas variáveis entre as linhagens. Essas diferenças podem ser atribuídas aos mecanismos de ação de cada antifúngico: o ITZ, sendo um triazólico, inibe a biossíntese de ergosterol, comprometendo a membrana celular, o que pode explicar sua maior eficácia na fase inicial do biofilme, quando há menor proteção devido à limitada organização estrutural; enquanto a TERB, uma alilamina, inibe a esqualeno epoxidase, levando ao acúmulo tóxico de esqualeno, um mecanismo provavelmente mais eficiente em biofilmes maduros, caracterizados por uma maior quantidade de matriz extracelular (15,52).

Apesar das alterações morfológicas observadas por MCVL e MEV após o tratamento combinado com ITZ e TERB, não foi detectado efeito sinérgico estatisticamente significativo na inibição ou erradicação dos biofilmes, em contraste com relatos que sugerem interação sinérgica para outras espécies de *Sporothrix spp.* ou em relatos casos clínicos envolvendo infecções mucosas (110,111,40,25,112).

Essa ausência de sinergismo pode estar relacionada à ausência de mecanismos de ação complementares ou a um possível efeito antagonista sobre a penetração dos antifúngicos através da matriz do biofilme (52).

Embora estudos *in vitro* como este indiquem maior eficácia da terbinafina contra biofilmes maduros, o itraconazol continua sendo a terapia de primeira linha para o tratamento de esporotricose, devido a fatores farmacocinéticos, biodisponibilidade e interações com o sistema imunológico do hospedeiro (57,47,98,51,2).

Dessa forma, conclui-se que as formas leveduriformes de *Sporothrix brasiliensis* apresentam elevada capacidade de formação rápida de biofilmes *in vitro*, os quais exibem maior tolerância à atividade antifúngica quando comparados às formas planctônicas. A exposição ao itraconazol e à terbinafina, isoladamente ou em combinação, promoveu alterações morfológicas e estruturais significativas, incluindo modificações na organização do biofilme e nas fibrilas intercelulares, porém sem evidência de sinergismo antifúngico mensurável. Esses achados indicam que, embora

os antifúngicos interfiram na arquitetura do biofilme, eles não são suficientes para sua completa erradicação, sugerindo que mecanismos associados à matriz extracelular e à organização tridimensional contribuem para a manutenção da viabilidade celular.

Em conjunto, os resultados ampliam a compreensão dos mecanismos de tolerância antifúngica associados ao crescimento em biofilme e destacam a complexidade dessas comunidades microbianas. Do ponto de vista clínico, esses dados reforçam a importância do diagnóstico precoce e do início oportuno da terapia antifúngica, uma vez que a rápida formação de biofilmes pode impactar negativamente a resposta ao tratamento e favorecer a persistência da infecção. Além disso, os achados fornecem subsídios para a investigação de estratégias terapêuticas alternativas ou adjuvantes, especialmente em casos refratários ou de evolução prolongada. Estudos futuros em modelos *in vivo* serão fundamentais para estabelecer a relevância translacional desses resultados e esclarecer o papel dos biofilmes na evolução clínica da esporotricose.

REFERÊNCIAS

- [1] QUEIROZ-TELLES, F. et al. *Sporothrix* and Sporotrichosis. Em: **Encyclopedia of Infection and Immunity**. [s.l.] Elsevier, 2022. v. 2p. 376–396.
- [2] HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J. et al. Fungal strategies to evade the host immune recognition. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, dez. 2017.
- [3] SCHENCK BR. On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. **Bull Johns Hopkins Hosp**, n. 93, p. 286–290, 1898.
- [4] LUTZ A; SPLENDORE A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. Em: BENCHMOL JL; SA MG (Eds.). **Adolpho Lutz: Dermatologia e Micologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1907. v. 1-p. 429–454.
- [5] 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**, p. S126–S143, 1 abr. 2018.
- [6] QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: An overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225–236, abr. 2011.
- [7] DA SILVA, M. S. et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos De Saude Publica**, v. 28, p. 1867–1880, 2012.
- [8] BARNACLE, J. R. et al. The first three reported cases of *Sporothrix brasiliensis* cat-transmitted sporotrichosis outside South America. **Medical Mycology Case Reports**, v. 39, p. 14–17, mar. 2023.
- [9] COGNIALLI, R. C. R. et al. Rising Incidence of *Sporothrix brasiliensis* Infections, Curitiba, Brazil, 2011-2022. **Emerging Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 1330–1339, jul. 2023.

- [10] DENG, Y. et al. Optimization of Staining with SYTO 9/Propidium Iodide: Interplay, Kinetics and Impact on *Brevibacillus Brevis*. **BioTechniques**, v. 69, n. 2, p. 88–98, ago. 2020.
- [11] DO PRADO, C. M. et al. First Cases of Feline Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis* in Paraguay. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 10, out. 2023.
- [12] QUEIROZ -TELLES F; FERNANDEZ NB. ESPOROTRICOSIS. Em: RIERA F et al. (Eds.). **Manual de infecciones fúngicas sistémicas**. 4Th. ed. Cordoba: Asociación Panamericana de Infectología., 2023. p. 147–160.
- [13] THOMSON, P. et al. Sporotrichosis Outbreak Due to *Sporothrix brasiliensis* in Domestic Cats in Magallanes, Chile: A One-Health-Approach Study. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, fev. 2023.
- [14] WALLER, S. B. et al. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , mar. 2021.
- [15] ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, mar. 2016.
- [16] DE LIMA BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 354–633, out. 2011.
- [17] GREMIÃO, I. et al. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, mar. 2020.
- [18] QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, nov. 2017.
- [19] QUEIROZ-TELLES, F.; BUCCHERI, R.; BENARD, G. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, mar. 2019.

- [20] NAHAL, J. et al. Non-Zoonotic Transmission of Sporotrichosis: A Translational Study of Forty-Three Cases in a Zoonotic Hyperendemic Area. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 9, p. 610, ago. 2024.
- [21] RODRIGUES, A. M. et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 813–842, out. 2020.
- [22] 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, set. 2017.
- [23] SCHECHTMAN, R. C. et al. Sporotrichosis: hyperendemic by zoonotic transmission, with atypical presentations, hypersensitivity reactions and greater severity. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 1, p. 1–13, jan. 2022.
- [24] POESTER, V. et al. **Sporotrichosis hyperendemic in Southern Brazil: twelve years of challenges**. Poster Session 2. **Anais...Brazil: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)**, 22 set. 2022.
- [25] RODRIGUES, A. M. et al. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, ago. 2022.
- [26] MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria GM/MS nº 6.734, de 18 de março de 2025: Altera o Anexo 1 do Anexo V da Portaria de Consolidação GM/MS nº 4, de 28 de setembro de 2017, para incluir a esporotricose humana na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional**. Ministério da Saúde, Gabinete do Ministro, , 2025. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou>>
- [27] SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Resolução SESA nº 093/2022: Define a Esporotricose Humana e Animal como doenças de interesse estadual e de notificação compulsória nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território estadual**. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, , 2022. Disponível em: <<https://www.saude.pr.gov.br/>>

- [28] SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Boletins Epidemiológicos de Esporotricose**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Esporotricose>>.
- [29] XAVIER, M. O. et al. *Sporothrix brasiliensis*: Epidemiology, Therapy, and Recent Developments. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, set. 2023.
- [30] BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: Current status of a complex disease. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, mar. 2017.
- [31] RIBEIRO, C. R. et al. Ocular Sporotrichosis. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 19, set. 2020.
- [32] CARVALHO, G. DE S. M.; VEASEY, J. V. Immunoreactive cutaneous sporotrichosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 95, n. 6, p. 737–739, nov. 2020.
- [33] MIALSKI R et al. Chronic Meningitis and Hydrocephalus due to *Sporothrix brasiliensis* in Immunocompetent Adults: A Challenging Entity. **Open Forum Infect Dis**, v. 5, n. 31, p. ofy203, ago. 2018.
- [34] 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. 21, n. 12, p. e364–e374, dez. 2021.
- [35] OROFINO-COSTA, R. et al. Arthritis as a hypersensitivity reaction in a case of sporotrichosis transmitted by a sick cat: Clinical and serological follow up of 13 months. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 81–83, jan. 2010.
- [36] VIZCAYCHIPI, K. A. et al. Emergence of Feline Sporotrichosis near Brazil Border, Argentina, 2023-2024. **Emerging Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 1045–1048, 2025.

- [37] 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, mar. 2021.
- [38] ARENAS, R. et al. Sporotrichosis: From KOH to molecular biology. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, jun. 2018.
- [39] 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, mar. 2018.
- [40] RODRIGUES, A. M. et al. Emerging Sporotrichosis Is Driven by Clonal and Recombinant *Sporothrix* Species. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 4, p. e1008648, 2020.
- [41] ZHANG, X. et al. In vitro activity of itraconazole in combination with terbinafine against clinical strains of itraconazole-insensitive *Sporothrix schenckii*. **European Journal of Dermatology**, v. 21, n. 4, p. 573–576, 2011.
- [42] LI, L. et al. The Role of Histopathological Examination in the Diagnosis of Cutaneous Sporotrichosis Caused by *Sporothrix globosa* : A Retrospective Analysis and Reassessment. **Mycoses**, v. 68, n. 6, p. e70072, jun. 2025.
- [43] MORAES, A.; MIRANDA, E. Sobre a Presença de Formações Radiadas (esteróides) na Esporotricose. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 6, n. 1, p. 5–11, jan. 1964.
- [44] 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, dez. 2020.
- [45] COGNIALLI, R. et al. A lateral flow assay for the immunodiagnosis of human CAT TRANSMITTED sporotrichosis. **Mycoses**, v. 65, n. 10, p. 926–934, out. 2022.

- [46] RODRIGUES, A. M. et al. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, 2015.
- [47] DOS REIS, E. G. et al. A Randomized Clinical Trial Comparing Itraconazole and a Combination Therapy with Itraconazole and Potassium Iodide for the Treatment of Feline Sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 2, fev. 2024.
- [48] LYRA, M. R. et al. Sporotrichosis refractory to conventional treatment: therapeutic success with potassium iodide. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 2, p. 231–233, mar. 2021.
- [49] GIUFFRIDA, R. et al. Pulse itraconazole in the treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: A case report from Southern Italy and review of the literature. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 4, jul. 2020.
- [50] OROFINO-COSTA, R. et al. Esporotricose humana: recomendações da Sociedade Brasileira de Dermatologia para o manejo clínico, diagnóstico e terapêutico. **Anais Brasileiros de Dermatologia (Portuguese)**, v. 97, n. 6, p. 757–777, 2022.
- [51] GRISOLIA, J. C. et al. Itraconazole and neutrophil interactions in the immune-inflammatory response of paracoccidioidomycosis using a murine air pouch infection model. **Life Sciences**, v. 315, fev. 2023.
- [52] RAMZI, S. H. T. et al. Efficacy of Terbinafine and Itraconazole Combination Therapy Versus Terbinafine or Itraconazole Monotherapy in the Management of Fungal Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cureus**, v. 14, n. 15, p. e48819, nov. 2023.
- [53] JESSUP, C. J.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. An Evaluation of The *in vitro* Activity of Terbinafine. **Medical Mycology**, v. 38, p. 155–159, 2000.
- [54] PÉREZ, A. Terbinafine- broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. **Mycoes**, n. 6, p. 111–114, jun. 1999.

- [55] BONSMANN, G. et al. Terbinafine-induced subacute cutaneous lupus erythematosus. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 6, p. 925–931, 2001.
- [56] CERCI, F.; NIHI, F.; CARVALHO, M. Erythrodermic psoriasis following terbinafine use. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 5, p. AB249, maio 2016.
- [57] CARNERO, L. C. G. et al. Immunity and treatment of sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, set. 2018.
- [58] FERNANDEZ, N. B. et al. Proceedings of the second international meeting on endemic mycoses of the Americas (IMEMA) and first international symposium on implantation mycoses (ISIM). **Medical Mycology**, v. 62, n. 7, jul. 2024.
- [59] LEGABÃO, B. C. et al. The zoonosis sporotrichosis can be successfully treated by photodynamic therapy: A scoping review. **Acta Tropica**, v. 228, p. 106341, 2022.
- [60] DAN ZHAO, M. et al. Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 16, n. 11, p. 940–947, nov. 2015.
- [61] OLIVEIRA, D. C. et al. *Sporothrix schenckii* complex: Susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 4, p. 289–294, jul. 2015.
- [62] 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.
- [63] ALVARADO-RAMÍREZ, E.; TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. In vitro susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2420–2423, jul. 2007.

- [64] VETTORATO, R. et al. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* *senso stricto* with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed in vitro and in vivo: Case report. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, p. 18–20, mar. 2018.
- [65] BRILHANTE, R. S. N. et al. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. **Medical Mycology**, v. 56, n. 3, p. 297–306, 1 abr. 2017.
- [66] MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The extracellular matrix of fungal biofilms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 931, p. 21–35, 2016.
- [67] BORBA-SANTOS, L. P. et al. A novel naphthoquinone derivative shows selective antifungal activity against *Sporothrix* yeasts and biofilms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 749–758, jun. 2022.
- [68] BRILHANTE, R. S. N. et al. Exogenous fungal quorum sensing molecules inhibit planktonic cell growth and modulate filamentation and biofilm formation in the *Sporothrix schenckii* complex. **Biofouling**, v. 36, n. 8, p. 909–921, set. 2020.
- [69] BRILHANTE, R. et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility Running Title: Antifungal susceptibility of *H. capsulatum* biofilm. **J Med Microbiol**, fev. 2015.
- [70] COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, jun. 2017.
- [71] BARBIERI, D. **Variabilidade Genética e Produção de Biofilme in vitro por *Streptococcus mutans* em Associação com Leveduras do Gênero *Candida***. Departamento de Microbiologia: Federal do Paraná, 2014.
- [72] HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 915–921, mar. 1994.

- [73] OTTONELLI STOPIGLIA, C. D. et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 56–64, 2013.
- [74] VEASEY, J. V. et al. Evidence of Clinical and Laboratory Correlation of Itraconazole Resistance in *Sporothrix brasiliensis* Infection: Case Report. **Microorganisms**, v. 12, n. 11, p. 2132, 24 out. 2024.
- [75] BRILHANTE, R. S. N. et al. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Medical Mycology**, v. 57, n. 6, p. 464–472, ago. 2019.
- [76] KOHLER, L. M. et al. In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: Comparison of yeast and mycelial forms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 843–847, set. 2006.
- [77] ALMEIDA-PAES, R. et al. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo resistance. **Medical Mycology**, v. 55, n. 5, p. 507–517, jul. 2017.
- [78] LIU, S. et al. Filamentous fungal biofilms: Conserved and unique aspects of extracellular matrix composition, mechanisms of drug resistance and regulatory networks in *Aspergillus fumigatus*. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 8, n. 1, p. 83, 19 out. 2022.
- [79] SÁNCHEZ-HERRERA, R. et al. Analysis of biofilm formation by *Sporothrix schenckii*. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 31–40, 2020.
- [80] COGNIALLI, R. C. R. et al. New Insights on Transmission of *Sporothrix brasiliensis*. **Mycoses**, v. 68, n. 3, mar. 2025.
- [81] BRILHANTE, R. S. N. et al. In vitro susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 275–279, jan. 2016.

- [82] BRILHANTE, R. S. et al. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1129–1140, ago. 2018.
- [83] FERNANDEZ-FLORES, A.; SAEB-LIMA, M.; ARENAS-GUZMAN, R. Morphological Findings of Deep Cutaneous Fungal Infections. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 36, n. 7, p. 531–556, jul. 2014.
- [84] MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: An overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, dez. 2014.
- [85] MACHADO, T. C. et al. Insights from Cutting-edge Diagnostics and Epidemiology of Sporotrichosis and Taxonomic Shifts in *Sporothrix*. **Current Fungal Infection Reports**, v. 19, n. 1, dez. 2025.
- [86] CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A.; PEMÁN, J. **Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods.** **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, fev. 2009.
- [87] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, 3rd ed; Approved standard. Document M27-A3.** Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [88] SANCHOTENE, K. O. et al. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: Comparison of yeast and mycelial phases. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p. 869–876, nov. 2017.
- [89] FRITSCH, K.; SAAL, C.; SPIELDENNER, B. Weighing according to the European Pharmacopoeia: general considerations and new general chapter 2.1.7. Balances for analytical purposes. **Pharmeuropa bio & scientific notes**, v. 2022, p. 1–9, maio 2022.
- [90] 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, out. 2015.

- [91] BARROS, I. L. E. et al. Standardization of resazurin use in susceptibility testing of natural products against yeasts in planktonic cells and in biofilms formation. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 43, mar. 2021.
- [92] BARUA, P. et al. A rapid and miniaturized system using Alamar blue to assess fungal spore viability: implications for biosecurity. **European Journal of Plant Pathology**, v. 148, n. 1, p. 139–150, maio 2017.
- [93] BIDAUD, A. L. et al. **Techniques for the assessment of in vitro and in vivo antifungal combinations**. **Journal of Fungi**MDPI AG, , fev. 2021.
- [94] PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, p. 1494–1500, 2008.
- [95] WILL, A. **Evaluation Of Wettability of Titanium Dioxide Thin Film Using Seawater for Antifouling Analysis**. Joinville, dez. 2017.
- [96] BRANDOLT, T. M. et al. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in Southern Brazil, 2012–2017. **Medical Mycology**, v. 57, n. 5, p. 527–533, jul. 2019.
- [97] MARIMON, R. et al. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 732–734, fev. 2008.
- [98] DOS SANTOS, G. M. P. et al. *Sporothrix* spp. Biofilms Impact in the Zoonotic Transmission Route: Feline Claws Associated Biofilms, Itraconazole Tolerance, and Potential Repurposing for Miltefosine. **Pathogens**, v. 11, n. 2, fev. 2022.
- [99] BOMBASSARO, A. et al. Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Sporothrix brasiliensis* isolates from Southern Brazil. **Mycoses**, v. 66, n. 7, p. 585–593, jul. 2023.
- [100] 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, jul. 2018.

- [101] ESPINEL-INGROFF, A.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 41–50, 2012.
- [102] CORRÊA-JUNIOR, D. et al. Unveiling the Morphostructural Plasticity of Zoonotic Sporotrichosis Fungal Strains: Possible Implications for *Sporothrix brasiliensis* Virulence and Pathogenicity. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 7, jul. 2023.
- [103] PUERNER, C. et al. Transcriptional analysis of developing *Aspergillus fumigatus* biofilms reveals metabolic shifts required for biofilm maintenance. 2 jun. 2025.
- [104] SHAILAJA, A. et al. Comparison of cell viability assessment and visualization of *Aspergillus niger* biofilm with two fluorescent probe staining methods. **Biofilm**, v. 4, dez. 2022.
- [105] WANG, D. et al. Fungal biofilm formation and its regulatory mechanism. **Heliyon**, v. 10, n. 12, p. e32766, jun. 2024.
- [106] ROMERO, O.; GUTIERREZ-GONGORA, D.; GEDDES-MCALISTER, J. *Cryptococcus neoformans* Biofilm Formation and Quantification. **Current Protocols**, v. 5, n. 4, p. e70133, abr. 2025.
- [107] BOUYX, C.; SCHIAVONE, M.; FRANÇOIS, J. M. FLO11, a Developmental Gene Conferring Impressive Adaptive Plasticity to the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1509, 19 nov. 2021.
- [108] MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, mar. 2006.
- [109] KIRMUSAOĞLU, S. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. Em: INTECHOPEN (Ed.). **Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods**. London: IntechOpen, 2019. p. 1–17.

- [110] GUO, K. et al. Effective treatment using itraconazole combined with terbinafine in the treatment of nasal sporotrichosis: A case report. **Medicine (United States)**, v. 98, n. 37, set. 2019.
- [111] IZOTON, C. F. G. et al. Sporotrichosis in the nasal mucosa: A single-center retrospective study of 37 cases from 1998 to 2020. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, 2023.
- [112] ZACARIAS, E. et al. Sporotrichosis in the earlobe caused by placing an earring. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 29, n. 1, jan. 2025.
- [113] O'DAY, D. M. et al. Laboratory isolation techniques in human and experimental fungal infections. **American Journal of Ophthalmology**, v. 87, n. 5, p. 688–693, 1979.
- [114] JANSSEN, M. J. F. W.; DE KRUIJFF, B.; DE KROON, A. I. P. M. Phosphate is required to maintain the outer membrane integrity and membrane potential of respiring yeast mitochondria. **Analytical Biochemistry**, v. 300, n. 1, p. 27–33, jan. 2002.
- [115] GONÇALVES, L. N. C. et al. Biofilm Formation by *Histoplasma capsulatum* in Different Culture Media and Oxygen Atmospheres. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, jul. 2020.
- [116] MAPAR, M. et al. Biomarker Enrichment Medium: A Defined Medium for Metabolomic Analysis of Microbial Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 957158, 2022.
- [117] NOVA BIOTECNOLOGIA. **RPMI-1640 – ficha técnica**. Disponível em: <<https://www.novabiotecnologia.com.br/>>.
- [118] ABRAHAMSON, D. R. The Graham and Karnovsky Horseradish Peroxidase Ultrastructural Method: A Premier JHC Citation Classic. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 43–45, jan. 2023.

APÊNDICE 1 - SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

ÁGAR SABOURAUD (KASVI Ltda, Pinhais, PR, Brasil):

É um meio de cultura com nutrientes que favorece o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos.

Composição:

Peptona 10 g

Dextrose 40 g

Água Destilada 1000 mL

O pH final deve ser ajustado para 5,6.

Para o Ágar Sabouraud, acrescentar 15g de ágar simples para cada 1000 mL de meio. O pH foi ajustado para 7,3 -7,4. Autoclavar a 121°C, 1atm, por 20 minutos.

CALDO BHI

O meio BHI (Brain Heart Infusion Agar) é amplamente utilizado para o crescimento de fungos e bactérias por sua composição rica em nutrientes, favorecendo o desenvolvimento de diversas espécies, incluindo *Sporothrix brasiliensis* (113). O meio de cultura BHI (ACUMEDIA LAB (NEOGEN, Miami, EUA) foi produzido segundo as instruções do fabricante e utilizado em todos os experimentos. Como a validade deste meio de cultura após a sua reconstituição é de 2 semanas, (recomendações da embalagem) se mantidas em temperaturas de 2 a 8°C, a produção foi de 300 mL por quinzena, a quantidade era suficiente para preencher 15 placas de Petri de poliestireno esterilizadas descartáveis (PROLAB Ltda, São Paulo, SP) de 90 mm x15 mm, o suficiente para 2 semanas de experimentos. A quantidade de 14,7 g de BHI pó foi pesada em balança de precisão (Bel Engineering srl, Monza, Itália) e foi diluída em um frasco de vidro borossilicato tipo Duran de 500mL, contendo

300 mL de água destilada. O frasco foi vedado com rolha de algodão, papel kraft e elástico e após 20 minutos, o tempo necessário para diluição, o frasco foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C, 1 atm. Após o período de 45 minutos após a esterilização, tempo necessário para o resfriamento, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri esterilizadas descartáveis de poliestireno ainda na forma líquida, sob condições assépticas em cabine de segurança biológica, na quantidade de 20 mL ou 4 mm de altura por placa. Após a distribuição nas referidas placas, o meio foi deixado em temperatura ambiente até a solidificação, o que ocorreu em 20 minutos. Após a solidificação as placas foram seladas com papel filme (6 placas de Petri por pacote), identificadas e armazenadas em geladeira exclusiva para meios de cultura a 6 °C até o momento dos experimentos. Antes da utilização, as placas de Petri contendo meio BHI eram deixadas em bancada limpa com álcool 70 por 1 hora em temperatura ambiente (Brasil. Ministério da Saúde, 2004). (FIGURA 1).

FIGURA 1 – IMAGENS DA PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA BHI



LEGENDA: A) Meio BHI em pó, B) Pesagem, C) Diluição, D) Meio BHI aguardando resfriamento para transferência, E) Transferência para placas de Petri descartáveis, F) Placas de Petri aguardando solidificação em cabine de segurança biológica.

FONTE: A autora (2024).

SOLUÇÃO TAMPÃO SALINO FOSFATO (PBS)

A Solução Salina Tamponada Fosfato (PBS do inglês: *phosphate buffered saline solution*) é utilizada com frequência em experimentos com leveduras por oferecer um ambiente isotônico e tamponado às soluções que auxilia na manutenção da integridade das membranas celulares e mitocondriais das células leveduriformes (114).

Composição:

Água Destilada 1000 mL

NaCl 8g

KH₂PO₄ 0,2g

Na₂HPO₄ 1,15g

KCl 0,2g

NaNO₃ 0,2g

Misturar todos os ingredientes e ajustar o pH para 6,8. Autoclavar 20 minutos 1 atm.

RPMI - ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE (Nova Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil)

O meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) tem este nome porque foi desenvolvido por Moore e cols. (1969) no Roswell Park Memorial Institute, na cidade de Buffalo (NY, EUA). (115). Este produto é utilizado como meio de cultura celular devido à sua composição bem definida, que serve como suporte o crescimento de uma variedade de células, incluindo células leveduriformes. A escolha deste meio de cultura é baseada na necessidade de ambiente controlado e consistente para o crescimento celular (116). Deve ser conservado entre 2 a 8 °C e é vendido em pronto para o uso, isto é, sem necessidade de diluição, em frascos de 500 mL(117).

Composição: mg/L

AMINOÁCIDOS mg/L

L-Arginina HCl 200,000
L-Asparagina 50,000
L-Ácido Aspártico 20,000
L-Cistina 2HCl 65,150
L-Ácido Glutâmico 20,000
L-Glutamina 300,000
Glicina 10,000
L-Histidina 15,000
L-Hidroxiprolina 20,000
L-Isoleucina 50,000
L-Leucina 50,000
L-Lisina HCl 40,000
L-metionina 15,000
L-Fenilalanina 15,000
L-Prolina 20,000
L-Serina 30,000
L-Treonina 20,000
L-Triptofano 5,000
L-Tirosina 2Na.2H₂O
28,830
L-Valina 20,000
SAIS INORGÂNICOS.
Ca(NO₃)₂ 4H₂O 100,000
KCl 400,000
MgSO₄ (anhidro) 48,840
NaCl 6.000,000
Na₂HPO₄ (anhidro) 800,000
VITAMINAS d-Biotina 0,200
D-Ca Pantotenato 0,250
Cloreto de Colina 3,000
Ácido Fólico 1,000
Mio-Inositol 35,000
Niacinamida 1,000
Piridoxina HCl 1,000

Riboflavina 0,200
Tiamina HCl 1,000
Vitamina B12 0,005
OUTROS COMPONENTES
D-glicose 2.000,000
Ácido para-Aminobenzóico (PABA) 1,000
Glutationa (reduzida) 1,000
Vermelho de fenol (sódio) 5,300
NaHCO₃ 0,000
HEPES 0,000

FONTES: Website do Fabricante.

SOLUÇÃO DE KARNOVSKY

Composição:

Glutaraldeído 25% 10 mL
Paraformaldeído 10% 20 mL
Tampão Cacodilato de Sódio 0,2M 25 mL
CaCl₂ 0,1M 1mL
Água Bidestilada 44 mL

A solução de Karnovsky é uma solução fixadora utilizada principalmente em técnicas de microscopia eletrônica para preservação de tecidos biológicos. Sua composição, proporciona a preservação da ultraestrutura celular devido à ação combinada dos dois aldeídos (paraformaldeído e glutaraldeído), que promovem reticulação eficiente das proteínas. Seu uso é considerado padrão em protocolos de histoquímica e citologia, especialmente quando se deseja alta qualidade de preservação estrutural (118,95).

MODO DE PREPARO:

Fixação: Deixar o espécime fixando na solução por no mínimo 24 horas. Lavar 2 a 3 vezes no tampão cacodilato de sódio 0,05 M e proceder a desidratação.

Preparo da solução paraformaldeído 8%

A solução de 8% é composta por:

40g de paraformaldeído;

2g de NaOH (hidróxido de sódio);

450 mL de água destilada

Para preparar a solução de hidróxido de sódio, numa balança digital foi pesado 2g de NaOH e em seguida foi diluída em 1 litro de água num balão volumétrico.

Em seguida, em um béquer de 500mL foi colocado 450 mL de água e diluído 40g de paraformaldeído. A mistura foi levada num agitador magnético a uma temperatura de 60 ° C.

Durante a agitação, foi gotejado com o auxílio de uma pipeta a solução de hidróxido de sódio, feita anteriormente, até que a mistura ficasse transparente. Logo em seguida foi feita a filtração utilizando um papel filtro.